Ce document constitue un outil de documentation et n'engage pas la responsabilité des institutions

►**B** **RÈGLEMENT (CE) Nº 440/2008 DE LA COMMISSION**

du 30 mai 2008

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

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

(JO L 142 du 31.5.2008, p. 1)

Modifié par:

		Journal officiel		
		n°	page	date
►**M1**	Règlement (CE) nº761/2009 de la Commission du 23 juillet 2009	L 220	1	24.8.2009
►**M2**	Règlement (UE) nº 1152/2010 de la Commission du 8 décembre 2010	L 324	13	9.12.2010
►**M3**	Règlement (UE) nº 640/2012 de la Commission du 6 juillet 2012	L 193	1	20.7.2012
►**M4**	Règlement (UE) nº 260/2014 de la Commission du 24 janvier 2014	L 81	1	19.3.2014

▼B

RÈGLEMENT (CE) nº 440/2008 DE LA COMMISSION

du 30 mai 2008

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

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

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu le règlement (CE) nº 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) nº 793/93 du Conseil et le règlement (CE) nº 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission ([1]), et notamment son article 13, paragraphe 3,

considérant ce qui suit:

(1) Conformément au règlement (CE) nº 1907/2006, il convient que des méthodes d'essai soient adoptées au niveau communautaire aux fins de la réalisation d'essais sur des substances lorsque de tels essais sont nécessaires pour produire des informations sur les propriétés intrinsèques desdites substances.

(2) La directive 67/548/CEE du Conseil du 27 juin 1967 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses ([2]) définissait, à l'annexe V, les méthodes permettant de déterminer les propriétés physico-chimiques, la toxicité et l'écotoxicité des substances et préparations. L'annexe V de la directive 67/548/CEE a été supprimée par la directive 2006/121/CE avec effet au 1er juin 2008.

(3) Il y a lieu que les méthodes d'essai de l'annexe V de la directive 67/548/CEE soient intégrées dans le présent règlement.

(4) Le présent règlement n'exclut pas l'utilisation d'autres méthodes d'essai à condition que ladite utilisation soit conforme aux dispositions de l'article 13, paragraphe 3, du règlement (CE) nº 1907/2006.

([1]) JO L 396 du 30.12.2006, p. 1; rectifié au JO L 136 du 29.5.2007, p. 3.
([2]) JO 196 du 16.8.1967, p. 1. Directive modifiée en dernier lieu par la directive 2006/121/CE du Parlement européen et du Conseil (JO L 396 du 30.12.2006, p. 850); rectifiée au JO L 136 du 29.5.2007, p. 281.

▼B

(5) Il importe que les principes de remplacement, de réduction et d'affinement de l'utilisation des animaux dans les procédures soient pleinement pris en compte lors de l'élaboration des méthodes d'essai, notamment lorsque des méthodes appropriées et validées permettant de remplacer, réduire ou affiner les essais sur les animaux deviennent disponibles.

(6) Les dispositions du présent règlement sont conformes à l'avis du comité institué par l'article 133 du règlement (CE) nº 1907/2006,

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

Les méthodes d'essai à appliquer aux fins du règlement (CE) nº 1907/2006 sont définies à l'annexe du présent règlement.

Article 2

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

Article 3

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

Article 4

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

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

▼B

ANNEXE

PARTIE A: MÉTHODES DE DÉTERMINATION DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

TABLE DES MATIÈRES

A.1. TEMPÉRATURE DE FUSION/DE CONGÉLATION

A.2. TEMPÉRATURE D'ÉBULLITION

A.3. DENSITÉ RELATIVE

A.4. PRESSION DE VAPEUR

A.5. TENSION SUPERFICIELLE

A.6. SOLUBILITÉ DANS L'EAU

A.8. COEFFICIENT DE PARTAGE

A.9. POINT D'ÉCLAIR

A.10. INFLAMMABILITÉ (SOLIDES)

A.11. INFLAMMABILITÉ (GAZ)

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

A.13. PROPRIÉTÉS PYROPHORIQUES DES SOLIDES ET DES LIQUIDES

A.14. DANGER D'EXPLOSION

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

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

A.17. PROPRIÉTÉS COMBURANTES (SOLIDES)

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

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

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

A.21. PROPRIÉTÉS COMBURANTES (LIQUIDES)

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

▼M4

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

▼B

A.1. TEMPÉRATURE DE FUSION/DE CONGÉLATION

1. MÉTHODE

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

1.1. INTRODUCTION

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

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

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

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

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

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

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

Conversion des unités (K en °C)

$t = T - 273{,}15$

t: température Celsius en degrés Celsius (°C)

T: température thermodynamique en Kelvin (K)

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

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

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

▼B

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

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

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

1.4.1. **Méthode du tube capillaire**

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

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

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

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

1.4.1.3. *Détection photo-électrique*

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

1.4.2. **Méthodes avec bloc chauffant**

1.4.2.1. *Méthode au banc chauffant de Kofler*

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

▼B

1.4.2.2. *Microscope à fusion*

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

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

1.4.2.3. *Méthode du ménisque*

Cette méthode s'applique spécialement aux polyamides.

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

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

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

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

1.4.4. **Analyse thermique**

1.4.4.1. *Analyse thermique différentielle (ATD)*

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

▼B

1.4.4.2. *Analyse calorimétrique différentielle (ACD)*

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

1.4.5. **Point d'écoulement**

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

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

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

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

TABLEAU: APPLICABILITÉ DES MÉTHODES

A. **Méthodes du tube capillaire**

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

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

▼B

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

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

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

C. **Analyses thermiques**

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

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

D. **Point d'écoulement**

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

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

1.6. DESCRIPTION DES MÉTHODES

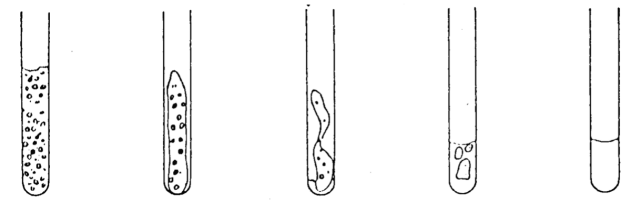
Les procédures de presque toutes les méthodes d'essai ont été décrites dans des normes internationales et nationales (voir annexe 1).

1.6.1. **Méthodes en tube capillaire**

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

▼B

Figure 1



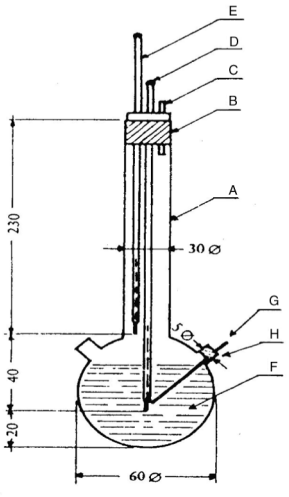
Stade A	(début de la fusion) : de fines gouttes adhèrent uniformément à la paroi intérieure du tube capillaire.
Stade B	un espace apparaît entre l'échantillon et la paroi intérieure, en raison de la rétraction du produit en fusion.
Stade C	l'échantillon rétracté commence à s'affaisser et à se liquéfier.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

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

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

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

Figure 2



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

▼B

Bain liquide:

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

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

Thermomètre:

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

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

Procédé:

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

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

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

Calcul:

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

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

où

T = température de fusion corrigée, exprimée en K

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

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

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

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

Appareil:

L'appareil comprend:

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

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

▼B

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

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

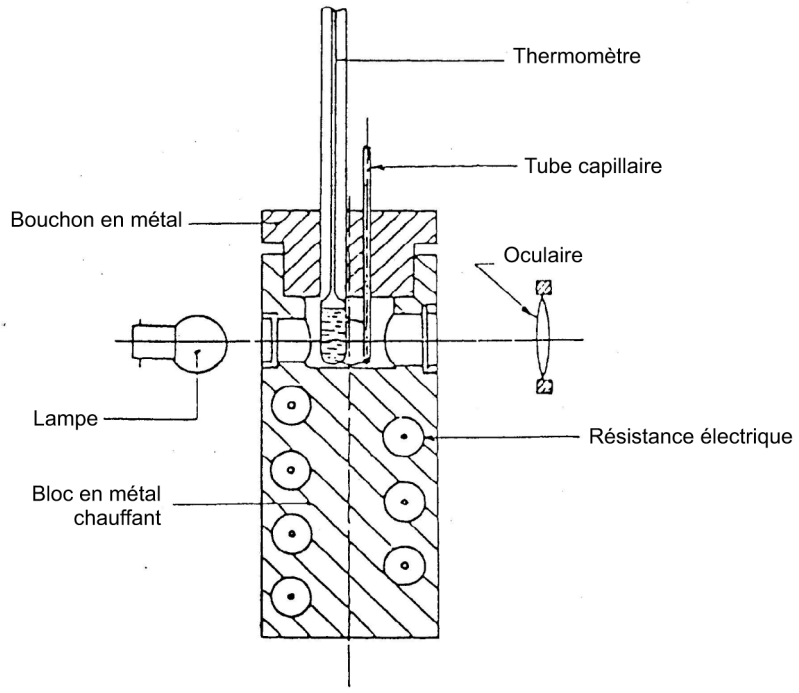
— quatre fenêtres en verre résistant à la chaleur, percées dans les parois latérales de l'enceinte, en position diamétralement opposée. Un oculaire permettant d'observer le tube capillaire est installé en face d'une de ces fenêtres. Les trois autres fenêtres permettent d'éclairer l'intérieur de l'enceinte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

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

Thermomètre:

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

Figure 3



1.6.1.3. *Détection photo-électrique*

Appareil et procédé:

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

▼B

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

1.6.2 **Méthode de la surface chauffée**

1.6.2.1 *Banc chauffant de Kofler*

Voir annexe.

1.6.2.2 *Microscope à fusion*

Voir annexe.

1.6.2.3 *Méthode du ménisque (polyamides)*

Voir annexe.

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

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

Voir annexe.

1.6.4. **Analyses thermiques**

1.6.4.1. *Analyse thermique différentielle*

Voir annexe

1.6.4.2. *Analyse calorimétrique différentielle*

Voir annexe.

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

Voir annexe.

2. **DONNÉES**

La correction du thermomètre s'impose dans certains cas.

3. **PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

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

— la méthode utilisée,

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

— une estimation de la précision.

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

▼B

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

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

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

4. **RÉFÉRENCES**

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

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

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

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

▼B

Annexe

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

1. **Méthodes du tube capillaire**

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

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

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

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of «melting point»

2. **Méthodes du bloc chauffant**

2.1. Banc chauffant de Kofler

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

2.2. Microscope à fusion

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von reilkristallinen Kunsrstoffen.

2.3. Méthode du ménisque (polyamides)

ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of «melting point»

▼B

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

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

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

4. **Analyse thermique**

4.1. Analyse thermique différentielle

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

▼B

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

4.2. Analyse calorimétrique différentielle

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

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

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

▼B

A.2. TEMPÉRATURE D'ÉBULLITION

1. MÉTHODES

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

1.1. INTRODUCTION

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

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

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

Observations:

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

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

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

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

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

où:

p = pression de vapeur de la substance exprimée en pascal

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

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

T = température thermodynamique exprimée en K

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

▼B

Conversions

Pression (unité: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

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

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

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

1 atm = atmosphère standard = 101,325 Pa

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

Température (unité: K)

$t = T - 273{,}15$

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

T: température thermodynamique, exprimée en kelvin (K)

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

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

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

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

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

1.4.1. **Méthode de l'ébulliomètre**

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

1.4.2. **Méthode dynamique**

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

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

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

▼B

1.4.4. **Méthode selon Siwoloboff**

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

1.4.5. **Détection photoélectrique**

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

1.4.6. **Analyse thermique différentielle**

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

1.4.7. **Analyse calorimétrique différentielle**

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

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

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

Tableau 1

Comparaison des méthodes

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

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

▼B

1.6. DESCRIPTION DES MÉTHODES

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

1.6.1. **Ébulliomètre**

Voir annexe.

1.6.2. **Méthode dynamique**

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

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

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

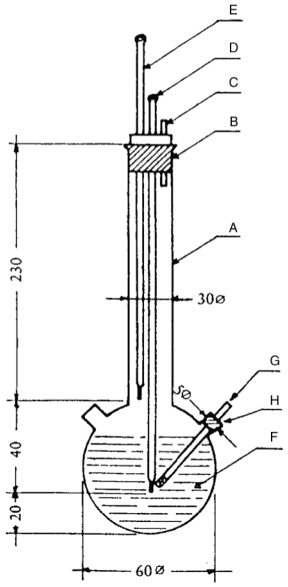
Voir annexe.

1.6.4. **Méthode selon Siwoloboff**

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

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

Figure 1



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

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

▼B

Figure 2

Méthode selon Siwoloboff

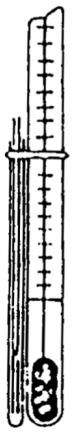
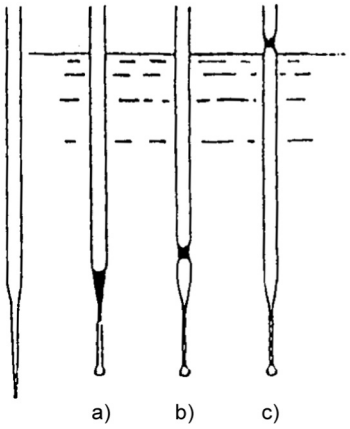


Figure 3

Méthode modifiée



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

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

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

1.6.5. **Détection photoélectrique**

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

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

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

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

▼B

1.6.6. **Analyse thermique**

1.6.6.1. *Analyse thermique différentielle*

Voir annexe.

1.6.6.2. *Analyse calorimétrique différentielle*

Voir annexe.

2. **DONNÉES**

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

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

où:

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

p = pression barométrique en kPa

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

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

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

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

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

Tableau 2

Facteurs de correction de la température (f_T)

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

▼B

3. **RÉSULTATS**

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

— la méthode utilisée,

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

— une estimation de la précision.

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

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

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

4. **RÉFÉRENCES**

(1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice nº 103, décision du Conseil C(81) 30 final.

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

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

▼B

Annexe

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

1. **Ébulliomètre**

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

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

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

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

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

▼B

A.3. DENSITÉ RELATIVE

1. MÉTHODE

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

1.1. INTRODUCTION

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

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

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

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

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

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE (1) (3)

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

1.4. PRINCIPE DES MÉTHODES

Quatre types de méthodes sont utilisés.

1.4.1. **Méthodes de flottabilité**

1.4.1.1 *Aréomètre* (pour les liquides)

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

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

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

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

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

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

▼B

1.4.2. **Méthodes pycnométriques**

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

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

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

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

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

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

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

1.6. DESCRIPTION DES MÉTHODES

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

Les mesures doivent être réalisées à 20 °C, et au moins en double.

2. **DONNÉES**

Voir normes.

3. **RÉSULTATS**

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

— la méthode utilisée,

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

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

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

▼B

Tableau

Applicabilité des méthodes

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

4. **RÉFÉRENCES**

(1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice nº 109, décision du Conseil C(81) 30 final.

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

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

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

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

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

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

▼B

Annexe

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

1. **Méthodes de flottabilité**

1.1. Aréomètre

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

1.2. Balance hydrostatique

Pour les substances solides

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

Pour les substances liquides

ISO 901	ISO 758

▼B

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

1.3. Méthode du corps immergé

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

2. **Méthodes pycnométriques**

2.1. Pour les substances liquides

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

▼B

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

▼B

2.2. Pour les substances solides

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

3. **Pycnomètre de comparaison à air**

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

▼M1

A.4. PRESSION DE VAPEUR

1. MÉTHODE

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

1.1. INTRODUCTION

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

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

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

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

Tableau 1

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

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

1.3. PRINCIPE DE L'ESSAI

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

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

où:

p = pression de vapeur de la substance en pascals

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

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

T = température exprimée en kelvins (K)

▼**M1**

1.4. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

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

1.5. DESCRIPTION DES MÉTHODES

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

1.5.1.1. *Principe*

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

Figure 1

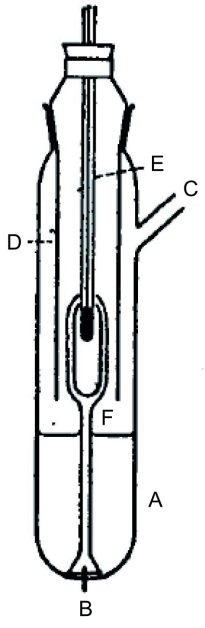
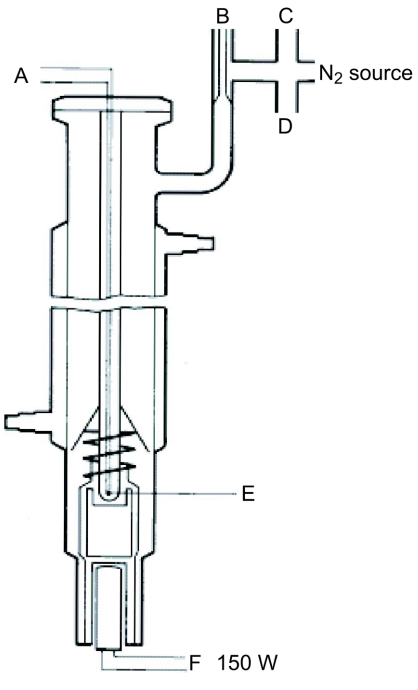


Figure 2



▼**M1**

Pompe de Cottrell (4)

A: thermocouple

B: volume vide tampon

C: jauge de pression

D: vide

E: point de mesure

F: élément chauffant (puissance environ 150 W)

1.5.1.2. *Appareillage*

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

1.5.1.3. *Mode opératoire*

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

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

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

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

1.5.2. **Méthode statique**

1.5.2.1. *Principe*

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

▼**M1**

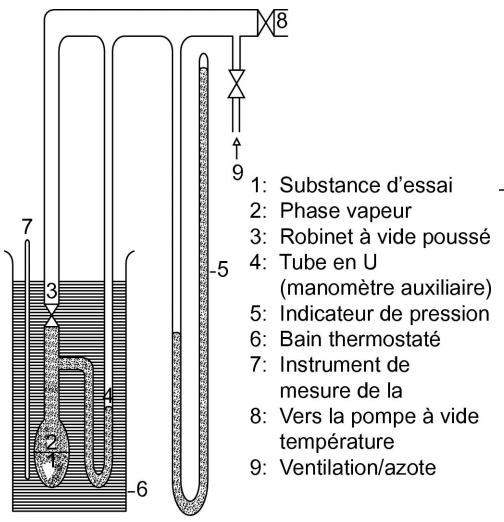
1.5.2.2. *Appareillage*

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

1.5.2.3. *Mode opératoire*

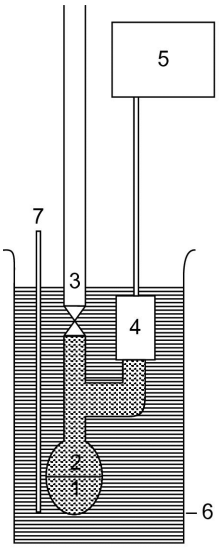
Le tube en U de l'appareil décrit à la figure 3a est rempli avec le liquide choisi, qui doit être dégazé à haute température avant que les mesures soient commencées. La substance d'essai est introduite dans l'appareil et dégazée à température réduite. Dans le cas d'un échantillon à plusieurs composants,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

Figure 3a



1: Substance d'essai
2: Phase vapeur
3: Robinet à vide poussé
4: Tube en U (manomètre auxiliaire)
5: Indicateur de pression
6: Bain thermostaté
7: Instrument de mesure de la température
8: Vers la pompe à vide
9: Ventilation/azote

Figure 3b



1: Substance d'essai
2: Phase vapeur
3: Robinet à vide poussé
4: Jauge de pression
5: Indicateur de pression
6: Bain thermostaté
7: Instrument de mesure de la température

▼**M1**

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

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

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

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

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

1.5.3. **Méthode de l'isoténiscope**

1.5.3.1. *Principe*

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

1.5.3.2. *Appareillage*

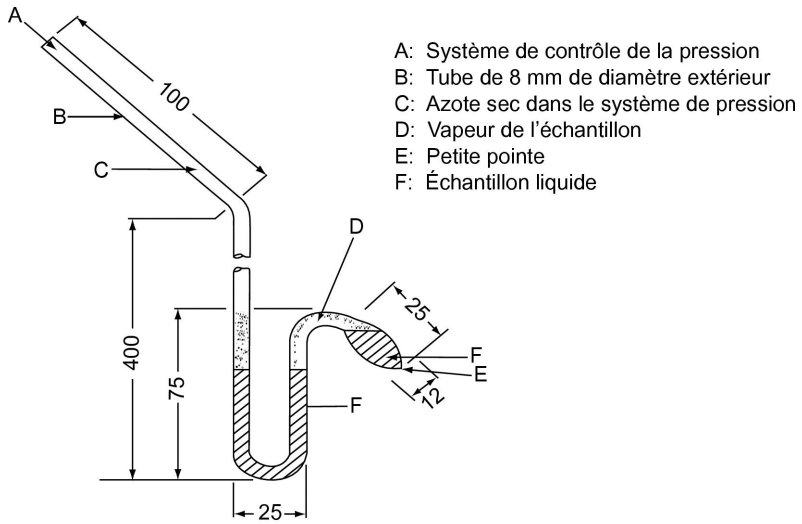
Un exemple de dispositif de mesure est donné à la figure 4. Pour la description complète, voir la norme ASTM D 2879-86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3. *Mode opératoire*

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

Figure 4



(dimensions en mm)

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

▼M1

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

1.5.4.1. *Principe*

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

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

où:

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

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

T = température (K)

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

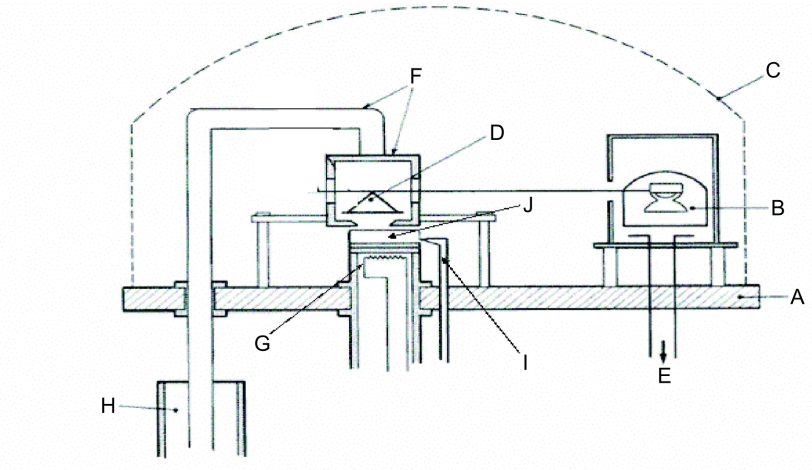
p = pression de vapeur (Pa)

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

1.5.4.2. *Appareillage*

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

Figure 5



A. Socle

B. Instrument à bobine mobile

C. Cloche à vide

D. Balance avec plateau

E. Instrument de mesure du vide

F. Enceinte de réfrigération et barre de refroidissement

G. Fourneau d'évaporation

H. Vase de Dewar contenant de l'azote liquide

I. Mesure de la température de l'échantillon

J. Substance d'essai

▼M1

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

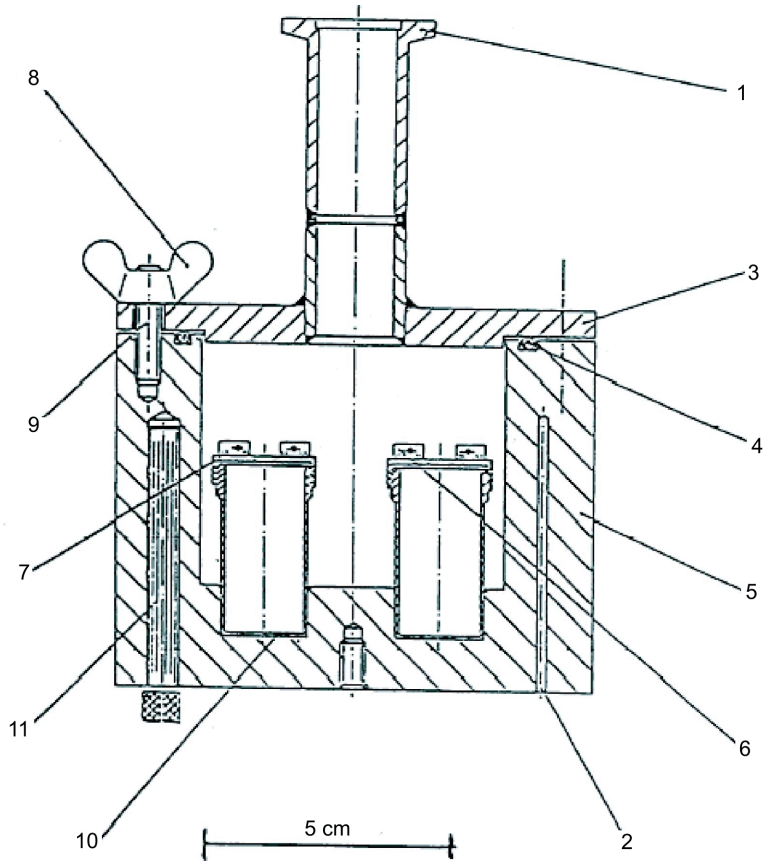
1.5.5.1. *Principe*

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

1.5.5.2. *Appareillage*

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

Figure 6



1: Vers la pompe à vide

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

3: Couvercle de la chambre à vide

4: Joint torique

5: Chambre à vide en aluminium

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

7: Couvercle fileté

8: Écrous papillon

9: Boulons

10: Cellules à effusion en acier inoxydable

11: Cartouches chauffantes

▼**M1**

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

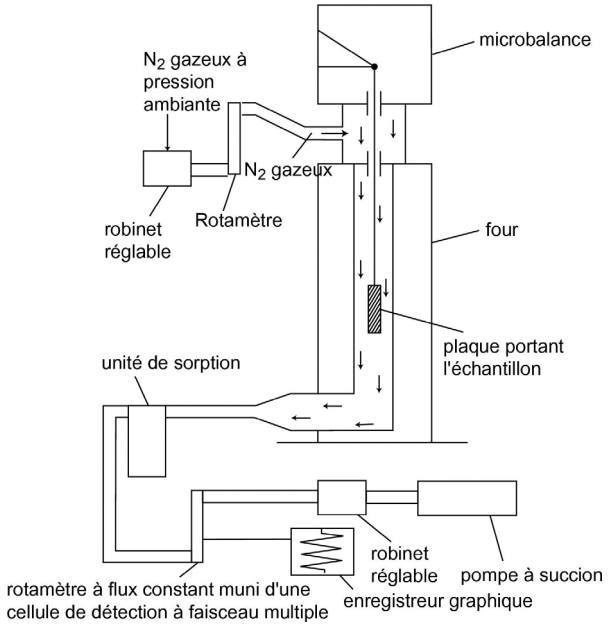
1.5.6.1. *Principe*

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

1.5.6.2. *Appareillage*

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

Figure 7



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

1.5.6.3. *Mode opératoire*

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

▼M1

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

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t}\left(\mathrm{gcm^{-2}h^{-1}}\right)$$

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5.7.1. *Principe*

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

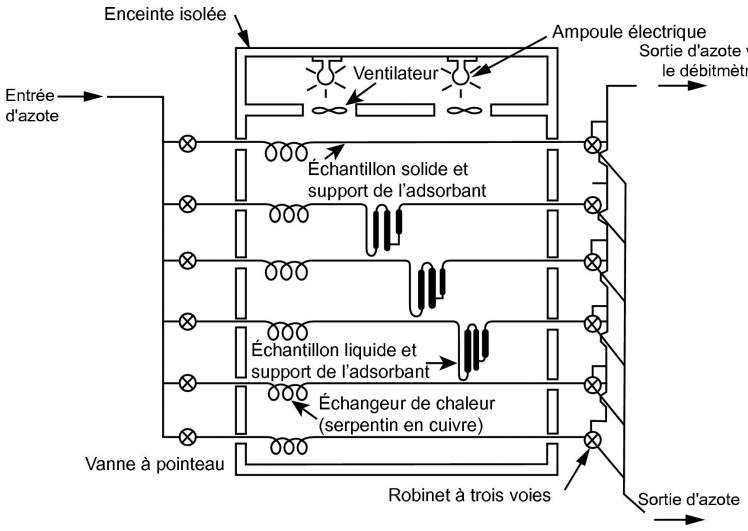
La méthode par saturation de gaz est applicable aux substances solides ou liquides. Cette méthode peut être utilisée jusqu'à des pressions de vapeur de 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14); elle est surtout fiable pour des pressions de vapeur inférieures à 10^3 Pa. Au-dessus de 10^3 Pa, les pressions de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

1.5.7.2. *Appareillage*

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

▼**M1**

Figure 8



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

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

Figure 9

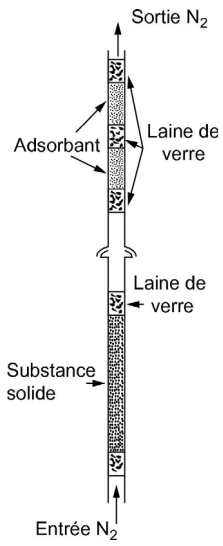
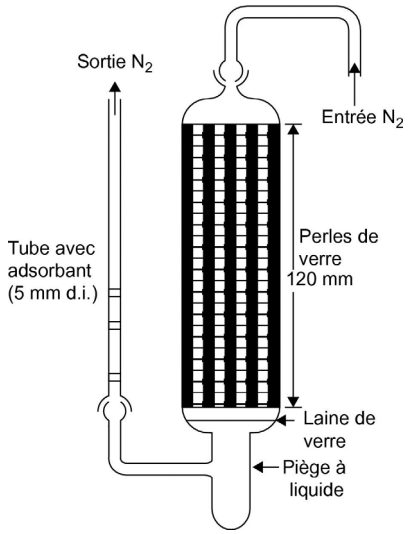


Figure 10



▼**M1**

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

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

1.5.7.3. *Mode opératoire*

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

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

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

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

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

où:

p = pression de vapeur (Pa)

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

V = volume de gaz saturé (m^3)

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

T = température (K)

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

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

▼M1

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

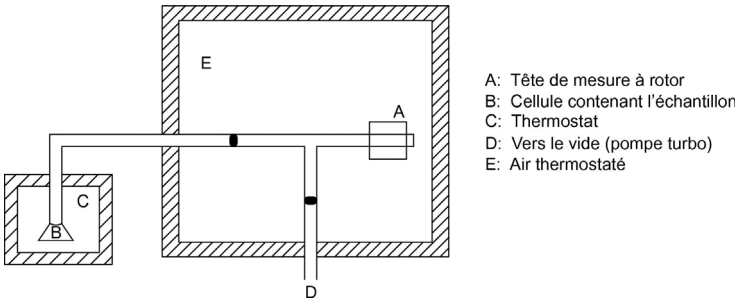
1.5.8.1. *Principe*

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

1.5.8.2. *Appareillage*

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

Figure 11



2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1. RÉSULTATS

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

2.2. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit comprendre les informations suivantes:

— méthode utilisée,

▼**M1**

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

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

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

— toutes les données brutes,

— courbe de log p en fonction de 1/T,

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

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

— nature du changement,

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

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

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

3. **BIBLIOGRAPHIE**

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

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

▼**M1**

Appendice

Méthode d'estimation

INTRODUCTION

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

— choisir la méthode expérimentale appropriée,

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

MÉTHODE D'ESTIMATION

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

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

PROCÉDURE DE CALCUL

La pression de vapeur se calcule de la façon suivante:

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

où:

T = température choisie

T_b = point d'ébullition normal

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

ΔH_{vb} = la chaleur de vaporisation

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

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

De plus,

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

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

▼**M1**

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

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

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

RAPPORT

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

BIBLIOGRAPHIE

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

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

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

▼B

A.5. TENSION SUPERFICIELLE

1. MÉTHODE

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

1.1. INTRODUCTION

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

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

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

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

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

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

La tension surperficielle s'exprime en:

N/m (en unités SI) ou

mN/M (en sous-unités SI)

1 N/m = 10^3 dynes/cm

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

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉFENCE

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

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

1.4. PRINCIPE DES MÉTHODES

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

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

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

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

▼B

1.6. DESCRIPTION DES MÉTHODES

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

1.6.1. **Méthode de la plaque**

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

1.6.2. **Méthode de l'étrier**

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

1.6.3. **Méthode de l'anneau**

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

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

1.6.4.1. *Appareil*

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

— un porte-échantillon mobile,

— un dynamomètre,

— un corps de mesure (anneau),

— un récipient de mesure.

1.6.4.1.1. Porte-échantillon mobile

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

1.6.4.1.2. Dynamomètre

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

▼B

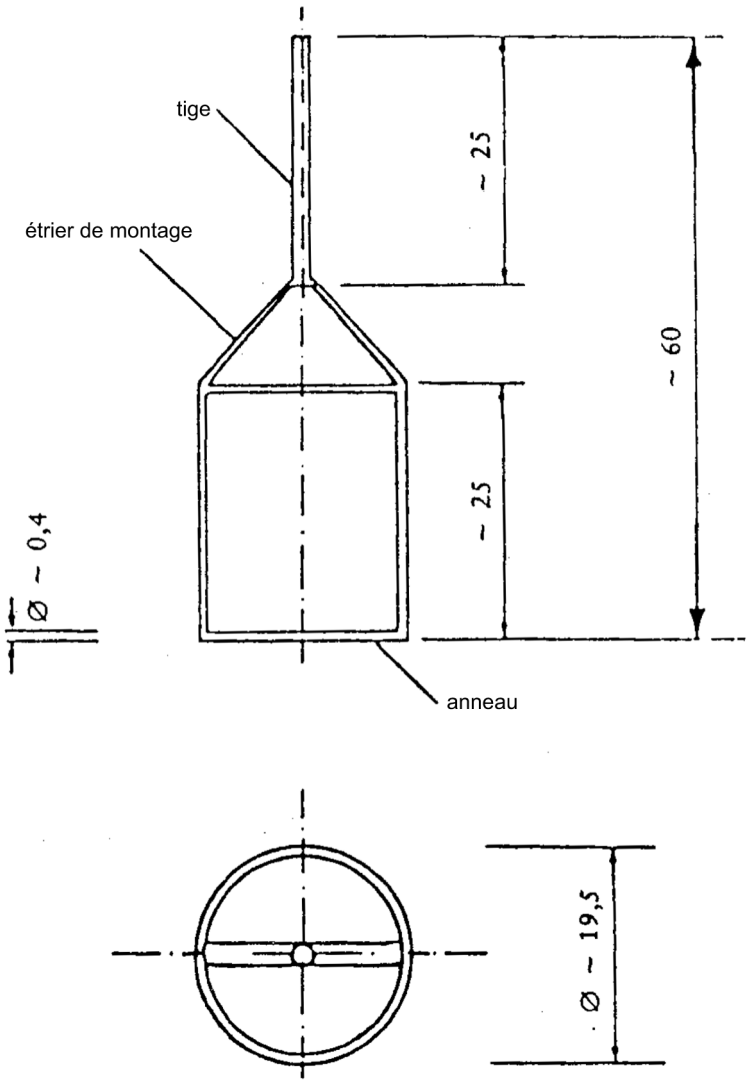
1.6.4.1.3. Corps de mesure (anneau)

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

Figure

Corps de mesure

(toutes les dimensions sont exprimées en millimètres)



1.6.4.1.4. Récipient de mesure

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

▼B

1.6.4.2. *Préparation de l'appareil*

1.6.4.2.1. Nettoyage

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

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

Note:

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

1.6.4.2.2. Étalonnage de l'appareil

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

Montage:

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

Réglage du point zéro:

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

Étalonnage:

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

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

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

où

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

m = masse du cavalier (g)

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

b = circonférence moyenne de l'anneau (cm)

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

▼B

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

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

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

où:

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

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

1.6.4.3. *Préparation des échantillons*

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

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

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

1.6.5. **Conditions de l'essai**

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

1.6.6. **Déroulement de l'essai**

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

▼B

2. **DONNÉES**

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

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

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

Tableau

Correction des valeurs mesurées de la tension superficielle

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

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

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

▼B

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

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

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

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

où

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

R = le rayon de l'anneau

f = le facteur de correction (1)

3. **RÉSULTATS**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

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

— méthode utilisée,

— le type d'eau ou de solution utilisé,

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

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

▼B

— la concentration de la solution,

— la température de l'essai,

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

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

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

3.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

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

4. **RÉFÉFENCES**

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

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

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

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

▼M4

A.6. **SOLUBILITÉ DANS L'EAU**

INTRODUCTION

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

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

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

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

DÉFINITIONS ET UNITÉS

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

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

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

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

DESCRIPTION DES MÉTHODES

Conditions de l'essai

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

Essai préliminaire

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

▼M4

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

Tableau 1

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

Méthode par élution sur colonne

Principe

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

Appareillage

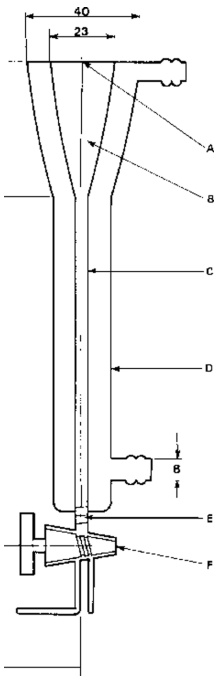
10. L'appareil se compose d'une microcolonne (figure 1) thermostatée, reliée soit à une pompe de recirculation (figure 2), soit à un réservoir de remise à niveau (figure 3). La microcolonne contient un support inerte maintenu en place par un petit tampon de laine de verre, qui sert aussi à filtrer les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

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

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

▼**M4**

Figure 1



Dimensions en mm

A. Raccordement pour joint en verre rodé

B. Volume tampon

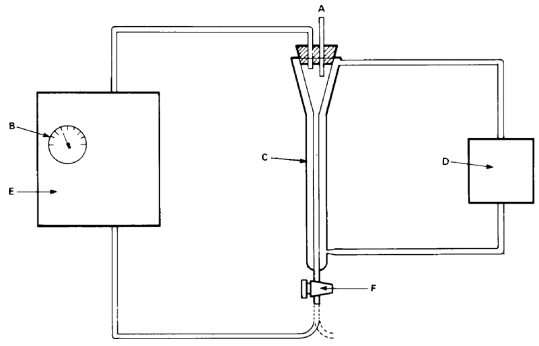
C. Diamètre intérieur 5

D. Diamètre extérieur 19

E. Tampon en laine de verre

F. Robinet d'arrêt

Figure 2



A. Équilibrage atmosphérique

B. Débitmètre

C. Microcolonne

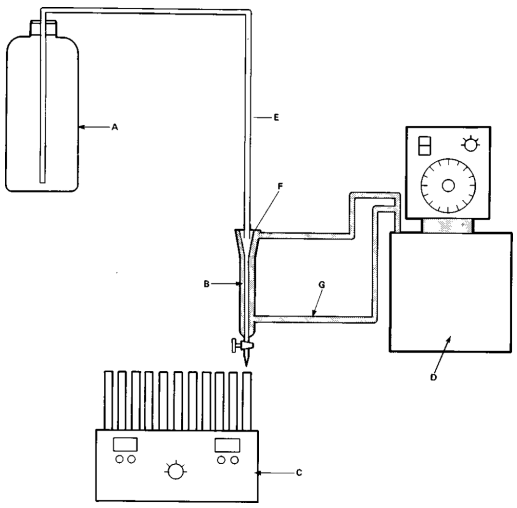
D. Pompe de circulation thermostatée

E. Pompe de recirculation

F. Robinet à deux voies pour l'échantillonnage

▼M4

Figure 3



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

B. Colonne

C. Collecteur de fractions

D. Thermostat

E. Tuyau en téflon

F. Joint en verre rodé

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

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

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

Méthode avec une pompe de recirculation

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

▼M4

Méthode avec réservoir de remise à niveau

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

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

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

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

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

Méthode du flacon

Principe

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

Appareillage

22. Le matériel suivant est requis:

— verrerie et instruments courants de laboratoire,

— dispositif pour agiter les solutions à température constante,

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

— équipement d'analyse.

Mode opératoire

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

▼M4

le contenu du récipient à la température de l'essai et déterminer, par une méthode analytique idoine, la concentration de la substance dans la phase aqueuse limpide. Les deux autres flacons sont traités de la même manière après avoir été équilibrés à 30 °C pendant deux et trois jours respectivement. Si les concentrations mesurées au moins dans les deux derniers flacons ne diffèrent pas de plus de 15 %, l'essai est satisfaisant. Si les résultats obtenus avec les flacons 1, 2 et 3 tendent à croître, il est nécessaire de refaire tout l'essai en appliquant des temps d'équilibrage plus longs.

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

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

Déterminations analytiques

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

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

Méthode par élution sur colonne

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

Méthode du flacon

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

Rapport d'essai

Méthode par élution sur colonne

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

— résultats de l'essai préliminaire,

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

— concentration, débit et pH pour chaque échantillon,

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

— moyenne d'au moins deux essais successifs,

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

— méthode d'analyse,

— nature du matériau du support,

— chargement du support,

— solvant utilisé,

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

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

▼**M4**

Méthode du flacon

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

— résultats de l'essai préliminaire,

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

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

— pH de chaque échantillon,

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

— température de l'essai,

— méthode d'analyse,

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

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

BIBLIOGRAPHIE:

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

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

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

▼B

A.8. COEFFICIENT DE PARTAGE

1. MÉTHODE

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

1.1. INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

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

$$P_{ow} = \frac{c_{n-octanol}}{c_{eau}}$$

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

▼B

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Méthode par agitation en flacon

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

Méthode de HPLC

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

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

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

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

1.4.1. **Méthode par agitation en flacon**

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

1.4.2. **Méthode de HPLC**

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

▼B

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

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

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

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.5.1. **Répétabilité**

Méthode par agitation en flacon

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

Méthode de HPLC

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

1.5.2. **Sensibilité**

Méthode par agitation en flacon

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

Méthode de HPLC

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

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

▼B

1.5.3. **Spécificité**

Méthode par agitation en flacon

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

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

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

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

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

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

1.6.2. **Méthode par agitation en flacon**

1.6.2.1. *Préparation*

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

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

Note:

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

1.6.2.1.1. Présaturation des solvants

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

▼B

1.6.2.1.2. Préparation de l'essai

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

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

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

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

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

1.6.2.1.3. Substance à étudier

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

1.6.2.2. *Conditions de l'essai*

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

1.6.2.3. *Mesure*

1.6.2.3.1. Établissement de l'équilibre de partage

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

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

1.6.2.3.2. Séparation des phases

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

▼B

1.6.2.4. *Analyse*

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

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

— méthodes photométriques,

— chromatographie en phase gazeuse,

— chromatographie en phase liquide haute performance.

1.6.3. **Méthode HPLC**

1.6.3.1. *Préparation*

Appareil

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

Phase mobile

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

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

▼B

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

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

Solutés

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

Conditions de l'essai

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

1.6.3.2. ***Mesure***

Calcul du temps mort t_0

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

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

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

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

▼B

Courbe d'étalonnage

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

Détermination du facteur de capacité de la substance à tester

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

2. **DONNÉES**

Méthode par agitation en flacon

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

3. **RÉSULTATS**

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

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

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

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

Pour la méthode par agitation en flacon:

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

— la température à laquelle est effectuée la détermination,

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

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

▼B

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

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

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

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

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

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

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

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

Pour la méthode par HPLC:

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

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

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

— le pH auquel sont effectuées les déterminations,

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

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

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

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

— une description du matériel et des conditions expérimentales,

— les profils d'élution,

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

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

▼B

4. **RÉFÉRENCES**

(1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice nº 107, décision du Conseil C(81) 30 final.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

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

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

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

▼B

Annexe

METHODES DE CALCUL/ESTIMATION

INTRODUCTION

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

Les valeurs calculées du P_{ow} peuvent servir:

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

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

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

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

MÉTHODES D'ESTIMATION

Estimation préliminaire du coefficient de partage.

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

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

MÉTHODES DE CALCUL

Principe des méthodes de calcul

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

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

Critères de qualité

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

▼B

Calcul

Méthode π de Hansch

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

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

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

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

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

Méthode de Rekker

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

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

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

Méthode de Hansch-Leo

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

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

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

Méthode mixte

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

Observations

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

▼B

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

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

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

Procès-verbal

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

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

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

— description de la méthode de calcul,

— identification ou base de données,

— particularités du choix des fragments,

— documentation détaillée du calcul.

RÉFÉRENCES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

Annexe II

Substances de référence recommandées pour la méthode HPLC

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

▼B

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

▼B

A.9. POINT D'ÉCLAIR

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

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

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

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

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

Unités: °C

$t = T - 273{,}15$

(t est exprimé en °C et T en K)

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

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

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

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

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.5.1. **Répétabilité**

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

1.5.2. **Sensibilité**

La sensibilité dépend de la méthode d'essai utilisée.

1.5.3. **Spécificité**

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

▼B

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Préparation**

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

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

1.6.2. **Conditions d'essai**

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

1.6.3. **Mode opératoire**

1.6.3.1. *Méthode de l'équilibre*

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

1.6.3.2. *Méthode du non-équilibre*

Appareil d'Abel:

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

Appareil d'Abel-Pensky:

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

Appareil Tag:

Voir norme ASTM D 56.

Appareil de Pensky-Martens:

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

Observations:

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

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

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

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

▼B

2. **DONNÉES**

3. **RÉSULTATS**

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

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

— la méthode utilisée ainsi que toute variante éventuelle,

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

4. **RÉFÉRENCES**

Aucune.

▼B

A.10. **INFLAMMABILITÉ (SOLIDES)**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

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

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

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

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

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Le temps de combustion est exprimé en secondes.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Non spécifiées.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

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

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Non établis.

▼B

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Essai préliminaire**

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

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

1.6.2.1. *Préparation*

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

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

1.6.2.2. *Conditions d'essai*

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

1.6.2.3. *Mode opératoire*

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

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

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

▼B

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

2. **DONNÉES**

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

3. **RÉSULTATS**

3.1. PROCÈS-VERBAL

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

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

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

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

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

3.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

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

4. **RÉFÉRENCES**

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

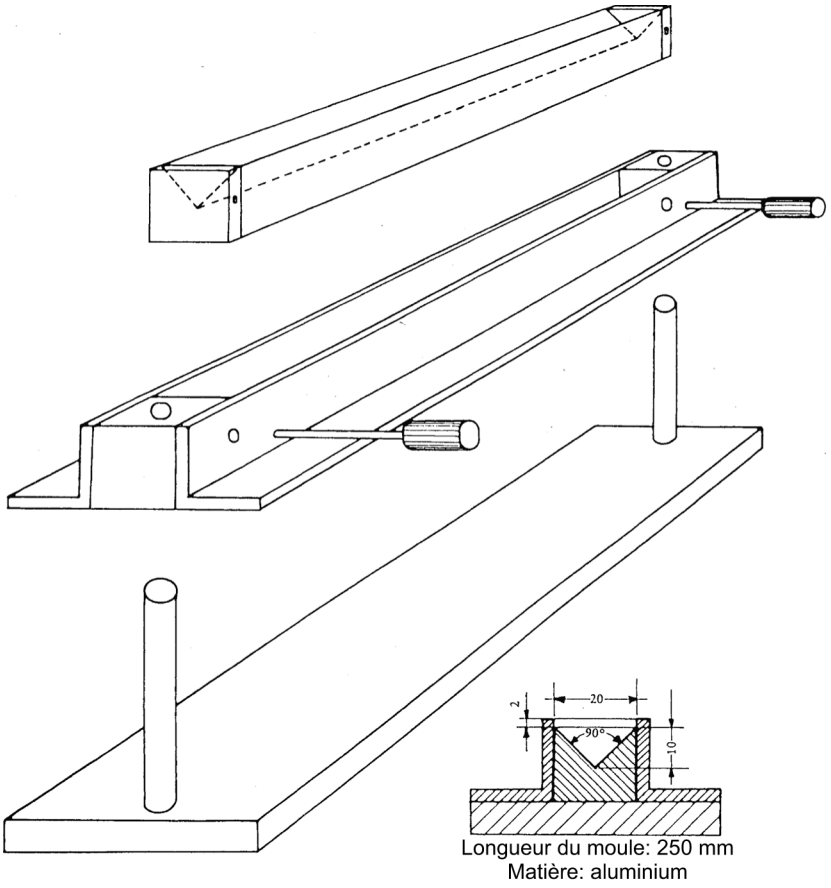
▼B

Annexe

Figure

Moule et accessoires nécessaires à la confection des tas

(toutes les dimensions sont exprimées en millimètres)



▼B

A.11. INFLAMMABILITÉ (GAZ)

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

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

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

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

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Non spécifiée.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

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

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Non fixés.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Appareil**

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

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

1.6.2. **Conditions d'essai**

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

▼B

1.6.3. **Mode opératoire**

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

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

2. **DONNÉES**

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

3. **RÉSULTATS**

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

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

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

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

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

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

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

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

4. **RÉFÉRENCES**

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

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

▼B

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

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

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

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

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

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

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

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

1.3.1. **Phase 1**

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

1.3.2. **Phase 2**

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

1.3.3. **Phase 3**

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

1.3.4. **Phase 4**

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

▼B

1.4. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Non spécifiée.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Non indiqués.

1.4. 1.6. DESCRIPTION DES MÉTHODES

1.6.1. **Phase 1**

1.6.1.1. *Conditions de l'essai*

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

1.6.1.2. *Mode opératoire*

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

1.6.2. **Phase 2**

1.6.2.1. *Appareil*

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

1.6.2.2. *Conditions de l'essai*

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

1.6.2.3. *Mode opératoire*

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

1.6.3. **Phase 3**

1.6.3.1. *Conditions de l'essai*

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

1.6.3.2. *Mode opératoire*

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

▼B

1.6.4. **Phase 4**

1.6.4.1. *Appareil*

L'appareil est monté comme indiqué sur la figure.

1.6.4.2. *Conditions de l'essai*

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

1.6.4.3. *Mode opératoire*

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

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

2. **DONNÉES**

La substance est considérée comme dangereuse si:

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

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

3. **RÉSULTATS**

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

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

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

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

▼B

— l'identité chimique du gaz qui se dégage,

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

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

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

4. **RÉFÉRENCES**

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

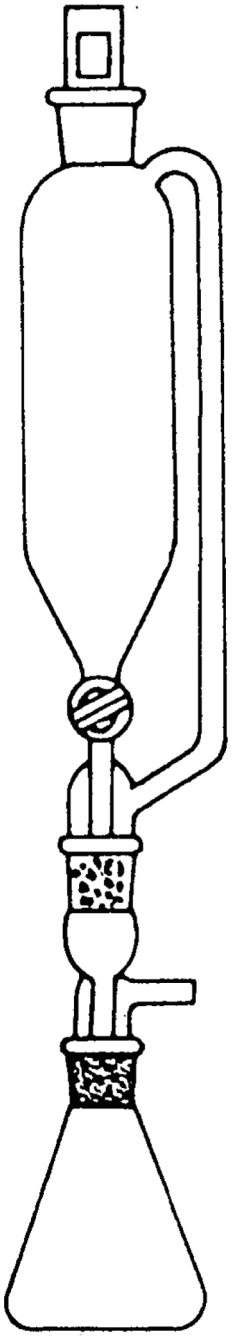
(2) NF T 20-040 (septembre 1985), Produits chimiques à usage industriel. Détermination de l'inflammabilité des gaz engendrés par hydrolyse des produits solides et liquides.

▼B

Annexe

Figure

Appareillage



▼B

A.13. PROPRIÉTÉS PYROPHORIQUES DES SOLIDES ET DES LIQUIDES

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

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

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

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

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

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

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Non spécifiées.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

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

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

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

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. **Appareillage**

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

Remarque:

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

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

▼B

1.6.2. **Réalisation de l'essai**

a) *Solides pulvérulents*

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

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

b) *Liquides*

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

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

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

2. **DONNÉES**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

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

2.2. ÉVALUATION

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

3. **RÉSULTATS**

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

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

— les résultats de l'essai,

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

4. **RÉFÉRENCES**

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

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

▼B

A.14. DANGER D'EXPLOSION

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

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

La méthode comprend trois parties:

a) un essai de sensibilité thermique (1),

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

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

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

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

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

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Substances explosibles:

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

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

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

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

▼B

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

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

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

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

1.4.2. **Sensibilité thermique**

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

1.4.3. **Sensibilité mécanique (choc)**

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

1.4.4. **Sensibilité mécanique (friction)**

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

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Non indiqués.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

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

1.6.1.1. *Appareil*

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

▼B

1.6.1.2. *Conditions de l'essai*

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

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

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

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

1.6.1.3. *Déroulement des essais*

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

▼B

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

1.6.1.4. *Évaluation*

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

1.6.2. **Sensibilité mécanique (choc)**

1.6.2.1. *Appareil (figure 4)*

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

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

1.6.2.2. *Conditions de l'essai*

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

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

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

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

▼B

1.6.2.3. *Déroulement des essais*

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

1.6.2.4. *Évaluation*

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

1.6.3. **Sensibilité mécanique (friction)**

1.6.3.1. *Appareil (figure 5)*

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

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

1.6.3.2. *Conditions de l'essai*

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

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

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

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

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

▼B

1.6.3.3. *Déroulement des essais*

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

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

1.6.3.4. *Évaluation*

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

2. **DONNÉES**

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

3. **RÉSULTATS**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

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

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

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

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

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

— les résultats de chaque type d'essai,

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

▼B

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

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

3.2. INTERPRÉTATION ET ÉVALUATION DES RÉSULTATS

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

4. **RÉFÉRENCES**

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

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

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

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

▼B

Annexe

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

(1) Tube: Spécification de matériel Nº 1.0336.505 g

(2) Plaque à orifice: Spécification de matériel Nº 1.4873

(3) Écrou et écrou borgne: Spécification de matériel Nº 1.3817

Figure 1

Appareil d'essai de sensibilité thermique

(dimensions en mm)

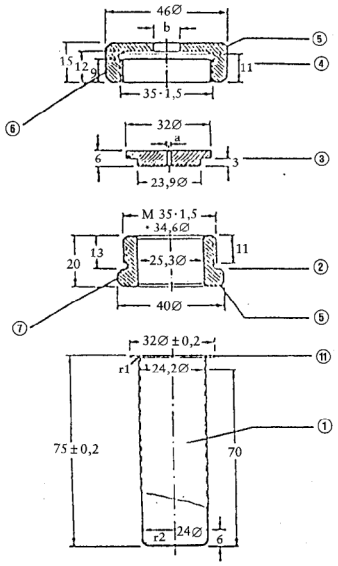


Fig. 1a Tube d'acier et accessoires

(1) tube
(1a) bride extérieure
(2) collier fileté; filetage à faible friction
(3) plaque à orifice a = 2,0 ou 6,0 mm de diamètre
(4) écrou b = 10 mm de diamètre
(5) chanfrein
(6) 2 pans pour clé de 41

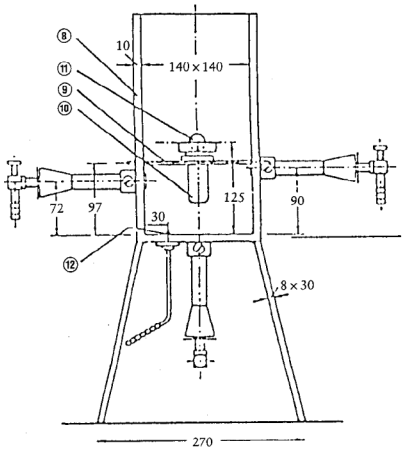


Fig. 1b Dispositifs de chauffage et de protection

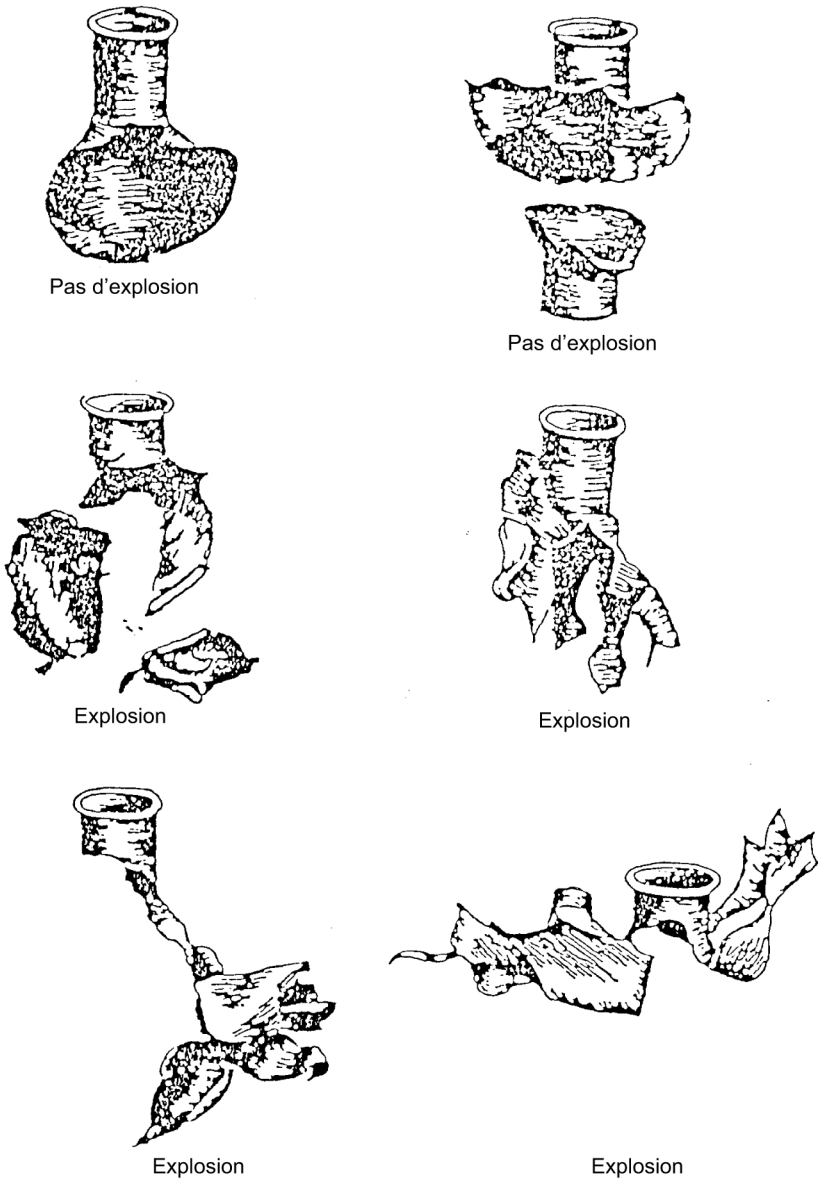
(7) 2 pans pour clé de 36
(8) enceinte résistante aux éclats
(9) 2 barres de support pour le tube
(10) tube assemblé
(11) position du brûleur arrière ; les autres brûleurs sont visibles
(12) veilleuse

▼B

Figure 2

Essai de sensibilité thermique

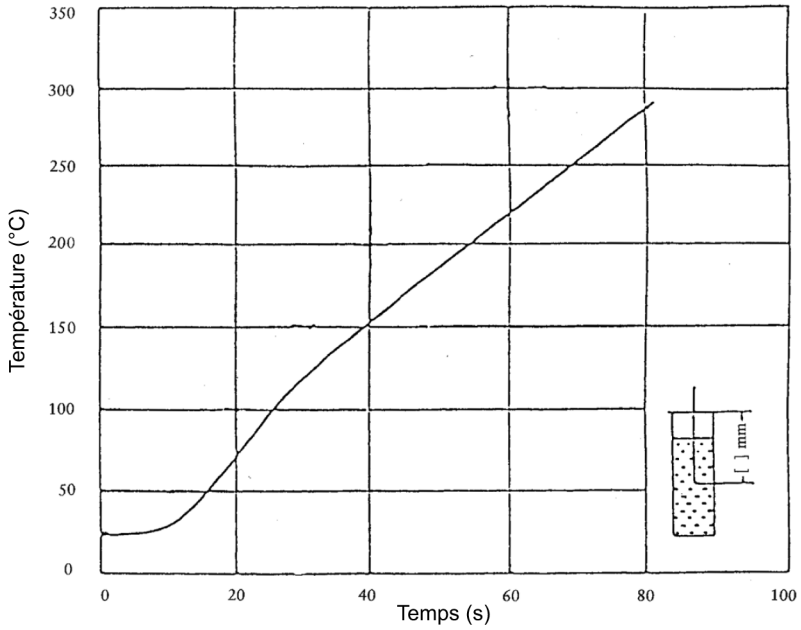
Exemples de fragmentation



▼B

Figure 3

Étalonnage de la vitesse d'échauffement pour essai de sensibilité thermique TEMPS (s)



Courbe de température en fonction du temps obtenue en chauffant du phtalate de dibutyle (27 cm^3) dans un tube fermé (plaque à orifice de 1,5 mm) au moyen d'un débit de propane de 3,2 litres/minute. La température est mesurée à l'aide d'un thermocouple chromel/alumel gainé d'acier inoxydable de 1 mm de diamètre, placé en position centrale, 43 mm sous le bord du tube. Entre 135 °C et 285 °C, la vitesse d'échauffement doit se situer entre 185 et 215 K/minute.

▼B

Figure 4

Appareil d'essai de sensibilité au choc

(dimensions en mm)

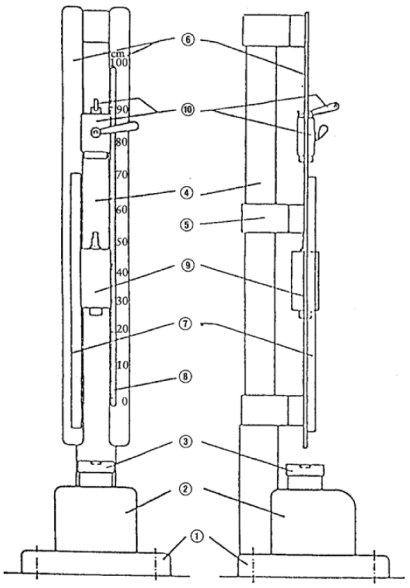


Fig. 4a Appareil à mouton, vue générale de face et latérale

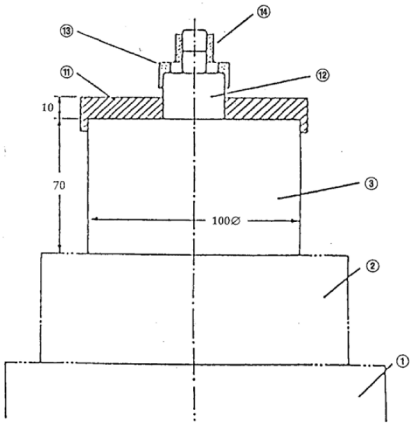


Fig. 4b Appareil à mouton partie inférieure

(1) embase 450 x 450 x 60
(2) bloc d'acier 230 x 250 x 200
(3) enclume 100 (diamètre) x 70
(4) colonne
(5) partie médiane transversale
(6) 2 rails
(7) crémaillère
(8) échelle graduée
(9) mouton (masse qui tombe)
(10) dispositif de support et de libération
(11) plaque de positionnement
(12) enclume intermédiaire 26 (diamètre) x 26
(13) bague de positionnement munie d'orifices
(14) dispositif d'impact

▼B

Figure 4

suite

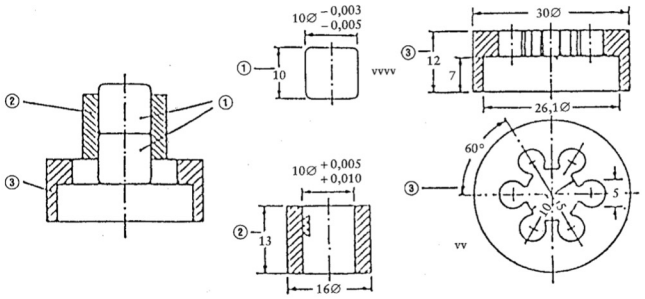
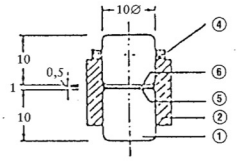


Fig. 4c Dispositif de choc pour les substances sous forme de poudres ou de pâtes

Fig. 4d Dispositif de choc pour les substances liquides



(1) cylindres d'acier
(2) anneau de guidage pour les cylindres d'acier
(3) bague de positionnement munie d'orifices
(a) section verticale
(b) plan
(4) anneau de caoutchouc
(5) substance liquide (40 mm^3)
(6) espace sans liquide

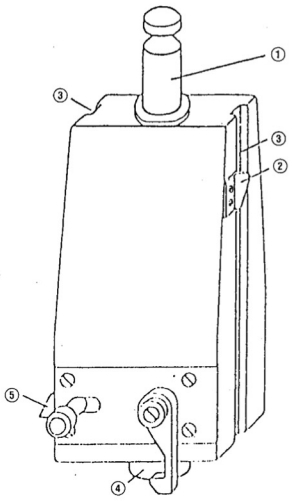


Fig. 4e Mouton (masse de 5 kg)

(1) ergot de suspension
(2) marqueur de hauteur
(3) sillon de positionnement
(4) tête d'impact cylindrique
(5) arrêt de rebond

▼B

Figure 5

Appareil d'essai de sensibilité à la friction

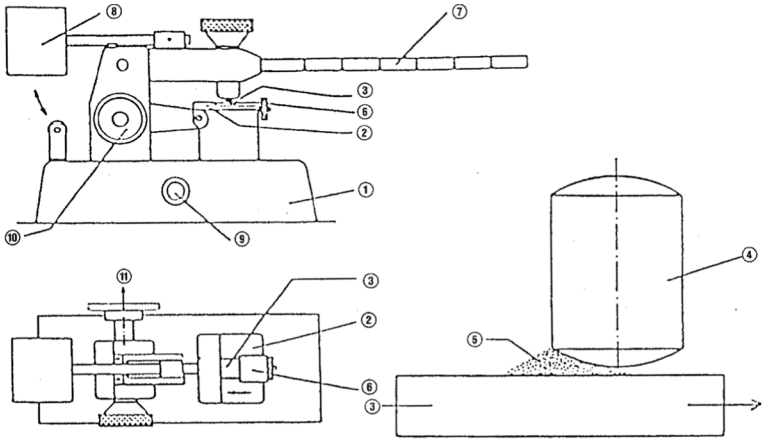


Fig. 5a Appareil de friction : vue de dessus et plane

(1) Embase d'acier
(2) Coulisseau mobile
(3) Plaquette de porcelaine 25 x 25 x 5 mm maintenue sur le coulisseau
(4) Crayon de porcelaine fixe 10 mm (diamètre) x 15 mm
(5) échantillon à essayer (10 mm^3 environ)

Fig. 5b Position de départ du crayon sur l'échantillon

(6) Support de crayon
(7) Bras de charge
(8) Contrepoids
(9) Interrupteur
(10) Roue permettant d'amener le coulisseau en position de départ
(11) Vers un moteur électrique

▼B

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

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Les substances explosives qui s'enflamment spontanément au contact de l'air à température ambiante ne doivent pas être soumises à cet essai. Le mode opératoire est applicable aux gaz, aux liquides et aux vapeurs qui peuvent être enflammés par une surface chaude, en présence d'air.

La température d'inflammation spontanée peut être réduite considérablement par la présence d'impuretés catalytiques, par la matière de la surface ou par une augmentation du volume du récipient d'essai.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Le degré d'inflammabilité spontanée est exprimé en termes de température d'inflammation spontanée. La température d'inflammation spontanée est la température la plus basse à laquelle s'enflamme la substance à essayer mélangée avec de l'air dans les conditions définies dans la méthode d'essai.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Les substances de références sont citées dans les normes (voir 1.6.3). Elles devraient servir en premier lieu à vérifier de temps à autre la fiabilité de la méthode et à permettre de comparer les résultats obtenus avec différentes méthodes.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La méthode permet de déterminer la température minimale de la surface interne d'une enceinte qui provoquera l'inflammation d'un gaz, d'une vapeur ou d'un liquide injecté dans l'enceinte.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

La répétabilité varie en fonction de l'intervalle de température d'inflammation spontanée et de la méthode d'essai utilisée.

La sensibilité et la spécificité dépendent de la méthode d'essai utilisée.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Appareil**

L'appareil est décrit dans la méthode évoquée au point 1.6.3.

1.6.2. **Conditions de l'essai**

Un échantillon de la substance à essayer est essayé selon le point 1.6.3.

1.6.3. **Mode opératoire**

Voir normes IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037.

▼B

2. **DONNÉES**

Noter la température d'essai, la pression atmosphérique, la quantité d'échantillon utilisée et le laps de temps qui s'écoule avant que l'inflammation se produise.

3. **RÉSULTATS**

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

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

— la quantité d'échantillon utilisée, la pression atmosphérique,

— l'appareil utilisé,

— les résultats des mesures (température d'essai, résultats concernant l'inflammation, laps de temps correspondants),

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

4. **RÉFÉRENCES**

Aucune.

▼B

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

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Les substances explosibles et les substances qui s'enflamment spontanément au contact de l'air à température ambiante ne doivent pas être soumises à cet essai.

L'objectif en est de fournir des données préliminaires sur l'inflammabilité spontanée des substances solides soumises à de hautes températures.

Si la chaleur engendrée, soit par une réaction de la substance avec l'oxygène, soit par décomposition exothermique, ne se dissipe pas assez rapidement dans l'environnement, l'auto-échauffement entraîne l'inflammation spontanée. L'inflammation spontanée se produit par conséquent lorsque la vitesse de production de chaleur excède la vitesse de perte de chaleur.

Le procédé d'essai est utile en tant que test préliminaire de sélection des substances solides. Compte tenu de la nature complexe de l'inflammation et de la combustion des solides, la température d'inflammation spontanée déterminée selon cette méthode d'essai ne doit servir qu'à des fins de comparaison.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

La température d'inflammation spontanée telle qu'elle est déterminée par cette méthode est la température ambiante minimale exprimée en degrés Celsius (^{o}C), à laquelle un certain volume d'une substance s'enflamme spontanément dans des conditions définies.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Placer un volume défini de la substance soumise à essai dans un four à température ambiante; enregistrer la courbe température/temps au centre de l'échantillon, la température du four étant portée à 400 ^{o}C, ou à la température du point de fusion si celle-ci est inférieure, à la vitesse de 0,5 ^{o}C/mn. Pour les besoins de cet essai, la température du four à laquelle l'échantillon atteint une température de 400 ^{o}C par auto-échauffement est appelée température d'inflammation spontanée.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Aucun.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Appareil**

1.6.1.1. *Four*

Un four de laboratoire à température programmable (d'un volume de 2 litres environ) équipé d'une circulation d'air naturel et d'un clapet d'explosion. Pour éviter tout risque potentiel d'explosion, il convient d'empêcher que les gaz de décomposition puissent entrer en contact avec les éléments de chauffage électrique.

▼B

1.6.1.2. *Cube en treillis de fil métallique*

Couper un morceau de treillis en fil d'acier inoxydable d'une maille d'une taille de 0,045 mm, selon le modèle indiqué à la figure 1. Plier le treillis et l'attacher avec du fil métallique en forme de cube ouvert.

1.6.1.3. *Thermocouples*

Thermocouples appropriés.

1.6.1.4. *Enregistreur*

Tout enregistreur à deux canaux, étalonné à l'intervalle 0 — 600 °C ou à une tension correspondante.

1.6.2. **Conditions de l'essai**

Les substances sont testées telles qu'elles sont reçues.

1.6.3. **Mode opératoire**

Remplir le cube de la substance soumise à essai. Tasser doucement en ajoutant de la substance jusqu'à le remplir complètement. Suspendre ensuite le cube au centre du four à température ambiante. Placer un thermocouple au centre du cube et l'autre entre le cube et la paroi du four afin d'enregistrer la température du four.

Les températures du four et de l'échantillon sont enregistrées en continu pendant que la température du four est portée à 400 °C, ou au point de fusion si cette valeur est plus basse, à une vitesse de 0,5 °C/min.

Lorsque la substance s'enflamme, le thermocouple de l'échantillon indiquera une très forte montée de température par rapport à la température du four.

2. **DONNÉES**

La température du four à laquelle la température de l'échantillon atteint 400 °C par auto-échauffement est pertinente pour l'évaluation (voir figure 2).

3. **RÉSULTATS**

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

— une description de la substance à essayer,

— les résultats des mesures incluant la courbe température/temps,

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

4. **RÉFÉRENCES**

(1) NF T 20-036 (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination de la température relative d'inflammation spontanée des solides.

▼B

Figure 1

Modèle de cube d'essai de 20 mm

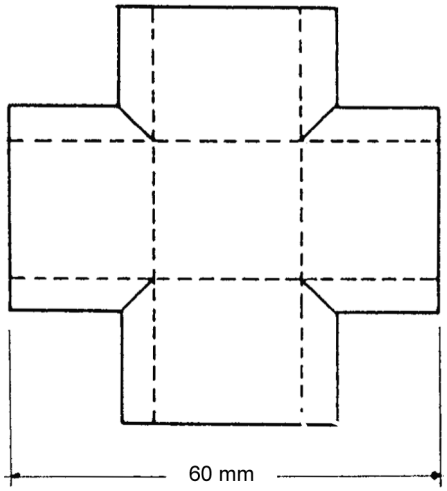
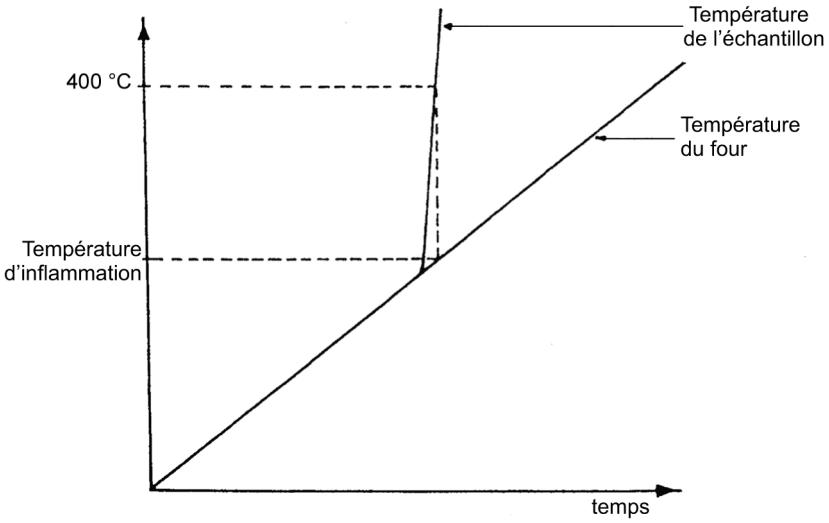


Figure 2

Courbe type température/temps



▼B

A.17. PROPRIÉTÉS COMBURANTES (SOLIDES)

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Il est utile de disposer d'informations préliminaires sur les propriétés explosives éventuelles de la substance avant d'effectuer cet essai.

Cet essai n'est pas applicable aux liquides, aux gaz, aux substances explosives ou très inflammables ou aux peroxydes organiques.

Cet essai est inadapté quand l'examen de la structure chimique montre que la substance ne peut sans aucun doute avoir de réaction de type exothermique avec un combustible.

Un essai préliminaire doit être effectué pour s'assurer que cet essai ne nécessite pas de précautions particulières.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Temps de combustion: temps de réaction, exprimé en secondes, pris par la zone de réaction pour se propager à travers un tas, selon la procédure décrite au point 1.6.

Vitesse de combustion: exprimée en millimètres par seconde.

Vitesse maximale de combustion: valeur la plus élevée parmi les vitesses de combustion obtenues avec des mélanges contenant 10 à 90 % en poids de comburant.

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Le nitrate de barium (de pureté analytique) est utilisé comme substance de référence pour l'essai et l'essai préliminaire.

Le mélange de référence est composé de nitrate de barium et de cellulose en poudre, préparé conformément au point 1.6 et possédant la vitesse de combustion maximale (il s'agit généralement d'un mélange contenant 60 % de nitrate de barium en poids).

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Il convient, pour des raisons de sécurité, d'effectuer un essai préliminaire. Il est inutile de continuer l'essai si l'essai préliminaire montre clairement que la substance a des propriétés oxydantes. Lorsque ce n'est pas le cas, la substance est soumise à l'essai complet.

Dans l'essai complet, la substance à essayer et une substance combustible définie sont mélangées dans des proportions variables. Chacun de ces mélanges est alors disposé en tas, que l'on enflamme à une extrémité. La vitesse maximale de combustion est comparée à la vitesse maximale de combustion du mélange de référence.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Lorsqu'elle est requise, toute méthode de broyage et de mélange est valable pour autant que l'écart entre la vitesse maximale de combustion et la moyenne arithmétique, dans les six essais, ne dépasse pas 10 %.

▼B

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Préparation**

1.6.1.1. *Substance à essayer*

L'échantillon à essayer est traité comme suit afin d'obtenir une granulométrie inférieure à 0,125 mm: tamiser la substance à essayer et broyer la fraction restante; répéter cette opération jusqu'à ce que tout l'échantillon soit passé au travers du tamis.

Toutes méthodes de broyage et de tamisage respectant les critères de qualité requis peuvent être utilisées.

Avant de préparer le mélange, sécher la substance à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant. Si la température de décomposition de la substance est inférieure à 105 °C, la substance doit être séchée à une température moins élevée.

1.6.1.2. *Substance combustible*

On utilise de la cellulose en poudre comme substance combustible. Elle doit être du type utilisé en chromatographie en couche mince ou en colonne. Un type de cellulose dont la longueur de plus de 85 % des fibres est comprise entre 0,020 mm et 0,075 mm s'est avérée adéquate. La poudre de cellulose est tamisée au moyen d'un tamis à mailles de 0,125 mm. Il faut utiliser le même lot de cellulose pour tout l'essai.

Avant de préparer le mélange, sécher la poudre de cellulose à 105 °C jusqu'à ce que son poids soit constant.

Si de la sciure de bois est utilisée lors de l'essai préliminaire, préparer une sciure de bois tendre qui passe au travers d'un tamis d'une maille de 1,6 mm, mélanger, puis sécher à 105 °C pendant 4 heures en couche de moins de 25 mm d'épaisseur. Refroidir la sciure et la conserver jusqu'à utilisation dans un récipient hermétique aussi rempli que possible. Elle sera de préférence utilisée dans les 24 heures après séchage.

1.6.1.3. *Source d'allumage*

Utiliser la flamme d'un brûleur à gaz (diamètre; 5 mm minimum). Si une autre source d'allumage est utilisée (par exemple lorsque l'essai est effectué dans une atmosphère inerte), fournir la description et la justification.

1.6.2. **Mode opératoire**

Note:

Les mélanges de comburants avec de la cellulose ou de la sciure de bois doivent être considérés comme des explosifs potentiels et manipulés avec prudence.

1.6.2.1. *Essai préliminaire*

La substance séchée est grossièrement mélangée à de la cellulose ou à de la sciure de bois sèche dans des proportions de 2 (substance à essayer) pour 1 (cellulose ou sciure de bois) en poids et le mélange est disposé en petit tas conique de 3,5 cm (diamètre de base) × 2,5 cm (hauteur) par remplissage sans tassement d'une forme conique (par exemple un entonnoir de laboratoire en verre dont le tube est bouché).

▼B

Le tas est placé sur une plaque froide, non-combustible, non poreuse, et peu thermo-conductrice. L'essai doit être conduit dans une hotte aspirante (voir point 1.6.2.2).

La source d'allumage est mise en contact avec le cône. L'intensité et la durée de la réaction sont observées et enregistrées.

La substance doit être considérée comme comburante si la réaction est intense.

Lorsqu'il y a doute quant au résultat, il est nécessaire de pratiquer l'essai complet décrit ci-après.

1.6.2.2. *Essai complet*

Préparer des mélanges oxydant/cellulose contenant de 10 à 90 % de comburant, en poids, par incréments de 10 %. Pour les cas limites utiliser des mélanges comburant/cellulose intermédiaires pour déterminer la vitesse maximale de combustion avec plus de précision.

On réalise un tas au moyen d'un moule métallique d'une longueur de 250 mm et dont la section triangulaire transversale a une hauteur intérieure de 10 mm et une largeur intérieure de 20 mm. Placer comme cadres latéraux des deux côtés du moule, dans le sens de la longueur, deux plaques métalliques dépassant de 2 mm le bord supérieur de la section triangulaire (figure). Remplir ce dispositif avec un excès de mélange, sans tasser. Après avoir laissé tomber le moule une fois d'une hauteur de 2 cm sur une surface dure, racler l'excès avec une raclette tenue obliquement. Enlever alors les cadres latéraux et égaliser la surface de la poudre à l'aide d'un rouleau. Disposer une plaque non-combustible non-poreuse et peu thermo-conductrice sur le moule, retourner et démouler.

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

Le débit d'air doit être suffisant pour empêcher les vapeurs de se répandre dans le laboratoire et il ne doit pas subir de modification au cours de l'essai. Le courant d'air doit former un écran entourant l'appareil.

Vu les propriétés hygroscopiques de la cellulose et de certaines substances à essayer, l'essai doit être effectué aussi rapidement que possible.

Enflammer une extrémité du tas par contact avec la flamme.

Mesurer le temps de réaction sur une distance de 200 mm après que la zone de réaction a parcouru une distance initiale de 30 mm.

L'essai est effectué avec la substance de référence et au moins une fois avec chacun des mélanges de substance à essayer et de cellulose.

Si l'on trouve une vitesse maximale de combustion significativement plus grande que celle de la substance de référence, l'essai peut être arrêté; autrement, les essais doivent être répétés cinq fois avec chacun des trois mélanges qui donnent les vitesses de combustion les plus élevées.

▼B

Si l'on soupçonne que le résultat est un «faux positif», répéter l'essai en remplaçant la cellulose par une substance inerte dont la taille des particules est la même, comme le *kieselguhr*. Une autre possibilité consiste à renouveler l'essai avec le mélange substance à essayer/cellulose dont la vitesse de combustion est la plus élevée, dans une atmosphère inerte (contenu d'oxygène < 2 % v/v).

2. **DONNÉES**

Pour des raisons de sécurité, la vitesse maximale de combustion — et non la valeur moyenne — sera retenue pour caractériser les propriétés comburantes de la substance examinée.

Pour l'évaluation d'un mélange donné, retenir la vitesse de combustion la plus élevée mesurée au cours des six essais.

Porter sur un graphique la vitesse de combustion la plus élevée de chaque mélange en fonction de la concentration de comburant. Déduire de ce graphique la vitesse de combustion maximale.

Les six vitesses de combustion mesurées au cours d'une même opération pour le mélange qui a donné la vitesse de combustion maximale ne doit pas s'écarter de plus de 10 % de la moyenne arithmétique; dans le cas contraire, il importe d'améliorer les méthodes de broyage et de mélange.

Comparer la vitesse maximale de combustion obtenue avec la vitesse maximale de combustion du mélange de référence (voir point 1.3).

Si les essais sont réalisés dans une atmosphère inerte, comparer la vitesse maximale avec la vitesse de réaction du mélange de référence dans une atmosphère inerte.

3. **RÉSULTATS**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

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

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

— tout traitement de l'échantillon à essayer (par exemple, broyage, séchage...),

— la source d'allumage utilisée dans les essais,

— les résultats des mesures,

— le type de réaction (par exemple combustion rapide superficielle, combustion à travers toute la masse, toute observation concernant les produits de combustion,...),

— toute observation supplémentaire, y compris une description de l'intensité (flamme, étincelle, fumée, lente incandescence, etc.) et la durée approximative de la réaction observée au cours de l'essai préliminaire de sécurité/dépistage pour la substance à essayer comme pour la substance de référence,

— les résultats des essais effectués avec un matériel inerte, s'il y a lieu,

— les résultats des essais effectués dans une atmosphère inerte, s'il y a lieu.

▼B

3.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Une substance est à considérer comme comburante si:

a) lors de l'essai préliminaire, il y a réaction intense;

b) lors de l'essai, la vitesse maximale de combustion de la substance soumise à essai est supérieure ou égale à celle du mélange de référence composé de cellulose et de nitrate de barium.

Pour éviter un «faux» résultat positif, il faut aussi tenir compte des résultats obtenus en essayant la substance mélangée avec un matériel inerte et/ou dans une atmosphère inerte, lors de l'interprétation des résultats.

4. **RÉFÉRENCES**

NF T 20-035 (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination des propriétés comburantes des solides.

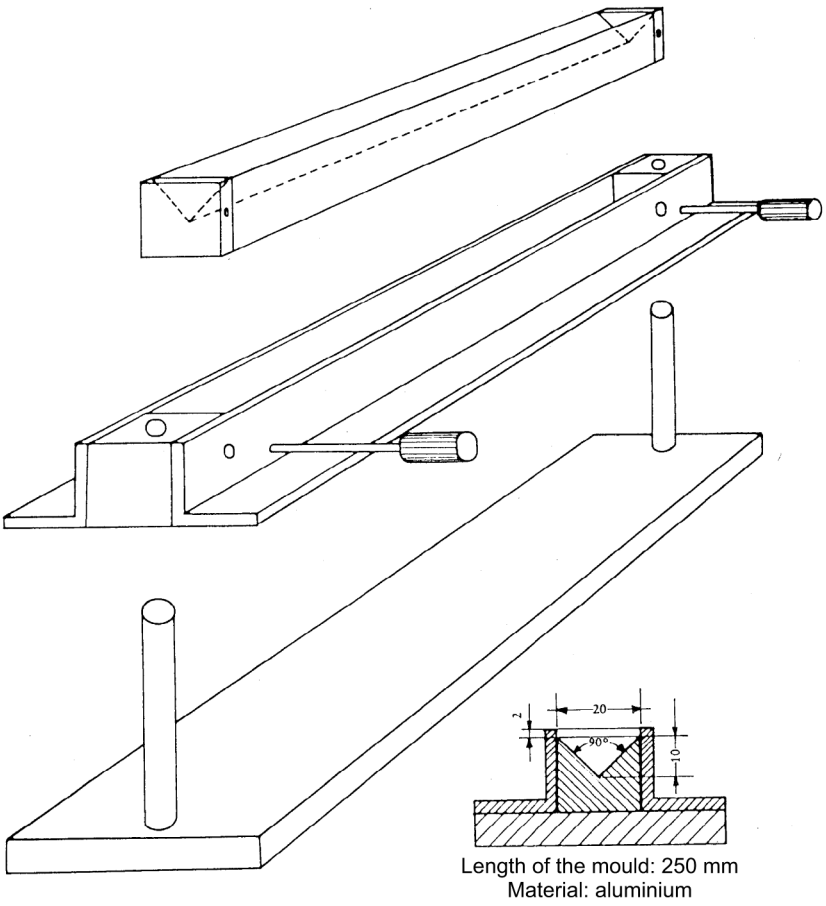
▼B

Annexe

Figure

Moule et accessoires nécessaires à la confection de tas

(toutes les dimensions sont en millimètres)



▼B

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

1. MÉTHODE

Cette méthode de chromatographie sur gel perméable reprend la ligne directrice OCDE TG 118 (1996). Les principes fondamentaux et tous autres renseignements techniques sont donnés en référence (1).

1.1. INTRODUCTION

Les propriétés des polymères sont tellement diversifiées qu'il est impossible de décrire une méthode unique indiquant avec précision des conditions de séparation et d'évaluation qui recouvrent toutes les éventualités et particularités rencontrées dans la séparation des polymères. Les systèmes complexes de polymères, notamment, se prêtent rarement à la chromatographie sur gel perméable. Lorsque la chromatographie sur gel perméable n'est pas applicable, on peut déterminer la masse moléculaire moyenne à l'aide d'autres méthodes (voir annexe). Dans de tels cas, il convient de fournir tous les détails de la méthode utilisée et de justifier son choix.

La méthode décrite ci-après est basée sur la norme D1N 55672 (1). Celle-ci fournit des indications détaillées sur la manière de réaliser les expériences et d'évaluer les données. S'il est nécessaire de modifier les conditions expérimentales, ces changements doivent être justifiés. D'autres normes peuvent être utilisées, à condition d'en mentionner toutes les références. La méthode décrite fait appel à des échantillons de polystyrène de polydispersité connue pour l'étalonnage et il y aura peut-être lieu de la modifier pour l'adapter aux cas de polymères particuliers, par exemple, les polymères solubles dans l'eau et les polymères ramifiés à longue chaîne.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

La masse moléculaire moyenne en nombre M_n et la masse moléculaire moyenne en poids M_w sont déterminées à l'aide des équations suivantes:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

où

H_i est l'amplitude du signal du détecteur, par rapport au niveau de référence, correspondant au volume de rétention V_i;

M_i est la masse moléculaire de la fraction de polymère correspondant au volume de rétention V_i et

n est le nombre de points expérimentaux.

La largeur de la distribution des masses moléculaires, qui représente une mesure de la polydispersité du système, est donnée par le rapport M_w/M_n.

▼B

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

La méthode par chromatographie sur gel perméable étant une méthode relative, il est nécessaire de procéder à un étalonnage. Celui-ci est généralement effectué au moyen de polystyrènes étalons à chaîne linéaire et à distribution étroite, dont les masses moléculaires moyennes M_n et M_v ainsi que la distribution des masses moléculaires sont connues. La courbe d'étalonnage ne peut être utilisée pour déterminer la masse moléculaire d'un échantillon inconnu que si les conditions de séparation des échantillons et des étalons ont été sélectionnées de manière identique.

Une relation déterminée entre la masse moléculaire et le volume d'élution n'est valable que dans les conditions particulières d'une expérience donnée. Parmi ces conditions figurent, avant tout, la température, le solvant (ou le mélange de solvants), les conditions de chromatographie, ainsi que la colonne de séparation ou le système de colonnes.

Les masses moléculaires de l'échantillon déterminées de cette manière constituent des valeurs relatives et sont désignées par le terme «masses moléculaires en équivalent polystyrène». Cela signifie qu'en fonction des différences chimiques et structurelles entre l'échantillon à tester et les étalons, les masses moléculaires peuvent dévier des valeurs absolues de manière plus ou moins importante. Si d'autres étalons sont utilisés, par exemple le polyéthylène glycol, le poly(éthylène oxyde), le poly(méthacrylate de méthyle) ou l'acide polyacrylique, il importe d'en indiquer la raison.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La chromatographie sur gel perméable permet de déterminer la distribution des masses moléculaires ainsi que les masses moléculaires moyennes (M_n, M_w). La chromatographie sur gel perméable constitue un type particulier de chromatographie liquide dans lequel l'échantillon à tester est séparé en fonction des volumes hydrodynamiques de chaque constituant (2).

La séparation s'effectue à mesure que l'échantillon progresse dans une colonne remplie d'un matériau poreux, généralement un gel organique. Les petites molécules peuvent pénétrer dans les pores tandis que les grosses molécules en sont exclues. Le parcours des grosses molécules est, de ce fait, plus court; elles sont éluées en premier lieu. Les molécules de taille moyenne pénètrent dans certains des pores; elles sont éluées plus tard. Les molécules les plus petites, dont le rayon hydrodynamique moyen est plus petit que les pores du gel, peuvent pénétrer dans tous les pores. Elles sont éluées en dernier lieu.

Dans la situation idéale, c'est la taille des espèces moléculaires qui régit entièrement la séparation, mais, en pratique, il est difficile d'éviter tout au moins l'interférence de certains effets d'absorption. Un remplissage irrégulier de la colonne, de même que des volumes morts, peuvent aggraver la situation (2).

La détection s'effectue, par exemple, par mesure de l'indice de réfraction ou de l'absorption dans l'UV pour donner une courbe de distribution simple. Cependant, pour pouvoir associer à la courbe des valeurs de masses moléculaires réelles, il est nécessaire d'étalonner la colonne par passage de polymères de masse moléculaire connue et, idéalement, d'une structure aussi proche que possible, par exemple divers polystyrènes étalons. Une courbe de Gauss en résulte généralement, parfois avec une dissymétrie marquée du côté des faibles masses moléculaires, l'axe vertical indiquant la quantité, en poids, des espèces de différentes masses moléculaires éluées, tandis que sur l'axe horizontal figure le logarithme de la masse moléculaire.

▼B

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

La reproductibilité (écart-type relatif) du volume d'élution doit être au plus égale à 0,3 pour cent. Il y a lieu d'assurer la reproductibilité de l'analyse grâce à une correction mettant en jeu un étalon interne, si un chromatogramme est évalué en fonction du temps et ne satisfait pas aux critères mentionnés plus haut (1). Les polydispersités dépendent des masses moléculaires des étalons. Dans le cas des polystyrènes étalons, les valeurs typiques sont:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p est la masse moléculaire de l'étalon correspondant au maximum du pic)

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Préparation des solutions de polystyrène étalon**

On dissout les polystyrènes étalons en les mélangeant soigneusement à l'éluant choisi. On préparera les solutions en observant les recommandations du fabricant.

Les concentrations des étalons choisis dépendent de différents facteurs, comme le volume d'injection, la viscosité de la solution et la sensibilité du détecteur. Le volume d'injection maximum doit être adapté à la longueur de la colonne, en veillant à ne pas surcharger celle-ci. Les volumes d'injection courants pour des séparations analytiques par chromatographie sur gel perméable, au moyen d'une colonne de 30 cm × 7,8 mm, varient normalement entre 40 et 100 ml. Il est possible d'injecter des volumes plus importants, mais ceux-ci ne peuvent dépasser 250 µl. On doit déterminer le rapport optimal entre le volume d'injection et la concentration avant l'étalonnage de la colonne.

1.6.2. **Préparation de la solution de l'échantillon**

En principe, la préparation des solutions de l'échantillon s'effectue dans les mêmes conditions. L'échantillon est dissous dans un solvant approprié, par exemple le tétrahydrofurane (THF), en agitant soigneusement. Il ne doit, en aucun cas, être dissous dans un bain à ultrasons. Si nécessaire, la solution de l'échantillon est purifiée au moyen d'un filtre à membrane d'une dimension de pores comprise entre 0,2 et 2 µm.

La présence de particules non dissoutes doit être mentionnée dans le rapport final, dans la mesure où elle peut résulter d'espèces de masse moléculaire élevée. Il faut recourir à une méthode appropriée pour déterminer le pourcentage en poids des particules non dissoutes. Les solutions doivent être analysées dans un délai de 24 heures.

1.6.3. **Appareillage**

— un réservoir à solvant,

— un système de dégazage (si nécessaire),

— une pompe,

▼B

— un amortisseur d'impulsions (si nécessaire),

— un système d'injection,

— des colonnes de chromatographie,

— un détecteur,

— un débitmètre (si nécessaire),

— un système d'enregistrement et de traitement des données,

— un récipient pour recueillir les solutions usées.

On doit vérifier que le système de chromatographie sur gel perméable est inerte vis-à-vis des solvants utilisés (par exemple, utilisation de capillaires en acier lorsque le solvant est le THF).

1.6.4. **Injection et système de distribution du solvant**

Un volume défini de la solution de l'échantillon est chargé sur la colonne dans une zone étroitement définie, à l'aide d'un échantillonneur automatique ou manuellement. Si on opère manuellement, le fait de retirer ou d'enfoncer le piston de la seringue trop rapidement peut provoquer des modifications dans la distribution des masses moléculaires observées. Le système de distribution du solvant doit, dans la mesure du possible, être exempt de pulsations; il est souhaitable qu'il comporte un amortisseur d'impulsions. Le débit est de l'ordre de 1 ml/min.

1.6.5. **Colonne**

Selon la nature de l'échantillon a tester, le polymère est caractérisé en ayant recours à une seule colonne ou à plusieurs colonnes connectées en série. Un certain nombre de matériaux poreux pour colonne de propriétés définies (par exemple taille des pores, limites d'exclusion) sont disponibles dans le commerce. Le choix du gel de séparation ou celui de la longueur de la colonne dépendent, d'une part, des propriétés de l'échantillon à tester (volumes hydrodynamiques, distribution des masses moléculaires), d'autre part, des conditions particulières de la séparation, telles que la nature du solvant, la température et le débit (1) (2) (3).

1.6.6. **Plateaux théoriques**

La colonne ou la combinaison de colonnes utilisée pour la séparation doit être caractérisée par le nombre de plateaux théoriques. Pour ce faire, dans le cas où le solvant d'élution est le THF, il y a lieu de faire passer une solution d'ethylbenzène ou d'un autre soluté non polaire approprié sur une colonne de longueur connue. Le nombre de plateaux théoriques est donné par l'équation suivante:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{ou} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

où:

N est le nombre de plateaux théoriques

V_e est le volume d'élution correspondant au maximum du pic

▼B

W est la largeur du pic au niveau de la ligne de base

$W_{1/2}$ est la largeur du pic à mi-hauteur.

1.6.7. **Efficacité de la séparation**

Outre le nombre de plateaux théoriques, paramètre déterminant la largeur de bande, l'efficacité de séparation est une autre grandeur caractéristique; c'est la pente de la courbe de calibrage qui la détermine. L'efficacité de séparation d'une colonne se détermine au moyen de la relation suivante:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{section de la colonne}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

où

$V_{e,\ Mx}$ est le volume d'élution du polystyrène de masse moléculaire M_x

$V_{e,(10.Mx)}$ est le volume d'élution du polystyrène de masse moléculaire 10 fois supérieure

La résolution du système est généralement définie comme suit:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

où,

V_{e1}, V_{e2} sont les volumes d'élution des deux polystyrènes étalons au maximum du pic

W_1, W_2 sont les largeurs des pics au niveau de la ligne de base

M_p M_2 sont les masses moléculaires correspondant au maximum des pics (elles devraient différer d'un facteur 10).

La valeur de R pour le système de colonnes doit être supérieure à 1,7 (4).

1.6.8. **Solvants**

Tous les solvants doivent être d'une grande pureté (on emploie du THF à 99,5 % de pureté). Le réservoir de solvant (mis, au besoin, sous atmosphère de gaz inerte) doit être assez grand pour permettre l'étalonnage de la colonne et plusieurs analyses d'échantillons. Le solvant sera dégazé avant d'être pompé vers la colonne.

1.6.9. **Régulation de la température**

La température des composants internes critiques (boucle d'injection, colonne(s), détecteur et tuyaux) doit être constante et compatible avec le choix du solvant.

▼B

1.6.10. **Détecteur**

Le détecteur sert à enregistrer de manière quantitative la concentration de l'échantillon qui est élue de la colonne. En vue d'éviter un élargissement indésirable des pics, le volume de la cuvette du détecteur sera choisi aussi petit que possible. Il ne doit pas excéder 10 µl, sauf pour les détecteurs par diffusion de la lumière et les viscosimètres. La détection s'effectue généralement par réfractométrie différentielle. Si les propriétés spécifiques de l'échantillon ou du solvant d'élution l'exigent, on peut toutefois utiliser d'autres types de détecteurs tels que les détecteurs UV/VIS ou IR, les viscosimètres, etc.

2. RÉSULTATS ET PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

2.1. RÉSULTATS

On se référera à la norme DIN (1) pour ce qui concerne les critères d'évaluation détaillés, de même que pour les spécifications relatives à la collecte et au traitement des données.

Pour chaque échantillon analysé, il est nécessaire de réaliser deux expériences indépendantes. Leurs résultats seront analysés séparément.

Les paramètres M_n, M_w, M_w/M_n, M_p doivent être déterminés pour chaque mesure. Il est nécessaire d'indiquer de façon explicite que les valeurs mesurées sont des valeurs relatives correspondant a des équivalents de masse moléculaire de l'étalon utilisé.

Après avoir déterminé les volumes et les temps de rétention (éventuellement corrigés au moyen d'un étalon interne), on porte en graphique les valeurs de log M_p (M_p représentant les maxima des pics des polymères d'étalonnage) en fonction de l'une de ces quantités. Deux points d'étalonnage au moins sont nécessaires pour chaque facteur 10 de masse moléculaire; cinq points de mesure au moins sont requis pour la courbe dans son ensemble, qui doit couvrir la masse moléculaire estimée de l'échantillon. Le point extrême de la courbe d'étalonnage du côté des faibles masses moléculaires peut être défini grâce au n-hexylbenzène ou à un autre soluté non polaire approprié. Les masses moléculaires moyennes en nombre et en poids sont généralement déterminées par un traitement électronique des données fondé sur les formules décrites dans la section 1.2. Si on a recours à un traitement manuel, il est opportun de consulter l'ASTM D 3536-91 (3).

La courbe de distribution doit être présentée sous la forme d'un tableau ou d'un graphique (fréquence différentielle ou pourcentages cumulatifs en fonction du log M). Dans la représentation graphique, une puissance de dix de masse moléculaire doit normalement correspondre à une largeur de 4 cm environ tandis que pour le maximum du pic une hauteur de 8 cm environ est adéquate. Dans le cas de courbes de distribution cumulatives, la différence entre 0 et 100 pour cent sur l'axe des ordonnées doit être d'environ 10 cm.

2.2. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit comporter les renseignements suivants:

2.2.1. **Substance à tester**

— renseignements disponibles sur la substance à tester (nature, additifs, impuretés),

▼B

— description du traitement de l'échantillon, observations, problèmes.

2.2.2. **Dispositif expérimental**

— réservoir d'éluant, gaz inerte, dégazage de l'éluant, composition de l'éluant, impuretés,

— pompe, amortisseur d'impulsions, système d'injection,

— colonnes de séparation (fabricant, toutes précisions sur les caractéristiques des colonnes, telles que taille des pores, nature du matériel de séparation etc., nombre, longueur et ordre des colonnes utilisées),

— nombre de plateaux théoriques de la colonne (ou de la combinaison de colonnes), efficacité de la séparation (résolution du système),

— informations sur la symétrie des pics,

— température de la colonne, mode de régulation de la température,

— détecteur (principe de mesure, type, volume de la cuvette),

— débitmètre, s'il y en a un (fabricant, principe de mesure),

— système utilisé pour rassembler et pour traiter les données (matériel et logiciel).

2.2.3. **Étalonnage du système**

— description détaillée de la méthode utilisée pour établir la courbe d'étalonnage,

— précisions sur les critères de qualité propres à cette méthode (par exemple, coefficient de corrélation, erreur quadratique moyenne, etc.),

— informations sur toutes les extrapolations, hypothèses et approximations effectuées au cours de la procédure expérimentale, ainsi que sur l'évaluation et le traitement des données,

— toutes les mesures effectuées pour établir la courbe d'étalonnage doivent être présentées dans un tableau qui comporte, pour chaque point d'étalonnage, les informations suivantes:

  — nom de l'échantillon,

  — fabricant de l'échantillon,

  — valeurs caractéristiques M_p, M_n, M_w, M_w/M_n des étalons fournis par le fabricant ou déduites de mesures ultérieures, complétées d'indications relatives à la méthode de détermination,

  — volume d'injection et concentration d'injection,

▼B

— valeur de M_p utilisée pour l'étalonnage,

— volume d'élution ou temps de rétention corrigé mesuré aux maxima des pics,

— M_p calculée au maximum du pic,

— pourcentage d'erreur sur la M_p calculée et sur la valeur d'étalonnage.

2.2.4. **Évaluation**

— évaluation en fonction du temps: toutes méthodes visant à améliorer la reproductibilité requise (méthode de correction, étalon interne, etc.),

— préciser si l'évaluation a été effectuée à partir du volume d'élution ou à partir du temps de rétention,

— indiquer les limites de l'évaluation si un pic n'est pas complètement analysé,

— décrire les méthodes de lissage lorsqu'on y a recours,

— décrire les procédés de préparation et de prétraitement de l'échantillon,

— indiquer la présence de particules non dissoutes, s'il y en a,

— indiquer le volume d'injection (µl) et la concentration d'injection (mg/ml),

— mentionner les observations témoignant d'effets qui engendrent des déviations par rapport au profil idéal de chromatographie sur gel perméable,

— décrire en détail toutes les modifications aux procédures d'essais,

— préciser les intervalles d'erreur,

— consigner toutes autres informations et observations utiles pour interpréter les résultats.

3. **RÉFÉRENCES**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J. and Bly, D.D. (eds) (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley & Sons.

(3) ASTM D 3536-91 (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.

(4) ASTM D 5296-92 (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrène by High Performance Size-Exclusion Chromatography, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.

▼B

Annexe

Exemples d'autres méthodes de détermination de la masse moléculaire moyenne en nombre (M_n) des polymères

La chromatographie sur gel perméable constitue la méthode de choix pour la détermination de M_n, en particulier lorsqu'on dispose d'un ensemble de substances étalons de structure comparable à la structure du polymère. Toutefois, lorsque le recours à la chromatographie sur gel perméable présente des difficultés pratiques ou que l'on peut s'attendre à ce que la substance ne satisfasse pas à un critère réglementaire pour la M_n (ce qui demande confirmation), il existe des méthodes de remplacement, par exemple:

1. **Utilisation des propriétés colligatives**

1.1. Ébullioscopie et cryoscopie:

consistent à mesurer l'élévation du point d'ébullition (ébullioscopie) ou l'abaissement du point de congélation (cryoscopie) d'un solvant lorsque le polymère est ajouté. La méthode est basée sur le fait que la dissolution d'un polymère dans un liquide exerce sur les points d'ébullition et de congélation de celui-ci un effet qui dépend de la masse moléculaire du polymère (1) (2).

Le domaine d'application correspond à $M_n < 20\,000$.

1.2. Abaissement de la pression de vapeur:

consiste à mesurer la pression de vapeur d'un liquide de référence avant et après addition de quantités connues de polymères (1) (2).

Le domaine d'application correspond à $M_n < 20\,000$ (théoriquement; en pratique, ne présente toutefois qu'une valeur limitée).

1.3. Osmométrie à membrane:

repose sur le principe de l'osmose, à savoir la tendance naturelle des molécules de solvant à traverser une membrane semi-perméable à partir d'une solution diluée vers une solution concentrée de manière à réaliser l'équilibre. Dans l'essai, la concentration de la solution diluée est nulle tandis que la solution concentrée contient le polymère. Le passage de solvant à travers la membrane induit une différence de pression qui dépend de la concentration et de la masse moléculaire du polymère (1) (3) (4).

Le domaine d'application correspond à des valeurs de M_n comprises entre 20 000 et 200 000.

1.4. Osmométrie en phase vapeur:

consiste à comparer la vitesse d'évaporation d'un aérosol de solvant pur à celle de trois aérosols au moins contenant le polymère à différentes concentrations (1) (5) (6).

Le domaine d'application correspond à $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Analyse des groupes terminaux**

Pour utiliser cette méthode, il est nécessaire de connaître à la fois la structure globale du polymère et la nature des groupes terminaux situés en bout de chaîne (ceux-ci doivent pouvoir être distingués de ta chaîne principale par exemple, par leur spectre RMN ou par titrage et formation de dérivés). La détermination de la concentration moléculaire des groupes terminaux présents sur le polymère peut, ensuite, fournir une valeur de la masse moléculaire (7) (8) (9).

Le domaine d'application correspond a des valeurs de M_n pouvant atteindre 50 000 (avec une fiabilité décroissante).

3. **Références de l'annexe**

(1) Billmeyer, F.W. Jr. (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.

(2) Glover, C.A. (1975). Absolute Colligative Property Methods, Chapter 4, in Polymer Molecular Weights, Part I (ed. P.E. Slade, Jr.), Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 375-79 (1979). Standard Practice for Détermination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane osmometry, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.

(4) Coll, H. (1989). Membrane osmometry, in: Détermination of Molecular Weight (ed. A.R. Cooper), J. Wiley and Sons, pp. 25-52.

(5) ASTM D 3592-77 (1977). Standard recommended practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.

(6) Morris, C.E.M. (1989). Vapour Pressure Osmometry in Determination of Molecular Weight (ed. A.R. Cooper), J. Wiley and Sons.

(7) Schröder, E. Müller, G. & Arndt, K.-F. (1989). Polymer Characterisadon, Carl Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G. (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 in Polymer Molecular Weights, Part I, (ed. P.E. Slade, Jr.) Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S. et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

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

1. MÉTHODE

Cette méthode de chromatographie sur gel perméable reprend la ligne directrice OCDE TG 118 (1996). On trouvera dans les références les principes fondamentaux et autres renseignements techniques.

1.1. INTRODUCTION

Les propriétés des polymères sont tellement diversifiées qu'il est impossible de décrire une méthode unique indiquant avec précision des conditions de séparation et d'évaluation qui recouvrent toutes les éventualités et particularités rencontrées dans la séparation des polymères. Les systèmes complexes de polymères, notamment, se prêtent rarement à la chromatographie sur gel perméable. Lorsque la chromatographie sur gel perméable n'est pas applicable, on peut déterminer la teneur en polymères de faible masse moléculaire à l'aide d'autres méthodes. Dans de tels cas, il convient de fournir tous les détails de la méthode utilisée et de justifier son choix.

La méthode décrite ci-après est basée sur la norme DIN 55672 (1). Celle-ci fournit des indications détaillées sur la manière de réaliser les expériences et d'évaluer les données. S'il est nécessaire de modifier les conditions expérimentales, ces changements doivent être justifiés. D'autres normes peuvent être utilisées, à condition d'en mentionner toutes les références. La méthode décrite fait appel à des échantillons de polystyrène de polydispersité connue pour l'étalonnage et il y aura peut-être lieu de la modifier pour l'adapter aux cas de polymères particuliers, par exemple, les polymères solubles dans l'eau et les polymères ramifiés à longue chaîne.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

On définit arbitrairement une masse moléculaire faible comme étant une masse moléculaire inférieure à 1 000 daltons.

La masse moléculaire moyenne en nombre M_n et la masse moléculaire moyenne en poids M_w sont déterminées à l'aide des équations suivantes:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

où

H_i est l'amplitude du signal du détecteur, par rapport au niveau de référence, correspondant au volume de rétention V_i, par rapport au niveau de référence.

M_i est la masse moléculaire de la fraction de polymère correspondant au volume de rétention, V_i et n est le nombre de points expérimentaux.

La largeur de la distribution des masses moléculaires, qui représente une mesure de la polydispersité du système, est donnée par le rapport M_W/M_n.

▼B

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

La méthode par chromatographie sur gel perméable étant une méthode relative, il est nécessaire de procéder à un étalonnage. Celui-ci est généralement effectué au moyen de polystyrènes étalons à chaîne linéaire et à distribution étroite, dont les masses moléculaires moyennes M_n et M_w, ainsi que la distribution des masses moléculaires sont connues. La courbe d'étalonnage ne peut être utilisée pour déterminer la masse moléculaire d'un échantillon inconnu que si les conditions de séparation des échantillons et des étalons ont été sélectionnées de manière identique.

Une relation déterminée entre la masse moléculaire et le volume d'élution n'est valable que dans les conditions particulières d'une expérience donnée. Parmi ces conditions figurent, avant tout, la température, le solvant (ou le mélange de solvants), les conditions de chromatographie, ainsi que la colonne de séparation ou le système de colonnes.

Les masses moléculaires de l'échantillon déterminées de cette manière constituent des valeurs relatives; on les désigne par le terme «masses moléculaires en équivalent-polystyrène». Cela signifie qu'en fonction des différences chimiques et structurelles entre l'échantillon à tester et les étalons, les masses moléculaires peuvent dévier des valeurs absolues de manière plus ou moins importante. Si d'autres étalons sont utilisés, par exemple le polyéthylèneglycol, le poly(éthylène oxyde), le poly(méthacrylate de méthyle) ou l'acide polyacrylique, il importe d'en indiquer la raison.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La chromatographie sur gel perméable permet de déterminer la distribution des masses moléculaires ainsi que les masses moléculaires moyennes (M_n, M_w). La chromatographie sur gel perméable constitue un type particulier de chromatographie liquide dans lequel l'échantillon à tester est séparé en fonction des volumes hydrodynamiques de chaque constituant (2).

La séparation s'effectue à mesure que l'échantillon progresse dans une colonne remplie d'un matériau poreux, généralement un gel organique. Les petites molécules peuvent pénétrer dans les pores tandis que les grosses molécules en sont exclues. Le parcours des grosses molécules est, de ce fait, plus court; elles sont éluées en premier lieu. Les molécules de taille moyenne pénètrent dans certains des pores; elles sont éluées plus tard. Les molécules les plus petites, dont le rayon hydrodynamique moyen est plus petit que les pores du gel, peuvent pénétrer dans tous les pores. Elles sont éluées en dernier lieu.

Dans la situation idéale, c'est la taille des espèces moléculaires qui régit entièrement la séparation, mais, en pratique, il est difficile d'éviter l'interférence de certains effets d'absorption au moins. Un remplissage irrégulier de la colonne, de même que des volumes morts, peuvent aggraver la situation (2).

La détection s'effectue, par exemple, par mesure de l'indice de réfraction ou de l'absorption dans l'UV pour donner une courbe de distribution simple. Cependant, pour pouvoir associer à la courbe des valeurs de masses moléculaires réelles, il est nécessaire d'étalonner la colonne par passage de polymères de masse moléculaire connue et, idéalement, d'une structure aussi proche que possible. Une courbe de Gauss en résulte généralement; elle présente parfois une dissymétrie marquée du coté des masses moléculaires faibles, l'axe vertical indiquant la quantité, en poids, des espèces de différentes masses moléculaires éluées, tandis que sur l'axe horizontal figure le logarithme de la masse moléculaire.

▼B

La teneur en polymères de faible masse moléculaire est déduite de cette courbe. Le calcul ne peut être exact que si les espèces à faible masse moléculaire se comportent de la même manière, par unité de masse, que l'ensemble du polymère.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

La reproductibilité (écart-type relatif) du volume d'élution doit être au plus égale à 0,3 pour cent. Il y a lieu d'améliorer la reproductibilité de l'analyse grâce à une correction mettant en jeu un étalon interne, si un chromatogramme est évalué en fonction du temps et ne satisfait pas aux critères mentionnés plus haut [voir informations complémentaires en (1)]. Les polydispersités dépendent des masses moléculaires des étalons; dans le cas des polystyrènes étalons:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p est la masse moléculaire de l'étalon correspondant au maximum du pic)

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Préparation des solutions de polystyrène étalon**

On dissout les polystyrènes étalons en les mélangeant soigneusement à l'éluant choisi. On préparera les solutions en observant les recommandations du fabricant.

Les concentrations des étalons choisis dépendent de différents facteurs, comme le volume d'injection, la viscosité de la solution et la sensibilité du détecteur. Le volume d'injection maximum doit être adapté à la longueur de la colonne, en veillant à ne pas surcharger celle-ci. Les volumes d'injection courants pour des séparations analytiques par chromatographie sur gel perméable, au moyen d'une colonne de 30 cm × 7,8 mm, varient normalement entre 40 et 100 µl. Il est possible d'injecter des volumes plus importants, mais ceux-ci ne peuvent dépasser 250 µl. On doit déterminer le rapport optimal entre le volume d'injection et la concentration avant l'étalonnage de la colonne.

1.6.2. **Préparation de la solution de l'échantillon**

En principe, la préparation des solutions de l'échantillon s'effectue selon les mêmes critères. L'échantillon est dissous dans un solvant approprié, par exemple le THF, en agitant soigneusement. Il ne doit, en aucun cas, être dissous dans un bain à ultrasons. Si nécessaire, la solution de l'échantillon est purifiée au moyen d'un filtre à membrane d'une dimension de pores comprise entre 0,2 et 2 µm.

La présence de particules non dissoutes doit être mentionnée dans le rapport final, dans la mesure où elle peut résulter d'espèces de masse moléculaire élevée. Il faut recourir à une méthode appropriée pour déterminer le pourcentage en poids des particules non dissoutes. Les solutions doivent être analysées dans un délai de 24 heures.

▼B

1.6.3. **Correction liée à la présence d'impuretés et d'additifs**

S'agissant de la teneur en espèces de M < 1 000, il est généralement nécessaire d'apporter une correction pour tenir compte de la présence de composés particuliers non polymériques (par exemple des impuretés ou des additifs), sauf si la teneur mesurée n'excède pas un pour cent. Cette correction peut être réalisée par analyse directe de la solution de polymère ou de l'éluat de la chromatographie sur gel perméable.

Au cas où l'éluat est trop dilué pour permettre une analyse après passage à travers la colonne, il convient de le concentrer. Il est éventuellement nécessaire d'évaporer l'éluat à sec puis de le redissoudre. La concentration de l'éluat sera effectuée dans des conditions telles qu'aucune modification de sa composition n'intervienne. Le traitement de l'éluat après la phase de chromatographie sur gel perméable est fonction de la méthode d'analyse utilisée pour la détermination quantitative.

1.6.4. **Appareillage**

Un appareil de chromatographie sur gel perméable se compose des éléments suivants:

— un réservoir à solvant,

— un système de dégazage (si nécessaire),

— une pompe,

— un amortisseur d'impulsions (si nécessaire),

— un système d'injection,

— des colonnes de chromatographie,

— un détecteur,

— un débimètre (si nécessaire),

— un système d'enregistrement et de traitement des données,

— un récipient pour recueillir les solutions usées.

On doit vérifier que le système de chromatographie sur gel perméable est inerte vis-à-vis du solvant utilisé (par exemple, utilisation de capillaires en acier lorsque le solvant est le THF).

1.6.5. **Injection et système de pompage du solvant**

Un volume défini de la solution de l'échantillon est chargé sur la colonne dans une zone étroitement définie, à l'aide d'un échantillonneur automatique ou manuellement. Si on opère manuellement, le fait de retirer ou d'enfoncer le piston de la seringue trop rapidement peut provoquer des modifications dans la distribution des masses moléculaires observées. Le système de pompage du solvant doit, dans toute la mesure du possible, être exempt de pulsations; il est souhaitable qu'il comporte un amortisseur d'impulsions. Le débit est de l'ordre de 1 ml/min.

1.6.6. **Colonne**

Selon la nature de l'échantillon à tester, le polymère est caractérisé en ayant recours à une seule colonne ou à plusieurs colonnes connectées en série. Un certain nombre de matériaux poreux pour colonne de propriétés définies (par exemple taille des pores, limites d'exclusion) sont disponibles dans le commerce. Le choix du gel de séparation ou celui de la longueur de la colonne dépendent, d'une part, des propriétés de l'échantillon à tester (volumes hydrodynamiques, distribution des masses moléculaires), d'autre part, des conditions particulières de la séparation, telles que la nature du solvant, la température et le débit (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Plateaux théoriques**

La colonne ou la combinaison de colonnes utilisée pour la séparation doit être caractérisée par le nombre de plateaux théoriques. Pour ce faire, dans le cas où le solvant d'élution est le THF, il y a lieu de faire passer une solution d'éthylbenzène ou d'un autre soluté non polaire approprié sur une colonne de longueur connue. Le nombre de plateaux théoriques est donné par l'équation suivante:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{ou} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

où

N est le nombre de plateaux théoriques

V_e est le volume d'élution correspondant au maximum du pic

W est la largeur du pic au niveau de la ligne de base

$W_{1/2}$ est la largeur du pic à mi-hauteur.

1.6.8. **Efficacité de la séparation**

Outre le nombre de plateaux théoriques, paramètre déterminant la largeur de bande, l'efficacité de séparation est une autre grandeur caractéristique; c'est la pente de la courbe de calibrage qui la détermine. L'efficacité de séparation d'une colonne se détermine au moyen de la relation suivante:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{section de la colonne}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2} \right]$$

où

V_{e,M_x} est le volume d'élution du polystyrène de masse moléculaire M_x

$V_{e,(10.M_x)}$ est le volume d'élution du polystyrène de masse moléculaire 10 fois supérieure.

La résolution du système est généralement définie comme suit:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

où.

V_{e1}, V_{e2} sont les volumes d'élution des deux polystyrènes étalons au maximum du pic.

W_1, W_2 sont les largeurs des pics au niveau de la ligne de base.

M_1, M_2 sont les masses moléculaires correspondant au maximum des pics (elles doivent différer d'un facteur 10).

La valeur de R pour le système de colonnes doit être supérieure à 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Solvants**

Tous les solvants doivent être d'une grande pureté (on emploie du THF à 99,5 pour cent de pureté}. Le réservoir de solvant (mis, au besoin, sous atmosphère de gaz inerte) doit être assez grand pour permettre l'étalonnage de la colonne et plusieurs analyses d'échantillons. Le solvant sera dégazé avant d'être pompe vers la colonne.

1.6.10. **Régulation de la température**

La température des composants internes critiques [boucle d'injection, colonne(s), détecteur et tuyaux] doit être constante et compatible avec le choix du solvant.

1.6.11. **Détecteur**

Le détecteur sert à enregistrer de manière quantitative la concentration de l'échantillon qui est élué de la colonne. En vue d'éviter un élargissement indésirable des pics, le volume de la cuvette du détecteur sera choisi aussi petit que possible. Il ne doit pas excéder 10 µl, sauf pour les détecteurs par diffusion de la lumière et les viscosimètres. La détection s'effectue généralement par réfractométrie différentielle. Toutefois, si les propriétés spécifiques de l'échantillon ou du solvant d'élution l'exigent, d'autres types de détecteurs peuvent être utilisés tels que les détecteurs UV/VIS ou IR, les viscosimètres, etc.

2. **RÉSULTATS ET PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

2.1. RÉSULTATS

On se référera à la norme DIN (1) pour ce qui concerne les critères d'évaluation détaillés, de même que pour les spécifications relatives à la collecte et au traitement des données.

Pour chaque échantillon analysé, on réalisera deux expériences indépendantes. Leurs résultats seront analysés séparément.

Il est nécessaire d'indiquer explicitement que les valeurs mesurées sont des valeurs relatives correspondant a des équivalents de masse moléculaire de l'étalon utilisé.

Dans tous les cas, il est essentiel de déterminer aussi les données relatives aux blancs, ceux-ci étant traités de la même manière que les échantillons.

Après avoir déterminé les volumes et les temps de rétention (éventuellement corrigés au moyen d'un étalon interne), on porte en graphique les valeurs de log M_p (M_p représentant les maxima des pics des polymères d'étalonnage) en fonction de l'une de ces quantités. Deux points d'étalonnage au moins sont nécessaires pour chaque facteur 10 de masse moléculaire; cinq points de mesure au moins sont requis, pour la courbe dans son ensemble qui doit couvrir la masse moléculaire estimée de l'échantillon. Le point extrême de la courbe d'étalonnage du côté des faibles masses moléculaires peut être défini grâce au n-hexylbenzène ou à un autre soluté non polaire approprié. On détermine la portion de la courbe correspondant aux masses moléculaires inférieures à 1 000 et on la corrige, si nécessaire, pour tenir compte des impuretés et des additifs. Les courbes d'élution sont généralement évaluées au moyen d'un système électronique de traitement des données. Si on a recours à un traitement manuel, il est opportun de consulter l'ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Si un polymère insoluble est retenu sur la colonne, sa masse moléculaire est vraisemblablement supérieure à celle de la fraction soluble et il faut en tenir compte pour éviter de surestimer la teneur en polymères de faible masse moléculaire. On trouvera en annexe des indications permettant de corriger la teneur en polymères de faible masse moléculaire pour tenir compte des polymères insolubles.

La courbe de distribution doit être présentée sous la forme d'un tableau ou d'un graphique (fréquence-différentielle ou pourcentages cumulatifs en fonction du log M). Dans la représentation graphique, une puissance de dix de masse moléculaire doit normalement correspondre à une largeur de 4 cm environ, tandis que pour le maximum du pic une hauteur de 8 cm environ est adéquate. Dans le cas de courbes de distribution cumulatives, la différence entre 0 et 100 pour cent sur l'axe des ordonnées doit être d'environ 10 cm.

2.2. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit comporter les renseignements suivants:

2.2.1. **Substance à tester**

— renseignements disponibles sur la substance à tester (nature, additifs, impuretés),

— description du traitement de l'échantillon, observations, problèmes.

2.2.2. **Dispositif expérimental**

— réservoir d'éluant, gaz inerte, dégazage de l'éluant, composition de l'éluant, impuretés,

— pompe, amortisseur d'impulsions, système d'injection,

— colonnes de séparation (fabricant, toutes précisions sur les caractéristiques de la colonne, telles que taille des pores, nature du matériel de séparation, etc., nombre, longueur et ordre des colonnes utilisées),

— nombre de plateaux théoriques de la colonne (ou de la combinaison de colonnes), efficacité de la séparation (résolution du système),

— informations sur la symétrie des pics,

— température de la colonne, mode de régulation de la température,

— détecteur (principe de mesure, type, volume de la cuvette),

— débitmètre s'il y en a un (fabricant, principe de mesure),

— système utilisé pour rassembler et pour traiter les données (matériel et logiciel).

2.2.3. **Étalonnage du système**

— description détaillée de la méthode utilisée pour établir la courbe d'étalonnage,

▼B

— précisions sur les critères de qualité propres à cette méthode (par exemple, coefficient de corrélation, erreur quadratique moyenne, etc.),

— informations sur toutes les extrapolations, hypothèses et approximations effectuées au cours des processus expérimentaux, ainsi que sur l'évaluation et le traitement des données,

— toutes les mesures effectuées pour établir la courbe d'étalonnage doivent être présentées dans un tableau qui comporte, pour chaque point d'étalonnage, les informations suivantes:

  — nom de l'échantillon,

  — fabricant de l'échantillon,

  — valeurs caractéristiques M_p, M_o, M_w, M_w/M_n des étalons fournies par le fabricant déduites de mesures ultérieures, complétées d'indications relatives à la méthode de détermination,

  — volume d'injection et concentration d'injection,

  — valeur de M_p utilisée pour l'étalonnage,

  — volume d'élution ou temps de rétention corrigé mesuré aux maxima des pics,

  — M_p calculée au maximum du pic,

  — pourcentage d'erreur sur la M_p calculée et sur la valeur d'étalonnage.

2.2.4. **Renseignements sur la teneur en polymères de faible masse moléculaire**

— description des méthodes d'analyse utilisées et de la manière dont les expériences ont été menées,

— informations sur le pourcentage que représente la teneur en espèces de faible masse moléculaire (poids/poids) par rapport à l'ensemble de l'échantillon,

— informations sur les impuretés, les additifs et les autres substances non polymériques en pourcentage pondéral de l'ensemble de l'échantillon.

2.2.5. **Évaluation**

— évaluation en fonction du temps: toutes méthodes visant à améliorer la reproductibilité requise (méthode de corrections, étalon interne, etc.),

— préciser si l'évaluation a été effectuée à partir du volume d'élution ou à partir du temps de rétention,

— indiquer les limites de l'évaluation si un pic n'est pas complètement analyse,

— décrire les méthodes de lissage lorsqu'on y a recours.

— décrire les procédés de préparation et de prétraitement de l'échantillon,

— indiquer la présence de particules non dissoutes, s'il y en a,

▼B

— indiquer le volume d'injection (µl) et la concentration d'injection (mg/ml),

— mentionner les observations témoignant d'effets qui engendrent des déviations par rapport au profil idéal de chromatographie sur gel perméable,

— décrire en détail toutes les modifications aux procédures d'essais,

— préciser les intervalles d'erreur,

— consigner toutes autres informations et observations utiles pour interpréter les résultats.

3. **RÉFÉRENCES**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J. et Bly, D.D. (eds.) (1979). Modem Size Exclusion Liquid Chromatography, J.Wiley & Sons.

(3) ASTM D 3536-91 (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.

▼B

Annexe

Indications permettant de corriger la teneur en polymères de faible masse moléculaire pour tenir compte des polymères insolubles

La présence d'un polymère insoluble dans un échantillon entraîne une perte de masse au cours de l'analyse par chromatographie sur gel perméable. Le polymère insoluble est irréversiblement retenu sur la colonne ou sur le filtre à échantillon lorsque la partie soluble de l'échantillon traverse la colonne. Si l'indice de réfraction différentiel (dn/dc) du polymère peut être estimé ou mesuré, il est possible d'estimer la masse que l'échantillon a perdue sur la colonne. Dans ce cas, on effectue une correction à l'aide d'un étalonnage externe du réfractomètre, avec des étalons dont on connaît la concentration et le dn/dc. Dans l'exemple qui suit, on utilise un étalon de poly(méthacrylate de méthyle).

L'étalonnage externe pratiqué lors de l'analyse des polymères acryliques consiste à analyser par chromatographie sur gel perméable une solution étalon de concentration connue de poly(méthacrylate de méthyle) dans du tétrahydrofuranne; les résultats servent à calculer la constante du réfractomètre selon l'équation suivante:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

où

K = est la constante du réfractomètre (microvolts secondes/ml)

R = est la réponse de l'étalon de poly(méthacrylate de méthyle) (microvolts secondes)

C = est la concentration de l'étalon de poly(méthacrylate de méthyle) (mg/ml)

V = est le volume d'injection (ml) et

dn/dc = est l'indice de réfraction différentiel d'une solution de poly(méthacrylate de méthyle) dans du tétrahydrofuranne (ml/mg).

Les données suivantes caractérisent généralement un étalon de poly(méthacrylate de méthyle):

R = 2 937 891;

C = 1,07 mg/ml;

V = 0,1 ml;

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg.

La valeur de K résultante, $3{,}05 \times 10^{11}$, est ensuite utilisée pour calculer la réponse théorique du détecteur, c'est-à-dire celle qu'on obtiendrait si 100 pour cent du polymère injecté était élué à travers le détecteur.

▼B

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

1. MÉTHODE

La méthode décrite reprend la version révisée de la ligne directrice OCDE TG 120 (1997). On trouvera davantage de renseignements techniques en référence (1).

1.1. INTRODUCTION

Dans le cas de certains polymères, tels que les polymères en émulsion, un travail préparatoire initial peut être nécessaire avant utilisation de la méthode exposée. La méthode n'est pas applicable aux polymères liquides ni aux polymères qui réagissent avec l'eau dans les conditions d'essai.

Lorsque la méthode est difficile ou impossible à mettre en pratique, le comportement de dissolution-extraction des polymères peut être étudié par d'autres méthodes. Dans ce cas, la méthode utilisée devra être entièrement détaillée et justifiée.

1.2. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le comportement de dissolution — extraction des polymères en milieu aqueux est déterminé par la méthode du flacon (voir A.6, Solubilité dans l'eau, méthode du flacon), en y apportant les modifications décrites ci-après.

1.4. CRITÈRES DE QUALITÉ

Néant

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.5.1. **Appareillage**

L'appareillage nécessaire à l'application de la méthode est le suivant:

— un dispositif permettant de réduire l'échantillon en poudre, tel qu'un broyeur produisant des particules de taille déterminée

— un système d'agitation avec possibilité de régler la température

— un système de filtration sur membrane

— un dispositif d'analyse

— des tamis normalisés.

1.5.2. **Préparation de la solution de l'échantillon**

Il convient de réduire d'abord un échantillon représentatif à l'état de particules d'une taille comprise entre 0,125 et 0,25 mm en utilisant des tamis appropriés. Il peut être nécessaire de refroidir pour garantir la stabilité de l'échantillon ou pour procéder au broyage. Les matériaux du type du caoutchouc peuvent être pulvérisés à la température de l'azote liquide (1).

S'il n'est pas possible d'obtenir des particules de la dimension requise, on doit s'efforcer de réduire autant que possible la taille des particules et consigner le résultat. Dans le rapport, il est nécessaire d'indiquer comment l'échantillon pulvérisé a été conservé avant l'analyse.

▼B

1.5.3. **Procédure**

On pèse trois échantillons de la substance à tester, de 10 g chacun, dans trois récipients pourvus de bouchons en verre et on ajoute 1 000 ml d'eau dans chacun des récipients. Si la manipulation de 10 g de polymère s'avère impossible, il convient d'utiliser la quantité la plus grande qui puisse être manipulée, le volume d'eau étant ajusté en proportion.

Les récipients sont soigneusement bouchés, puis agités à 20 °C. On doit employer un dispositif d'agitation qui puisse fonctionner à température constante. Après une période de 24 heures, le contenu de chaque récipient est centrifugé ou filtré et la concentration du polymère dans la phase aqueuse limpide est déterminée à l'aide d'une méthode d'analyse appropriée. S'il n'existe pas de méthode permettant une analyse adéquate de la phase aqueuse, on peut obtenir une estimation de la solubilité-extractibilité totale en pesant, après séchage, le résidu filtré ou le précipité centrifugé.

Il est également nécessaire de différencier au plan quantitatif les impuretés et les additifs, d'une part, et les espèces de faible masse moléculaire, d'autre part. Dans le cas d'une détermination par gravimétrie, il est important de réaliser un essai à blanc, c'est-à-dire sans utiliser la substance à tester, de manière à pouvoir tenir compte des résidus générés par la méthode expérimentale.

On peut déterminer de la même manière le comportement de dissolution — extraction des polymères dans l'eau à 37 °C à pH 2 et pH 9 tel que décrit pour l'expérience réalisée à 20 °C. Les valeurs de pH peuvent être obtenues par addition de tampons adéquats ou d'acides et de bases appropriés tels que l'acide chlorhydrique, l'acide acétique, les hydroxydes de sodium et de potassium de qualité pour analyse ou l'ammoniac.

Il convient de mener un ou deux essais, suivant la méthode d'analyse utilisée. Lorsqu'on dispose de méthodes suffisamment spécifiques pour l'analyse directe du polymère en phase aqueuse, un essai tel que décrit plus haut devrait suffire. Mais quand ces méthodes n'existent pas et que la détermination du comportement de dissolution-extraction du polymère ne peut se faire que par une analyse indirecte, c'est-à-dire uniquement par la détermination de la teneur en carbone organique total (COT) de l'extrait aqueux, il est nécessaire de réaliser un essai supplémentaire. Celui-ci doit aussi être effectué en trois exemplaires, avec des échantillons de polymère dix fois plus petits et les mêmes quantités d'eau que celles qui ont été utilisées dans le premier essai.

1.5.4. **Analyse**

1.5.4.1. *Essais réalisés sur des échantillons d'une seule taille*

Il est possible que l'on dispose de méthodes permettant une analyse directe des polymères en phase aqueuse. Sinon, l'analyse indirecte des polymères dissous ou extraits peut aussi être envisagée. Pour ce faire, on détermine la teneur totale en parties solubles et on la corrige pour tenir compte des substances non polymériques.

L'analyse de l'extrait aqueux pour déterminer la teneur totale en espèces polymériques peut être réalisée;

soit par une méthode suffisamment sensible, par exemple.

— la détermination du COT par la digestion au persulfate ou au dichromate pour donner du CO_2, suivie d'une estimation par IR ou d'une analyse chimique,

▼B

— la spectrométrie d'absorption atomique (SAA) ou son équivalent en émission d'un plasma couplé par induction (PCI), dans le cas des polymères contenant du silicium ou un métal,

— l'absorption UV ou la spectrofluorimétrie pour les polymères arylés,

— la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse pour les échantillons de faible masse moléculaire,

soit par évaporation à sec, sous vide, de l'extrait aqueux, suivie d'une analyse du résidu par spectroscopie (IR, UV, etc.) ou par SAA-PCI.

Si une telle analyse de la phase aqueuse est impossible, l'extrait aqueux sera obtenu au moyen d'un solvant organique non miscible à l'eau (un hydrocarbure chlore, par exemple). Le solvant est alors évaporé et le résidu analysé, par ex. par IR, UV ou SAA-PCI, pour déterminer sa teneur en polymère notifié. Tous les constituants de ce résidu qui s'avèrent être des impuretés ou des additifs doivent être soustraits dans le but de déterminer le degré de dissolution — extraction du polymère lui-même.

Lorsque de telles substances sont présentes en quantités relativement importantes, il peut être nécessaire de soumettre le résidu à une analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance ou en phase gazeuse, par exemple, afin de différencier ces impuretés des monomères et des dérivés des monomères présents, de telle sorte que la teneur réelle en ces dernières espèces puisse être déterminée.

Dans certains cas, une simple évaporation à sec du solvant organique, suivie de la pesée du résidu sec, peut suffire.

1.5.4.2. *Essais réalisés sur des échantillons de deux tailles différentes*

La teneur en carbone organique total doit être déterminée pour tous les extraits aqueux.

Une détermination par gravimétrie est réalisée sur la partie non dissoute ou non extraite de l'échantillon. Si, après la centrifugation ou la filtration du contenu de chaque récipient, des résidus de polymère adhèrent encore à la paroi d'un récipient, il faut rincer ce dernier avec le filtrat jusqu'à ce qu'il ne comporte plus aucune trace visible de résidus. Après quoi, le filtrat est à nouveau filtré ou centrifugé. Les résidus déposés sur le filtre ou dans le tube de centrifugation sont séchés à 40 °C sous vide et pesés. On poursuit le séchage jusqu'à obtention d'une masse constante.

2. RÉSULTATS

2.1. ESSAIS RÉALISÉS SUR DES ÉCHANTILLONS D'UNE SEULE TAILLE

Les résultats obtenus pour chacun des trois flacons, ainsi que les valeurs moyennes, doivent être consignés et exprimés en unités de masse par volume de solution (généralement en mg/l) ou en unités de masse par masse d'échantillon de polymère (habituellement en mg/g). En outre, la perte de masse de l'échantillon (calculée en divisant la masse du soluté par la masse de l'échantillon initial) sera également mentionnée. Les écarts-types relatifs doivent être calculés. Les diverses valeurs seront consignées à la fois pour le produit total (polymère + principaux additifs, etc.) et pour le polymère seul (à savoir, après soustraction de la contribution relative à de tels additifs).

▼B

2.2. ESSAIS RÉALISÉS SUR DES ÉCHANTILLONS DE DEUX TAILLES DIFFÉRENTES

Les différentes concentrations du carbone organique total dans les extraits aqueux provenant des deux séries de trois expériences, ainsi que la valeur moyenne pour chaque série, doivent être consignées et exprimées en unités de masse par volume de solution (généralement en mgC/l), ainsi qu'en unités de masse par masse de l'échantillon initial (généralement en mgC/g).

S'il n'y a pas de différence entre les résultats correspondant aux rapports taille de l'échantillon/volume d'eau élevés et bas, cela peut indiquer que tous les constituants susceptibles d'être extraits l'ont effectivement été. Si tel est le cas, une analyse directe n'est, en principe, pas nécessaire.

Les différentes masses des résidus doivent être consignées et exprimées en pourcentage des masses initiales des échantillons. On calculera les valeurs moyennes pour chaque expérience. La différence entre 100 et le pourcentage obtenu représente le pourcentage de matières solubles et extractibles dans les échantillons de départ.

3. **PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit comporter les renseignements suivants:

3.1.1. **Substance à tester**

— renseignements disponibles sur la substance à tester (nature, additifs, impuretés, proportion d'espèces de faible masse moléculaire).

3.1.2. **Conditions expérimentales**

— description des méthodes utilisées et des conditions expérimentales,

— description des méthodes d'analyse et de détection.

3.1.3. **Résultats**

— résultats de solubilité — extractibilité en mg/l: toutes les valeurs et la valeur moyenne obtenues pour les essais d'extraction dans les différentes solutions, ventilées en polymères et impuretés, additifs, etc.,

— résultats de solubilité — extractibilité en mg/g de polymère,

— concentrations du carbone organique total dans les extraits aqueux, masse du soluté et pourcentages calculés, si on en fait la mesure,

— pH de chaque échantillon,

— informations sur les valeurs obtenues dans les essais à blanc,

— description des méthodes d'analyse et de détection,

— si nécessaire, mention de l'instabilité chimique de la substance à tester durant la procédure d'essai et durant la procédure d'analyse,

— toutes les informations importantes pour interpréter les résultats.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) DIN 53733 (1976). Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen fur Prüfzwecke.

▼B

A.21. **PROPRIÉTÉS COMBURANTES (LIQUIDES)**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode vise à déterminer l'aptitude d'un liquide à accroître la vitesse de combustion ou l'intensité de la combustion d'une substance combustible, ou de provoquer l'inflammation spontanée d'une substance combustible avec laquelle il est mélangé de manière homogène. La méthode repose sur l'épreuve des Nations unies pour les liquides comburants (1) et en est l'équivalent. Toutefois, comme cette méthode A.21 est avant tout conçue pour satisfaire aux exigences du règlement 1907/2006, une seule substance de référence est nécessaire pour effectuer la comparaison. Il peut être nécessaire d'effectuer des tests et des comparaisons avec d'autres substances de référence lorsque les résultats du test doivent être utilisés à d'autres fins ([1]).

Il n'est pas nécessaire d'effectuer ce test lorsque l'examen de la formule structurale établit indubitablement que la substance est incapable de présenter une réaction exothermique avec un combustible.

Il est utile de disposer d'informations préliminaires sur les éventuelles propriétés explosives de la substance avant de pratiquer ce test.

Ce test ne s'applique pas aux solides, gaz, substances explosives ou hautement inflammables, ni aux peroxydes organiques.

Il n'est pas nécessaire d'effectuer ce test lorsque l'on dispose déjà, pour la substance concernée, des résultats de l'épreuve des Nations unies pour les liquides comburants (1).

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Le temps moyen de montée en pression est la moyenne des temps mesurés pour que le mélange testé produise une élévation de pression de 690 kPa à 2 070 kPa au-dessus de la pression atmosphérique.

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

La substance de référence est une solution aqueuse d'acide nitrique (qualité pour analyse) à 65 % (poids/poids) ([2]).

([1]) Comme par exemple dans le cadre du règlement des Nations unies sur les transports.
([2]) L'acide doit être titré avant l'essai, afin de confirmer sa concentration.

▼B

Le cas échéant, si l'expérimentateur prévoit que les résultats de ce test seront peut-être utilisés à d'autres fins ([1]), il peut également être indiqué de tester d'autres substances de référence ([2]).

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Le liquide à tester est mélangé avec de la cellulose fibreuse dans un rapport massique de 1 pour 1 et placé dans une bombe. Si le mélange s'enflamme spontanément lors du mélange ou du remplissage, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai.

Si le mélange ne s'enflamme pas spontanément, il y lieu d'effectuer l'essai complet. Le mélange est chauffé dans la bombe et le temps moyen que met la pression pour s'élever de 690 kPa à 2 070 kPa au-dessus de la pression atmosphérique est déterminé. Ce résultat est comparé au temps moyen de montée en pression pour le mélange 1:1 de la (des) substance(s) de référence et de cellulose.

1.5 CRITÈRES DE QUALITÉ

Dans une série de cinq essais sur une substance, aucun résultat ne devrait s'écarter de plus de 30 % de la moyenne arithmétique. Les résultats qui diffèrent de plus de 30 % de la moyenne devraient être rejetés, la procédure de mélange et de remplissage améliorée et les essais répétés.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Préparation**

1.6.1.1. *Substance combustible*

Comme matériau combustible on utilise de la cellulose fibreuse séchée ayant une longueur de fibre comprise entre 50 et 250 μm pour un diamètre de 25 μm ([3]). On la fait sécher en couche de moins de 25 mm d'épaisseur à 105 °C pendant 4 heures jusqu'à obtention d'un poids constant, puis on la maintient dans un dessiccateur en présence de dessiccant jusqu'à refroidissement et utilisation. La teneur en eau doit être inférieure à 0,5 % en masse (rapportée au poids sec) ([4]). Si cela est nécessaire pour satisfaire à cette condition, la durée de séchage doit être prolongée ([5]). Le même lot de cellulose doit être utilisé tout au long des essais.

([1]) Comme par exemple dans le cadre du règlement des Nations unies sur les transports.
([2]) Par exemple: acide perchlorique à 50 % (poids/poids) et chlorate de sodium à 40 % (poids/poids) sont utilisés dans la référence 1.
([3]) Par exemple Cellulose en poudre Whatman pour chromatographie sur colonne CF 11, n° de catalogue 4021 050.
([4]) Confirmé par titrage Karl-Fisher par exemple.
([5]) On peut également obtenir cette teneur en eau, par exemple, en chauffant à 105 °C pendant 24 heures sous vide.

▼B

1.6.1.2. *Appareillage*

1.6.1.2.1. B o m b e

On doit disposer d'une bombe. Le dispositif d'essai est constitué par une bombe cylindrique en acier de 89 mm de longueur et de 60 mm de diamètre extérieur (voir figure 1). La bombe comporte deux plats usinés en des points diamétralement opposés (réduisant sa largeur à cet endroit à 50 mm), ce qui permet de l'immobiliser pour le serrage du bouchon de mise à feu et du bouchon à évent. Elle est alésée intérieurement à 20 mm et comporte aux deux extrémités un chambrage de 19 mm de profondeur taraudé au pas de 1 en tube normalisé BSP (British Standard Pipe) ou son équivalent métrique. Une prise de pression est vissée latéralement dans le corps de la bombe à 35 mm d'une extrémité, et à un angle de 90° par rapport aux plats. Elle se visse dans un chambrage de 12 mm de profondeur taraudé au pas de 1/2 en tube normalisé BSP (ou l'équivalent métrique). Si nécessaire, un joint en un matériau inerte est utilisé pour assurer l'étanchéité au gaz. La prise de pression fait saillie latéralement de 55 mm par rapport au corps de la bombe et elle est percée d'un trou axial de 6 mm. Elle comporte à son extrémité extérieure un chambrage taraudé pour recevoir un capteur de pression du type à diaphragme. Tout autre type de dispositif de mesure de la pression peut être utilisé, à condition qu'il résiste aux gaz chauds et produits de décomposition et qu'il puisse réagir à des accroissements de pression de 690 à 2 070 kPa en moins de 5 ms.

L'extrémité de la bombe la plus éloignée du raccord est fermée par un bouchon fileté qui porte deux électrodes, dont l'une est isolée du corps du bouchon et l'autre mise à la masse. L'autre extrémité est fermée par un disque de rupture en aluminium de 0,2 mm d'épaisseur (taré à une pression d'environ 2 200 kPa), maintenu en place par un bouchon comportant un évent de 20 mm. Si nécessaire, un joint inerte est utilisé pour assurer la bonne étanchéité entre le bouchon et la bombe. Un porte-bombe spécial (figure 2) permet de maintenir la bombe dans la position voulue pendant les essais. Il est généralement constitué par une embase en acier doux de 235 mm × 184 mm × 6 mm, sur laquelle est soudé obliquement un tube de section carrée (de 70 mm × 70 mm × 4 mm) de 185 mm de longueur.

À une extrémité du tube carré, on a enlevé une certaine longueur de métal sur deux faces opposées, ce qui laisse une longueur de 86 mm de tube carré prolongée par deux côtés plats. Les extrémités de ces plats sont coupées à 60° par rapport à l'axe du tube et soudées à la plaque d'embase. Une encoche de 22 mm de large et de 46 mm de profondeur est découpée sur un côté en haut du tube carré, de telle manière que lorsque la bombe repose sur le support, bouchon de mise à feu vers la base, le raccord de prise de pression vienne s'y loger. Une entretoise en acier de 30 mm de largeur et 6 mm d'épaisseur est soudée sur la paroi intérieure du tube du côté orienté vers le bas. Deux trous taraudés dans le côté opposé reçoivent des vis à molettes de 7 mm, qui servent à fixer la bombe. Deux rebords en acier de 12 mm de largeur et de 6 mm d'épaisseur, soudés sur les flancs du support à la base de la section carrée soutiennent la cuve par le fond.

▼B

1.6.1.2.2. Système d'allumage

Le système d'allumage est constitué par un enroulement de fil au Ni/Cr de 25 cm de longueur, de 0,6 mm de section, et d'une résistance électrique de 3,85 ohm/m. Le fil a été enroulé en forme de bobine sur un mandrin de 5 mm de diamètre; ses extrémités sont reliées aux électrodes du bouchon de mise à feu. La bobine doit avoir l'une des configurations présentées à la figure 3. La distance entre la face supérieure du bouchon et le point le plus bas de l'enroulement de chauffage doit être de 20 mm. Si les électrodes ne sont pas réglables en longueur, les deux sections de fil chauffant situées entre la bobine et la face supérieure du bouchon doivent être isolées par une gaine de céramique. Le fil doit être alimenté par une source électrique stable pouvant fournir une intensité d'au moins 10 A.

1.6.2. **Réalisation de l'essai** ([1])

La bombe montée, avec son capteur de pression, mais non fermée par son disque de rupture, est posée bouchon d'allumage vers le bas dans son support. On mélange 2,5 g du liquide à essayer avec 2,5 g de cellulose séchée dans un bécher en verre à l'aide d'un agitateur en verre ([2]). Pour des raisons de sécurité, lors de cette opération, le manipulateur devrait s'abriter derrière un écran de protection. Si le mélange s'enflamme spontanément au cours du mélange ou du remplissage, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai. On remplit la bombe en plusieurs fois en tassant par petits chocs contre un objet dur; on s'assure qu'il n'y a pas de vide autour de l'enroulement de chauffage et que le mélange est directement en contact avec celui-ci. On doit cependant veiller à ne pas déformer l'enroulement en tassant le mélange car cela pourrait entraîner des résultats erronés ([3]). On met en place le disque de rupture et on visse le bouchon à évent en le bloquant. La bombe chargée est alors posée sur le porte-bombe, disque de rupture vers le haut, l'ensemble étant placé dans une hotte blindée ou dans une chambre de tir. On raccorde les bornes extérieures du bouchon de mise à feu à une source électrique et on applique au dispositif de chauffage un courant de 10 A. Il ne devrait pas s'écouler plus de 10 minutes entre le début de la préparation du mélange et le moment de la mise sous tension.

Le signal émis par le capteur de pression est enregistré sur un système permettant d'effectuer un enregistrement permanent de la courbe pression/temps et une analyse de cette courbe (enregistreur de signaux transitoires couplé à un enregistreur à bande de papier par exemple). Le mélange est chauffé jusqu'à rupture du disque ou pendant une durée d'au moins 60 s. S'il n'y a pas rupture, on doit attendre que le mélange ait refroidi avant d'ouvrir la bombe prudemment au cas où celle-ci serait encore sous pression. Cinq essais sont exécutés avec le mélange et avec chacune des substances de référence. On note le temps nécessaire pour monter de 690 kPa à 2 070 kPa (pression manométrique). Le temps moyen de montée en pression est calculé.

Dans certains cas, des substances peuvent engendrer une augmentation de pression (trop élevée ou trop faible), due à des réactions chimiques non caractéristiques des propriétés comburantes de ces substances. Il peut alors se révéler nécessaire de répéter l'épreuve en remplaçant la cellulose par une substance inerte, par exemple la diatomite (kieselguhr), afin de s'assurer de la nature de la réaction.

([1]) Les mélanges de substances comburantes avec de la cellulose doivent être traités comme potentiellement explosifs et manipulés avec le plus grand soin.

([2]) Dans la pratique, cela peut être réalisé en préparant un mélange 1:1 du liquide à essayer et de cellulose en quantité plus importante que ce qui est nécessaire pour l'essai et en transférant 5 ± 0,1 g dans la bombe. Un nouveau mélange doit être préparé pour chaque essai.

([3]) Il convient notamment d'éviter tout contact entre les spires adjacentes de la bobine.

▼B

2. **DONNÉES**

Temps de montée en pression à la fois pour la substance à essayer et pour la (les) substance(s) de référence. Temps de montée en pression pour les essais avec une substance inerte, le cas échéant.

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Le temps moyen de montée en pression est calculé à la fois pour la substance à essayer et pour la (les) substances(s) de référence.

Le temps moyen de montée en pression est calculé pour les essais réalisés, avec une substance inerte (le cas échéant).

Le tableau 1 présente quelques exemples.

Tableau 1

Exemples de résultats [a]

Substance [b]	Temps moyen de montée en pression pour un mélange 1:1 avec de la cellulose (ms)
Dichromate d'ammonium, solution aqueuse saturée	20 800
Nitrate de calcium, solution aqueuse saturée	6 700
Nitrate ferrique, solution aqueuse saturée	4 133
Perchlorate de lithium, solution aqueuse saturée	1 686
Perchlorate de magnésium, solution aqueuse saturée	777
Nitrate de nickel, solution aqueuse saturée	6 250
Acide nitrique, 65 %	4 767 [c]
Acide perchlorique, 50 %	121 [c]
Acide perchlorique, 55 %	59
Nitrate de potassium, 30 % solution aqueuse	26 690
Nitrate d'argent, solution aqueuse saturée	[d]
Chlorate de sodium, 40 % solution aqueuse	2 555 [c]
Nitrate de sodium, 45 % solution aqueuse	4 133
Substance inerte	
Eau: cellulose	[d]

[a] Voir référence (1) pour le classement au transport selon le système des Nations unies.
[b] Les solutions saturées doivent être préparées à 20 °C.
[c] Valeur moyenne d'après des essais interlaboratoires de comparaison.
[d] Pression maximale de 2 070 kPa non atteinte.

▼B

3. **COMPTE RENDU**

3.1. COMPTE RENDU DE L'ESSAI

Le compte rendu de l'essai doit comprendre les informations suivantes:

— l'identité, la composition, la pureté, etc. de la substance essayée,

— la concentration de la substance,

— la méthode de séchage de la cellulose employé,

— la teneur en eau de la cellulose utilisé,

— le résultat des mesures,

— le résultat des essais réalisés avec une substance inerte, le cas échéant,

— les temps moyens de montée en pression calculés,

— tout écart par rapport à cette méthode et les raisons de celui-ci,

— toute information ou remarque complémentaire présentant un intérêt pour l'interprétation des résultats.

3.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS ([1])

Pour l'évaluation des résultats, on se fonde:

a) sur le fait que le mélange substance à essayer/cellulose s'enflamme spontanément ou non;

b) sur la comparaison du temps moyen de montée de 690 kPa à 2 070 kPa (pression manométrique) avec le temps moyen obtenu pour la (les) substance(s) de référence.

Une substance liquide doit être considérée comme comburante lorsque:

a) un mélange 1:1, en poids, de la substance et de cellulose s'enflamme spontanément; ou

b) un mélange 1:1, en poids, de la substance et de cellulose présente un temps moyen de montée en pression inférieur ou égal au temps moyen de montée en pression d'un mélange 1:1, en poids, d'une solution aqueuse d'acide nitrique à 65 % (poids/poids) et de cellulose.

Afin d'éviter les faux positifs, il y a lieu, si nécessaire, de tenir également compte, lors de l'interprétation des résultats, des résultats obtenus dans les essais de la substance avec un matériel inerte.

([1]) Voir la référence 1 pour l'interprétation des résultats des essais effectués selon le règlement des Nations unies sur le transport, qui utilisent plusieurs substances de référence.

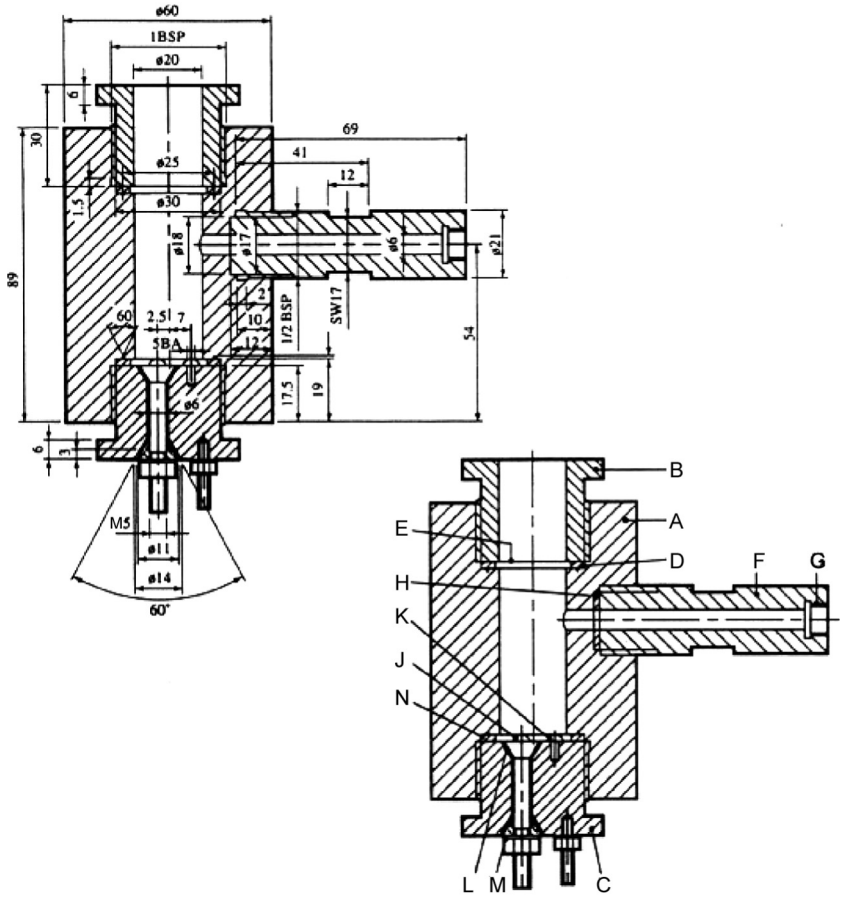
▼B

4. **RÉFÉRENCES**

(1) Recommandations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.lO/11/Rev. 3, 1999, page 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Figure 1

Bombe



(A) Corps de la bombe

(B) Bouchon retenant le disque de rupture

(C) Bouchon de mise à feu

(D) Joint en plomb mou

(E) Disque de rupture

(F) Raccord de prise de pression

(G) Taraudage pour capteur de pression

(H) Joint

(J) Électrode isolée

(K) Électrode mise à la masse

(L) Isolation

(M) Cône en acier

(N) Rainure de matage du joint

▼B

Figure 2

Porte-bombe

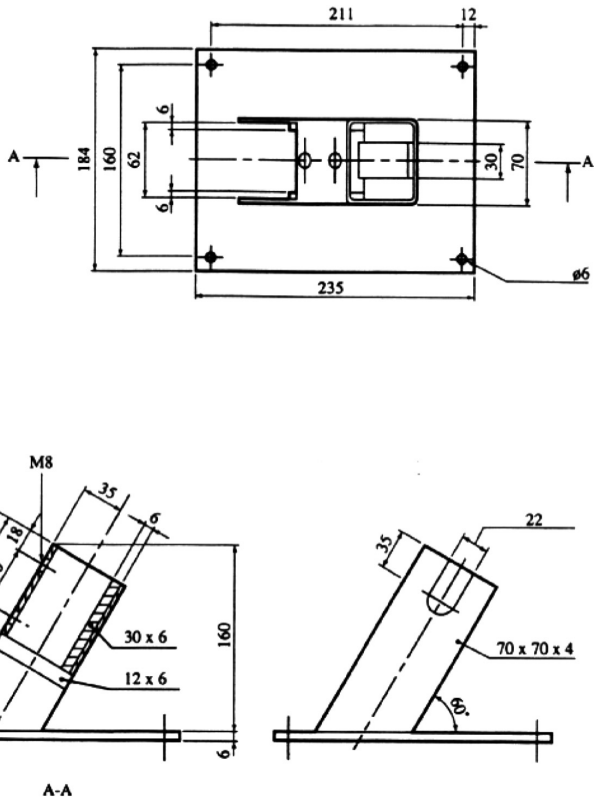
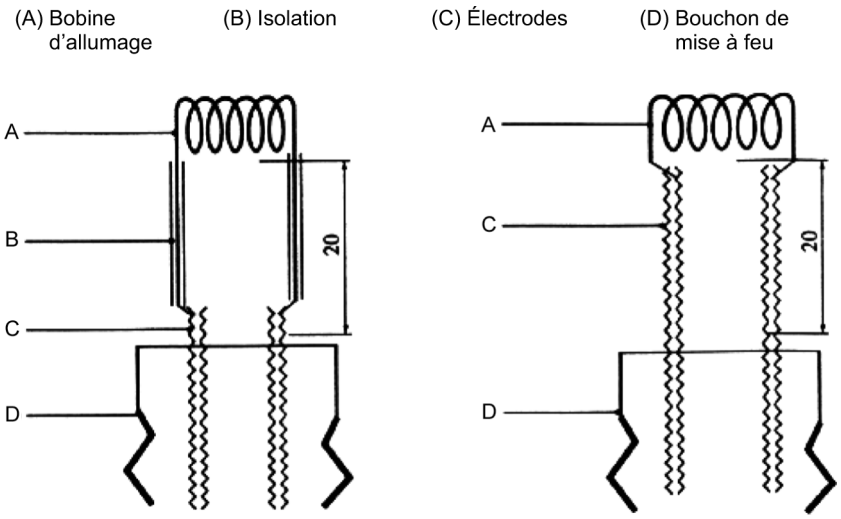


Figure 3

Système d'allumage



▼M1

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

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode décrit une procédure permettant de mesurer le diamètre moyen géométrique pondéré par la longueur (LWGMD) de fibres minérales artificielles (FMA) en vrac. Dans la mesure où le LWGMD de la population a une probabilité de 95 % d'être compris dans les limites de confiance à 95 % (LWGMD ± deux erreurs types) de l'échantillon, la valeur rapportée (valeur d'essai) sera la limite de confiance inférieure à 95 % de l'échantillon (c'est-à-dire LWGMD — deux erreurs types). Cette méthode repose sur une mise à jour (juin 1994) d'une ébauche de procédure industrielle du HSE approuvée lors d'une réunion entre l'ECFIA et le HSE, à Chester, le 26 septembre 1993, et développée aux fins et sur la base d'un deuxième essai interlaboratoire (1, 2). Cette méthode de mesure peut être utilisée pour caractériser le diamètre des fibres de substances ou de produits en vrac contenant des FMA, et notamment des fibres céramiques réfractaires (FCR), des fibres vitreuses artificielles (FVA) et des fibres cristallines et polycristallines.

La pondération par la longueur permet de compenser les répercussions sur la distribution du diamètre de la cassure des fibres longues lors de l'échantillonnage ou de la manipulation du matériau. Des statistiques géométriques (moyenne géométrique) sont utilisées pour mesurer la distribution des diamètres des FMA dans la mesure où cette distribution est en général proche de la loi log-normale.

La mesure de la longueur et du diamètre est une opération à la fois fastidieuse et longue, mais si seules les fibres en contact avec une ligne infiniment mince du champ de vision d'un MEB sont mesurées, la probabilité de sélectionner une fibre donnée est proportionnelle à sa longueur. Comme cette méthode tient compte de la longueur dans les calculs de pondération par la longueur, la seule mesure requise est le diamètre et le LWGMD-2ET peut être calculé comme décrit.

1.2. DÉFINITIONS

Particule: objet dont le rapport longueur/largeur est inférieur à 3:1.

Fibre: objet dont le rapport longueur/largeur (rapport d'aspect) est d'au moins 3:1.

1.3. PORTÉE ET LIMITATIONS

Cette méthode est conçue pour examiner la distribution des diamètres ayant un diamètre moyen compris entre 0,5 μm et 6 μm. Les diamètres supérieurs peuvent être mesurés à l'aide d'un grossissement inférieur du BEM, mais cette méthode est de plus en plus limitée à mesure que les distributions de fibres deviennent plus fines. Il est dès lors conseillé d'effectuer les mesures avec un microscope électronique à transmission (MET) si le diamètre moyen est inférieur à 0,5 μm.

▼M1

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Un certain nombre d'échantillons représentatifs sont prélevés sur un tissu en fibres ou dans un rembourrage en vrac. La longueur des fibres en vrac est réduite par pressage, puis un sous-échantillon représentatif est dispersé dans de l'eau. Des aliquotes sont extraites et filtrées à l'aide d'un filtre en polycarbonate à pores de 0,2 μm, avant d'être préparées pour l'examen à l'aide de techniques de microscopie électronique à balayage (MEB). Les diamètres des fibres sont mesurés grâce à un grossissement de l'écran de × 10 000 ou plus ([1]) à l'aide d'un échantillonnage linéaire, de manière à obtenir une estimation impartiale du diamètre moyen. L'intervalle de confiance inférieur à 95 % (sur la base d'un test unilatéral) est calculé afin d'obtenir une estimation de la valeur minimale du diamètre moyen géométrique des fibres du matériau.

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.5.1. **Sécurité/Précautions**

Il conviendra de réduire au minimum l'exposition aux fibres en suspension dans l'atmosphère, ainsi que d'utiliser une hotte ou une boîte à gants lors de la manipulation des fibres. Des contrôles périodiques de l'exposition du personnel seront réalisés afin de déterminer l'efficacité des méthodes de contrôle. Lors de la manipulation des FMA, le personnel portera des gants jetables afin de réduire les risques d'irritation cutanée et d'éviter toute contamination croisée.

1.5.2. **Appareillage/Équipement**

— Presses et matrices (capables de produire 10 MPa).

— Filtres en polycarbonate à pores capillaires de 0,2 μm (25 mm de diamètre).

— Filtre membrane en ester de cellulose à pores de 5 μm destiné à être utilisé comme filtre secondaire.

— Appareil de filtration en verre (ou systèmes de filtration jetables) conçus pour accueillir des filtres de 25 mm de diamètre (par exemple, kit de microanalyse en verre Millipore, type nº XX10 025 00).

— Eau fraîchement distillée et filtrée au travers d'un filtre à pores de 0,2 μm pour éliminer les micro-organismes.

— Pulvérisateur cathodique avec cible en or ou or/palladium.

— Microscope électronique à balayage avec une résolution pouvant descendre jusqu'à 10 nm et un grossissement × 10 000.

— Divers: spatules, lame de scalpel de type 24, petites pinces, tubes MEB, colle carbone ou papier adhésif carbone, argent colloïdal.

— Sonde ultrasonore ou bain d'ultrasons de laboratoire

— Sonde ou perce-bouchon pour prélever des échantillons dans le tissu de FMA

([1]) Cette valeur de grossissement est indiquée pour les fibres de 3 μm. Pour les fibres de 6 μm, un grossissement de × 5 000 peut s'avérer plus pertinent.

▼**M1**

1.5.3. **Procédure d'essai**

1.5.3.1. *Échantillonnage*

Pour les tissus et les bains, une sonde ou un perce-bouchon de 25 mm est utilisé pour prélever des échantillons de la coupe transversale. Les prélèvements doivent être effectués à des intervalles identiques sur toute la largeur d'une petite longueur de tissu ou être recueillis dans des zones aléatoires si de grandes longueurs sont disponibles. Le même équipement peut être utilisé pour extraire des échantillons aléatoires dans du rembourrage. Chaque fois que possible, six échantillons seront prélevés de manière à refléter les variations spatiales dans le matériau en vrac.

Les six échantillons doivent être pressés dans une matrice de 50 mm de diamètre à 10 MPa. Le matériau est ensuite mélangé à l'aide d'une spatule et pressé à nouveau à 10 MPa. Le matériau est ensuite retiré de la matrice et conservé dans une bouteille en verre hermétiquement fermée.

1.5.3.2. *Préparation de l'échantillon*

Si nécessaire, les liants organiques peuvent être éliminés en plaçant la fibre à l'intérieur d'un four à 450 °C pendant environ une heure.

Utilisez des cônes pour la délimitation et coupez des quarts pour subdiviser l'échantillon (cette opération doit être réalisée à l'intérieur d'une enceinte à poussières).

Avec une spatule, ajoutez une petite quantité (< 0,5 g) d'échantillon à 100 ml d'eau fraîchement distillée et filtrée à l'aide d'un filtre membrane de 0,2 μm (d'autres sources d'eau ultrapure peuvent être utilisées à condition qu'elles soient de qualité satisfaisante). Dispersez soigneusement à l'aide d'une sonde ultrasonore fonctionnant à 100 W et réglée pour produire une cavitation (si vous ne disposez pas de sonde, utilisez la méthode suivante: agitez à plusieurs reprises et retournez pendant 30 secondes; envoyez des ultrasons dans un bain d'ultrasons de laboratoire pendant cinq minutes: puis agitez à nouveau à plusieurs reprises et retournez pendant 30 secondes supplémentaires).

Directement après la dispersion de la fibre, retirez un certain nombre d'aliquotes (par exemple, trois aliquotes de 3, 6 et 10 ml) à l'aide d'une pipette à goulot large (capacité de 2-5 ml).

Filtrez sous vide chaque aliquote au travers d'un filtre en polycarbonate de 0,2 μm soutenu par un filtre secondaire MEC à pores de 5 μm, en utilisant un entonnoir de filtration en verre de 25 mm avec un réservoir cylindrique. Placez environ 5 ml d'eau distillée filtrée dans l'entonnoir et pipetez lentement l'aliquote dans l'eau en tenant l'embout de la pipette sous le ménisque. La pipette et le réservoir doivent être soigneusement nettoyés après le pipetage dans la mesure où les fibres minces ont tendance à se situer plus à la surface.

Retirez le filtre en douceur et séparez-le du filtre secondaire avant de le placer dans un récipient pour qu'il sèche.

▼M1

Coupez un quart ou une moitié de la section du dépôt filtré avec une lame de scalpel de type 24 par un mouvement d'oscillation. Fixez soigneusement la section coupée sur la plaque d'un MEB à l'aide d'adhésif ou de colle carbone. L'argent colloïdal doit être appliqué à au moins trois endroits afin d'améliorer le contact électrique sur les bords du filtre et de la plaque. Lorsque la colle/l'argent colloïdal est sec/sèche, pulvérisez cathodiquement environ 50 nm d'or ou d'or/palladium sur la surface du dépôt.

1.5.3.3. *Étalonnage et fonctionnement du MEB*

1.5.3.3.1. Étalonnage

L'étalonnage du MEB doit être vérifié au moins une fois par semaine (idéalement une fois par jour) à l'aide d'une grille d'étalonnage certifiée. Les valeurs de l'étalonnage doivent être comparées à une norme certifiée, et si la valeur mesurée (MEB) se situe en dehors de la plage de ± 2 % de la valeur certifiée, l'étalonnage du MEB doit être ajusté et une nouvelle fois vérifié.

Le MEB doit offrir au minimum une résolution d'un diamètre minimal visible de 0,2 µm, en utilisant une matrice de prélèvement réelle et à un grossissement de × 2 000.

1.5.3.3.2. Fonctionnement

Le MEB doit être utilisé à un grossissement de 10 000 ([1]) dans des conditions offrant une bonne résolution et une image acceptable à des vitesses de balayage réduites (par exemple, 5 secondes par trame). Bien que les conditions de fonctionnement de MEB différents puissent varier, il convient en général, pour obtenir les meilleures visibilité et résolution possibles avec des matériaux de poids atomique relativement faible, d'utiliser des tensions d'accélération de 5-10 keV avec une dimension du spot réduite et une petite distance de travail. Comme une traversée linéaire est réalisée, il convient d'utiliser une inclinaison de 0^{o} pour réduire au minimum le recentrage ou, si le MEB a une phase eucentrique, d'utiliser la distance de travail eucentrique. Un grossissement inférieur peut être utilisé si le matériau ne contient pas de petites fibres et que les diamètres des fibres sont importants (> 5 µm).

1.5.3.4. *Mesurage*

1.5.3.4.1. Examen à faible grossissement pour analyse de l'échantillon

Au départ, l'échantillon doit être examiné avec un faible grossissement afin de déterminer s'il y a agglutination des grandes fibres et pour déterminer la densité des fibres. En cas d'agglutination excessive, il est conseillé de préparer un nouvel échantillon.

Pour garantir la fiabilité des statistiques, il convient de mesurer un nombre minimal de fibres. Une densité élevée des fibres est souhaitable dans la mesure où l'examen de champs vides prend du temps et n'apporte rien à l'analyse. Cependant, si le filtre est surchargé, il peut devenir difficile de mesurer toutes les fibres mesurables. En outre, dans la mesure où les petites fibres risquent d'être cachées par les grandes, elles sont susceptibles de ne pas être vues.

([1]) Pour les fibres de 3 µm, voir la note de bas de page précédente.

▼**M1**

Une densité supérieure des fibres de 150 fibres par millimètre de traversée linéaire peut entraîner une surestimation du LWGMD. D'un autre côté, les faibles concentrations de fibres augmentent le temps d'analyse. Il est en outre souvent plus intéressant du point de vue du coût de préparer un échantillon d'une densité proche de la valeur optimale que de persister à dénombrer des filtres à faible concentration. La densité de fibres optimale doit donner une moyenne d'environ une ou deux fibres dénombrables par champ de vision à un grossissement de 5 000. Cependant, dans la mesure où la densité optimale dépend de la taille (diamètre) des fibres, l'opérateur devra décider si la densité des fibres est proche ou non de la valeur optimale.

1.5.3.4.2. Pondération par la longueur du diamètre des fibres

Seules les fibres qui touchent (ou traversent) une ligne (infiniment) mince tracée sur l'écran du MEB sont comptées. C'est la raison pour laquelle une ligne horizontale (ou verticale) est tracée en travers du centre de l'écran.

Il est également possible de placer un point unique au centre de l'écran et de procéder à un balayage continu dans une seule direction à travers le filtre. Toute fibre dont le rapport d'aspect est supérieur à 3:1 et qui touche ou traverse ce point voit son diamètre mesuré et enregistré.

1.5.3.4.3. Mesure des fibres

Il est recommandé de mesurer au moins 300 fibres. Chaque fibre est mesurée une seule fois, au point d'intersection avec la ligne ou le point tracé(e) sur l'image (ou à proximité du point d'intersection si les bords de la fibre sont cachés). Si des fibres présentant des coupes transversales non uniformes sont présentes, une mesure représentant le diamètre moyen de la fibre doit être utilisée. Le plus grand soin devra être accordé à la définition du bord et à la mesure de la distance la plus courte entre les bords des fibres. La mesure peut être effectuée en ligne ou hors ligne, sur des images ou des photos enregistrées. Il est recommandé d'utiliser des systèmes de mesure d'image semi-automatiques qui transfèrent directement les données dans une feuille de calcul, dans la mesure où ils permettent de gagner du temps, d'éviter les erreurs de transcription et d'automatiser les calculs.

Les extrémités des grandes fibres doivent être vérifiées à un grossissement plus faible afin de s'assurer qu'elles ne reviennent pas dans le champ de vision où est effectué le mesurage et qu'elles ne sont mesurées qu'une seule fois.

2. **DONNÉES**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

En général, les diamètres des fibres n'ont pas une distribution normale. Il est cependant possible d'obtenir une distribution proche de la normale en effectuant une transformation log.

Calculez la moyenne arithmétique (lnD moyenne) et l'écart-type (SD_{lnD}) du log par rapport aux valeurs de base (lnD) des diamètres des fibres n (D).

$$\text{moyen lnD} = \frac{\sum \text{lnD}}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{moyen } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

L'écart-type est divisé par la racine carrée du nombre de mesures (n) pour obtenir l'erreur type (ET_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Soustrayez deux fois l'erreur type de la moyenne et calculez l'exponentielle de cette valeur (moyenne moins deux erreurs types) pour obtenir la moyenne géométrique moins deux erreurs types géométriques.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{moyen } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **RÉSULTATS**

PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra au minimum les informations suivantes:

— la valeur de LWGMD-2ET,

— toutes les déviations, en particulier celles qui risquent d'affecter la précision et la fiabilité des résultats, ainsi que les justifications correspondantes.

4. **RÉFÉRENCES**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

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

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 123 (2006) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La méthode du brassage lent a permis de déterminer avec exactitude des valeurs logarithmiques du coefficient de partage 1-octanol/eau (P_{OE}) allant jusqu'à 8,2 ([1]). Aussi constitue-t-elle une approche expérimentale appropriée pour la détermination directe du P_{OE} de substances fortement hydrophobes.

2. Les autres méthodes de détermination du coefficient de partage 1-octanol/eau (P_{OE}), sont la méthode par agitation en flacon (2) et la méthode par HPLC phase inverse (3). La méthode par agitation en flacon est sujette à des artéfacts dus au transfert de micro-gouttelettes d'octanol dans la phase aqueuse. Lorsque les valeurs du P_{OE} augmentent, la présence de ces gouttelettes dans la phase aqueuse engendre une surestimation croissante de la concentration de la substance d'essai dans l'eau. Aussi l'usage de cette méthode est-il limité aux substances dont le log P_{OE} est < 4. À partir de valeurs fiables du P_{OE} directement déterminées, la deuxième méthode étalonne la relation entre le temps de rétention sur la colonne HPLC et des valeurs mesurées du P_{OE}. Il existait un projet de ligne directrice de l'OCDE permettant de déterminer les coefficients de partage 1-octanol/eau de substances ionisables (4), mais il ne doit plus être utilisé.

3. La présente méthode d'essai a été élaborée aux Pays-Bas. La précision des méthodes décrites dans ce pays a été validée et optimisée au cours d'un essai tournant de validation auquel ont participé 15 laboratoires (5).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

Signification et utilisation

4. S'agissant des substances organiques inertes, une relation très significative a été mise en évidence entre leur coefficient de partage 1-octanol/eau (P_{OE}) et leur bioaccumulation dans les poissons. De plus, une corrélation entre le P_{OE} et, d'une part, la toxicité pour les poissons et, d'autre part, la sorption de produits chimiques sur des solides tels que les sols et les sédiments, a également été démontrée. La référence (6) livre un large aperçu de ces relations.

5. Des relations très diverses entre le coefficient de partage 1-octanol/eau et d'autres propriétés des substances intéressant la chimie et la toxicologie environnementales ont été établies. Le coefficient de partage 1-octanol/eau est ainsi devenu un paramètre fondamental dans l'évaluation des risques des substances chimiques pour l'environnement et dans la prédiction du devenir de ces substances dans l'environnement.

Champ d'application

6. La méthode du brassage lent est censée réduire la formation de micro-gouttelettes de 1-octanol dans la phase aqueuse, ce qui écarte le problème de la surestimation de la concentration en phase aqueuse due à la présence de molécules de la substance d'essai dans ces gouttelettes. Par conséquent, la méthode du brassage lent convient particulièrement à la détermination du P_{OE} de substances dont le log P_{OE} est supposément supérieur ou égal à 5, gamme dans laquelle la méthode par agitation en flacon (2) tend à fournir des résultats faussés.

▼M4

DÉFINITION ET UNITÉS

7. Le coefficient de partage d'une substance entre l'eau et un solvant lipophile (1-octanol) caractérise la répartition à l'équilibre de la substance chimique entre les deux phases. Le coefficient de partage entre l'eau et le 1-octanol (P_{OE}) est défini comme étant le rapport des concentrations à l'équilibre de la substance d'essai dans du 1-octanol saturé avec de l'eau (C_O) et dans de l'eau saturée avec du 1-octanol (C_E).

$$P_{OE} = C_O/C_E$$

Le rapport de deux concentrations est une valeur adimensionnelle. Il est exprimé le plus souvent par son logarithme décimal (log P_{OE}). Le P_{OE} dépend de la température et les résultats rapportés doivent préciser la température de mesure.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

8. En vue de déterminer le coefficient de partage, on laisse le système formé par l'eau, le 1-octanol et la substance d'essai s'équilibrer à température constante. Ensuite, on mesure les concentrations de la substance d'essai dans les deux phases.

9. La méthode du brassage lent, proposée ici, permet de réduire les difficultés expérimentales associées à la formation de micro-gouttelettes dans la méthode par agitation en flacon. Avec le brassage lent, l'eau, le 1-octanol et la substance d'essai s'équilibrent dans un réacteur thermostaté soumis à une agitation douce. Les échanges entre les phases sont accélérés par le brassage. Ce dernier produit une légère turbulence qui favorise les échanges entre le 1-octanol et l'eau sans provoquer la formation de gouttelettes (1).

APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

10. La présence de substances autres que la substance d'essai risquant d'influencer le coefficient d'activité de la substance d'essai, celle-ci doit être testée à l'état pur. Il convient d'employer une substance d'essai présentant le degré de pureté le plus élevé que l'on puisse trouver dans le commerce.

11. Cette méthode s'applique aux substances pures qui ne se dissocient ni s'associent et qui ne manifestent aucune activité interfaciale sensible. Cette méthode convient également aux mélanges. Le cas échéant, les coefficients de partage 1-octanol/eau déterminés varient en fonction de la composition chimique du mélange testé et de la composition électrolytique employée comme phase aqueuse. À condition de prendre certaines mesures supplémentaires, cette méthode peut aussi s'appliquer à des substances qui se dissocient ou s'associent (paragraphe 12).

12. Le partage des substances sujettes à la dissociation, telles que les acides organiques et les phénols, les bases organiques et les composés organométalliques, entre l'eau et le 1-octanol comportant de multiples équilibres dans ces phases, le P_{OE} est une constante conditionnelle qui dépend fortement de la composition électrolytique (7) (8). D'où la nécessité de contrôler le pH et la composition électrolytique lors de la détermination du P_{OE} et de rapporter les valeurs de ces deux paramètres. L'évaluation de ces coefficients de partage doit être confiée à un expert. Il convient de sélectionner des valeurs de pH appropriées d'après la valeur de la ou des constantes de dissociation, afin d'établir un coefficient de partage pour chaque état d'ionisation. Les composés organométalliques doivent être testés à l'aide de tampons non complexants (8). À la lumière des connaissances actuelles en matière de chimie en phase aqueuse (constantes de complexation et de dissociation), on choisira des conditions expérimentales permettant d'estimer la formation d'espèces par la substance d'essai en phase aqueuse. Il faut instaurer une force ionique identique dans toutes les expériences en employant un électrolyte de fond.

▼M4

13. Les substances peu solubles dans l'eau ou présentant un P_{OE} élevé peuvent engendrer des problèmes dus au fait que leurs concentrations dans l'eau sont si faibles qu'il devient difficile de les déterminer avec exactitude. La présente méthode d'essai livre des indications sur la manière de traiter ce problème.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

14. Le degré de pureté des réactifs chimiques doit au moins correspondre à celui de la qualité pour analyse. Il est recommandé d'utiliser des substances d'essai non marquées de composition chimique connue et d'une pureté d'au moins 99 % ou des substances d'essai radiomarquées de composition chimique et pureté radiochimique connues. S'il s'agit de traceurs à demi-vie courte, on appliquera des corrections pour tenir compte de la désintégration. Si la substance d'essai est radiomarquée, il y a lieu d'employer une méthode analytique spécifique à la substance de telle sorte que la radioactivité mesurée se rapporte directement à la substance d'essai.

15. Il est possible d'estimer le log P_{OE} avec les logiciels vendus dans le commerce à cet effet, ou en s'appuyant sur le rapport des solubilités dans les deux solvants.

16. Avant de déterminer le P_{OE} par la méthode du brassage lent, il faut disposer des informations suivantes sur la substance d'essai:

a) formule structurale;

b) méthodes analytiques appropriées à la détermination de la concentration de la substance dans l'eau et dans le 1-octanol;

c) constante(s) de dissociation des substances ionisables [ligne directrice 112 de l'OCDE (9)];

d) solubilité dans l'eau (10);

e) hydrolyse abiotique (11);

f) biodégradabilité immédiate (12);

g) pression de vapeur (13).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Matériel et appareillage

17. Cette expérience nécessite du matériel courant de laboratoire, et en particulier:

— des agitateurs magnétiques et des barres d'agitation magnétiques recouvertes de Teflon pour agiter la phase aqueuse,

— des instruments d'analyse permettant de déterminer la concentration de la substance d'essai aux concentrations attendues,

— une bouteille à agiter munie d'un robinet à sa base. Suivant l'estimation du log P_{OE} et le seuil de détection de la substance d'essai, on envisagera d'utiliser un réacteur d'un volume supérieur à un litre, de la même géométrie, de manière à obtenir un volume d'eau suffisant pour l'extraction et l'analyse chimiques de la substance d'essai. La concentration de la substance d'essai dans l'extrait aqueux sera donc plus élevée, ce qui rendra la détermination analytique plus fiable. Un tableau reproduisant des estimations du volume minimal requis, le seuil de détection de la substance, l'estimation de son log P_{OE} et de sa solubilité dans l'eau figure en appendice 1. Ce tableau se fonde sur la relation entre le log P_{OE} et le rapport des solubilités dans l'octanol et dans l'eau, telle que présentée par Pinsuwan *et al.* (14):

$$\log P_{OE} = 0,88 \log SR + 0,41$$

▼M4

avec

$SR = S_{oct}/S_{eau}$ (en molarité),

et sur la relation donnée par Lyman (15) pour prédire la solubilité dans l'eau. Les solubilités dans l'eau calculées avec l'équation donnée à l'appendice 1 sont à considérer comme une première estimation. Notons que l'utilisateur est libre d'estimer la solubilité dans l'eau à l'aide de n'importe quelle autre relation jugée mieux représenter la relation entre l'hydrophobie et la solubilité. S'agissant des substances solides, l'inclusion du point de fusion dans la prédiction de la solubilité est par exemple recommandée. Si l'on utilise une équation modifiée, il faut vérifier que l'équation permettant de calculer la solubilité dans l'octanol est toujours valable. Une bouteille à agiter recouverte d'une enveloppe de verre et d'une capacité d'environ un litre est schématisée en appendice 2. Les proportions de la bouteille représentée en appendice 2 se sont avérées propices et doivent être conservées si la dimension de l'appareil est modifiée,

— il est essentiel de maintenir la température constante durant le brassage lent, à l'aide d'un dispositif adéquat.

18. Les récipients doivent être composés d'un matériau inerte rendant négligeable l'adsorption à la surface des récipients.

Préparation des solutions expérimentales

19. La détermination du P_{OE} requiert un 1-octanol de la qualité la plus pure qui puisse se trouver dans le commerce (au moins 99 %). Il est recommandé de purifier le 1-octanol par une extraction réalisée avec un acide, une base et de l'eau, suivie d'un séchage. Le 1-octanol peut, en plus, être purifié par distillation. Les solutions étalons des substances d'essai doivent être préparées avec du 1-octanol purifié. L'eau destinée à la détermination du P_{OE} doit être distillée à l'aide d'un dispositif en verre ou en quartz, ou traitée par un système de purification, ou encore être de qualité HPLC. Il convient de filtrer l'eau distillée à travers des mailles de 0,22 μm et d'inclure des blancs afin de s'assurer que les extraits concentrés ne renferment pas d'impuretés susceptibles d'interférer avec la substance d'essai. Si l'on emploie un filtre en fibres de verre, il faut le nettoyer en le laissant au moins trois heures dans un four à 400 °C.

20. Afin de saturer chaque solvant par l'autre avant l'expérience, on les équilibre dans un récipient suffisamment grand. Pour ce faire, le système à deux phases est soumis à un brassage lent durant deux jours.

21. Une concentration appropriée de la substance d'essai est choisie et dissoute dans du 1-octanol (saturé avec de l'eau). Il y a lieu de déterminer le coefficient de partage 1-octanol/eau dans des solutions diluées dans du 1-octanol et de l'eau. Aussi la concentration de la substance d'essai ne doit-elle pas excéder 70 % de sa solubilité avec une concentration maximale de 0,1 M dans chaque phase (1). Les solutions de 1-octanol utilisées pour l'expérience seront exemptes de substance d'essai en suspension à l'état solide.

22. La quantité appropriée de substance d'essai est dissoute dans du 1-octanol (saturé avec de l'eau). Si l'estimation du log P_{OE} est supérieure à 5, il faut s'assurer que les solutions de 1-octanol utilisées pour l'expérience ne renferment pas de substance d'essai en suspension à l'état solide. À cette fin, la procédure suivante est appliquée pour les substances chimiques dont la valeur estimée de log $P_{OE} > 5$:

— la substance d'essai est dissoute dans du 1-octanol (saturé avec de l'eau),

▼M4

— on laisse reposer la solution suffisamment longtemps pour que la substance suspendue à l'état solide se dépose. Durant la décantation, la concentration de la substance d'essai est mesurée en continu,

— une fois que les concentrations mesurées dans la solution de 1-octanol ont atteint une valeur stable, la solution mère est diluée avec un volume approprié de 1-octanol,

— la concentration de la solution mère diluée est mesurée. Si la concentration mesurée concorde avec la dilution, la solution mère diluée peut être utilisée dans le processus expérimental du brassage lent.

Extraction et analyse des échantillons

23. Le dosage de la substance d'essai s'effectue par une méthode analytique validée. Les chercheurs doivent prouver que, durant l'essai, les concentrations dans le 1-octanol saturé avec de l'eau et dans la phase aqueuse saturée avec du 1-octanol sont supérieures au seuil de quantification du procédé analytique employé. Il y a lieu d'établir avant l'essai le taux de récupération par l'analyse de la substance d'essai en phase aqueuse et en phase 1-octanol, dans les cas où des méthodes d'extraction s'avèrent nécessaires. Le signal analytique doit être corrigé en fonction des blancs et l'on veillera à éviter tout transfert de la substance à analyser d'un échantillon à l'autre.

24. Les concentrations des substances d'essai hydrophobes étant plutôt faibles en phase aqueuse, il faudra probablement extraire la substance de la phase aqueuse à l'aide d'un solvant organique et préconcentrer l'extrait avant analyse. Pour la même raison, il est nécessaire de réduire les éventuelles concentrations du blanc. À cette fin, on emploie des solvants très purs, de préférence des solvants pour l'analyse des résidus. En outre, un nettoyage soigneux (par exemple lavage au solvant ou cuisson à haute température) de la verrerie avant l'expérience peut diminuer le risque de contamination croisée.

25. Il est possible d'estimer le log P_{OE} à l'aide d'un programme d'estimation ou en faisant appel à un expert. Si sa valeur est supérieure à six, d'une part il convient d'être très attentif aux corrections en fonction du blanc et à tout transfert de la substance à analyser d'un échantillon à l'autre et, d'autre part, il est impératif d'utiliser un étalon de substitution pour corriger le taux de récupération, de façon à pouvoir atteindre des facteurs de préconcentration élevés. Plusieurs logiciels d'estimation du log P_{OE} se trouvent dans le commerce ([1]), par exemple Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) et ACD logP (19). Les références (20-22) décrivent les différents procédés d'estimation.

26. Les seuils de quantification pour la détermination de la substance d'essai dans le 1-octanol et dans l'eau sont établis suivant des méthodes acceptées. Comme principe de base, le seuil de quantification de la méthode employée peut être considéré comme étant la concentration dans l'eau ou le 1-octanol qui produit un rapport signal/bruit de dix. Il convient de choisir des méthodes d'extraction et de préconcentration appropriées et de spécifier le taux de récupération de l'analyse. Le facteur de préconcentration doit être choisi de façon à produire un signal de l'intensité requise lors de la détermination analytique.

([1]) Cette information n'est fournie qu'à titre indicatif. D'autres logiciels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils produisent les mêmes résultats.

▼M4

27. En fonction des paramètres de la méthode analytique et des concentrations escomptées, on détermine le volume de l'échantillon qui permettra de déterminer avec exactitude la concentration de la substance d'essai. L'utilisation d'échantillons aqueux trop petits pour obtenir un signal analytique suffisant est à éviter. Les échantillons aqueux ne doivent pas non plus être trop grands, car le volume d'eau restant risquerait d'être insuffisant pour le nombre minimal d'analyses requises (n = 5). L'appendice 1 indique les volumes minimaux des échantillons en fonction du volume du récipient, du seuil de détection de la substance d'essai et de sa solubilité.

28. La quantification des substances d'essai s'effectue par comparaison avec les courbes d'étalonnage des substances d'essai. Les concentrations des étalons doivent figurer entre parenthèses à côté des concentrations relevées dans les échantillons analysées.

29. Pour les substances d'essai dont le log P_{OE} estimé est supérieur à six, on verse un étalon de substitution dans l'échantillon aqueux avant l'extraction afin de relever les pertes survenues durant l'extraction et la préconcentration des échantillons aqueux. Pour que la correction du taux de récupération soit correcte, les étalons de substitution doivent avoir des propriétés très semblables ou identiques à celles de la substance d'essai. À cette fin, on utilise de préférence des analogues isotopiques (stables) marqués de la substance d'essai (perdeutériés ou marqués au ^{13}C, par exemple). Si l'utilisation d'un isotope marqué stable, c'est-à-dire marqué au ^{13}C ou au ^{2}H, est impossible, il faut démontrer, en s'appuyant sur des données fiables tirées de publications, que les propriétés physico-chimiques de l'étalon de substitution sont très proches de celles de la substance d'essai. Des émulsions peuvent se former au cours de l'extraction liquide-liquide de la phase aqueuse. Pour réduire ce phénomène, on peut ajouter du sel et laisser reposer l'émulsion toute une nuit. Les méthodes utilisées pour extraire et préconcentrer les échantillons doivent être mentionnées.

30. Les échantillons prélevés dans la phase 1-octanol peuvent, si nécessaire, être dilués avec un solvant adéquat avant l'analyse. De plus, l'utilisation d'étalons de substitution pour corriger la récupération est recommandée pour les substances qui se sont avérées présenter un degré de variation élevé lors des essais de récupération (écart-type relatif supérieur à 10 %).

31. Les détails de la méthode analytique devront figurer dans le rapport. Ceux-ci incluent la méthode d'extraction, les facteurs de préconcentration et de dilution, les paramètres des instruments, le processus d'étalonnage, la gamme d'étalonnage, la récupération de la substance d'essai présente dans l'eau par un procédé analytique, l'ajout d'étalons de substitution pour corriger le taux de récupération, les valeurs des blancs, les seuils de détection et les seuils de quantification.

Déroulement de l'essai

Rapports volumiques 1-octanol/eau optimaux

32. Les volumes d'eau et de 1-octanol sont choisis en fonction du seuil de quantification dans le 1-octanol et dans l'eau, des facteurs de préconcentration appliqués aux échantillons aqueux, des volumes prélevés dans le 1-octanol et dans l'eau et des concentrations prévues. Pour des raisons expérimentales, le volume de 1-octanol employé dans le système de brassage lent doit être choisi de telle sorte que la couche de 1-octanol soit suffisamment épaisse (> 0,5 cm) pour qu'un prélèvement puisse s'effectuer dans la phase 1-octanol sans la perturber.

33. Les rapports volumiques utilisés couramment pour analyser des substances dont le log P_{OE} est supérieur ou égal à 4,5 sont de 20 à 50 ml de 1-octanol et de 950 à 980 ml d'eau dans un récipient d'un litre.

▼**M4**

Conditions expérimentales

34. Durant l'essai, le réacteur est thermostaté de manière à limiter la variation de température à moins de 1 °C. L'essai doit être conduit à 25 °C.

35. On protège le système expérimental de la lumière du jour en effectuant l'essai dans une pièce obscure ou en recouvrant le réacteur d'une feuille d'aluminium.

36. L'essai doit être mené dans un environnement aussi dépoussiéré que possible.

37. Le système 1-octanol/eau est agité jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. Le temps requis pour atteindre l'équilibre est évalué au moyen d'un essai pilote de brassage lent au cours duquel on prélève de l'eau et de l'octanol périodiquement. Les temps de prélèvement doivent être espacés d'au moins cinq heures.

38. Chaque détermination du P_{OE} doit s'effectuer sur la base d'au moins trois essais de brassage lent indépendants.

Détermination du temps requis pour parvenir à l'équilibre

39. On admet que l'équilibre est atteint lorsque la régression du rapport des concentrations dans le 1-octanol et dans l'eau en fonction du temps (la variable temps comprenant quatre point s) se traduit par une pente ne s'écartant pas de manière significative de zéro pour une valeur de p égale à 0,05. Le temps minimal requis pour atteindre l'équilibre avant de pouvoir commencer les prélèvements est d'un jour. En principe, le prélèvement des substances dont le log P_{OE} estimé est inférieur à cinq peut s'effectuer au cours des deuxième et troisième jours. Il est possible que le temps pour parvenir à l'équilibre soit plus long pour les substances plus hydrophobes. Pour une substance ayant un log P_{OE} égal à 8,23 (décachlorobiphényle), 144 heures ont été suffisantes pour atteindre l'équilibre. L'équilibre est évalué par une série de prélèvements effectués dans le même récipient.

Début de l'essai

40. On commence par remplir le réacteur avec de l'eau saturée en 1-octanol. Ensuite, on attend que le système atteigne la température requise par le thermostat.

41. La quantité voulue de substance d'essai (dissoute dans le volume requis de 1-octanol saturé en eau) est ajoutée soigneusement au réacteur. Il s'agit d'une étape critique de l'essai car il faut éviter le mélange turbulent des deux phases. À cette fin, la phase 1-octanol peut être versée doucement à l'aide d'une pipette sur la paroi du récipient d'essai, à proximité de la surface de l'eau. Elle ruissellera ainsi le long de la paroi et formera un film au dessus de la phase aqueuse. Il faut toujours éviter de décanter le 1-octanol directement dans la bouteille; on ne peut pas faire tomber des gouttes de 1-octanol directement dans l'eau.

42. Une fois l'agitation lancée, on augmente lentement sa vitesse. Si les moteurs de l'agitateur ne peuvent être réglés correctement, on envisagera d'utiliser un transformateur. La vitesse d'agitation doit être réglée de manière à créer un vortex à l'interface entre l'eau et le 1-octanol d'une profondeur de 0,5 à 2,5 cm au maximum. Il faut diminuer la vitesse d'agitation si la profondeur du vortex dépasse 2,5 cm, sinon des micro-gouttelettes de 1-octanol peuvent se former dans la phase aqueuse et donner lieu à une surestimation de la concentration de la substance d'essai dans l'eau. D'après les résultats d'un essai tournant de validation (5), on recommande d'appliquer une vitesse maximale d'agitation de 2,5 cm. Elle représente un compromis permettant de parvenir rapidement à l'équilibre tout en limitant la formation de micro-gouttelettes de 1-octanol.

▼M4

Prélèvement et traitement des échantillons

43. Il convient d'arrêter l'agitateur avant d'effectuer les prélèvements et d'attendre que les liquides s'immobilisent. Lorsque le prélèvement est terminé, l'agitateur est remis en marche doucement, comme décrit plus haut; après quoi on augmente la vitesse d'agitation progressivement.

44. La phase aqueuse est prélevée à un robinet situé à la base du réacteur. Il faut toujours éliminer le volume mort d'eau contenu dans les robinets (environ 5 ml pour le récipient illustré à l'appendice 2). L'eau retenue dans les robinets n'est pas agitée et donc pas en équilibre avec l'ensemble. On note le volume des échantillons aqueux et on vérifie que la quantité de substance d'essai présente dans l'eau éliminée est prise en compte dans l'établissement du bilan massique. Il y a lieu de réduire au minimum les pertes par évaporation en permettant à l'eau de s'écouler doucement dans l'entonnoir séparateur de façon à ne pas perturber la couche eau/1-octanol.

45. On prélève les échantillons de 1-octanol en aspirant une petite aliquote (environ 100 µl) de la couche 1-octanol au moyen d'une seringue de 100 microlitres en verre et métal. Il faut veiller à ne pas perturber l'interface. Le volume de liquide prélevé est consigné. Une petite aliquote suffit, étant donné que l'échantillon de 1-octanol sera dilué.

46. Les étapes inutiles de transfert d'échantillons sont à éviter. Aussi le volume des échantillons est-il déterminé par gravimétrie. Dans le cas des échantillons aqueux, cette détermination s'effectue par la collecte de l'échantillon aqueux dans un entonnoir séparateur contenant déjà le volume de solvant requis.

RÉSULTATS ET RAPPORT

47. La méthode d'essai prescrit de déterminer le P_{OE} en conduisant trois essais à brassage lent (trois unités expérimentales) dans des conditions expérimentales identiques. La régression utilisée pour démontrer que l'équilibre a été atteint doit s'appuyer sur les résultats d'au moins quatre déterminations du rapport C_O/C_E effectuées à quatre moments ponctuels successifs. La variance ainsi calculée correspond à une mesure de l'incertitude de la valeur moyenne obtenue pour chaque unité expérimentale.

48. Le P_{OE} peut être caractérisé par la variance des données recueillies pour chaque unité expérimentale. Cette information est employée pour calculer le P_{OE} en considérant qu'il équivaut à la moyenne pondérée des résultats de chaque unité expérimentale. Pour ce faire, l'inverse de la variance des résultats des unités expérimentales est employé comme coefficient pondérateur. Ainsi, les données accusant une forte variation (exprimée par la variance), qui sont donc moins fiables, ont moins d'influence sur le résultat que les données offrant une variance faible.

49. L'écart-type pondéré est calculé d'une manière analogue. Il caractérise la répétabilité de la mesure du P_{OE}. Un écart-type pondéré faible traduit une répétabilité élevée de la détermination du P_{OE} au sein d'un même laboratoire. Le traitement statistique formel des données est résumé ci-dessous.

▼M4

Traitement des résultats

Démonstration de la réalisation de l'équilibre

50. Le logarithme du rapport des concentrations de la substance d'essai dans le 1-octanol et dans l'eau (log C_O/C_E) est calculé pour chaque instant de prélèvement. On démontre que l'équilibre chimique est atteint en traçant une courbe de ce rapport en fonction du temps. L'apparition d'un plateau sur ce tracé, établi à partir d'au moins quatre points consécutifs sur l'axe du temps, indique que l'équilibre a été atteint et que le composé est complètement dissous dans le 1-octanol. Dans le cas contraire, il faut poursuivre l'essai jusqu'à ce que quatre points de temps successifs présentent une pente qui n'est pas significativement différente de zéro, pour une valeur de p = 0,05, montrant ainsi que le log C_O/C_E est indépendant du temps.

Calcul du log P_{OE}

51. La valeur du log P_{OE} de l'unité expérimentale correspond à la moyenne pondérée du log C_O/C_E pour la partie de la courbe du log C_O/C_E en fonction du temps, pour laquelle l'état d'équilibre a été démontré. On calcule la moyenne pondérée en pondérant les données avec l'inverse de la variance de telle sorte que l'influence des données sur le résultat final est inversement proportionnelle à l'incertitude des données.

Moyenne des log P_{OE}

52. La valeur moyenne du log P_{OE} de différentes unités expérimentales correspond à la moyenne des résultats de chaque unité expérimentale pondérés avec leurs variances respectives.

Le calcul répond à la formule suivante:

$$\log P_{OE,moy} = (\Sigma w_i \times \log P_{OE,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

où:

$\log P_{OE,i}$ = est la valeur du log P_{OE} de chaque unité expérimentale i;

$\log P_{OE\ moy}$ = est la moyenne pondérée de tous les log P_{OE};

w_i = est le poids statistique attribué à la valeur log P_{OE} de l'unité expérimentale i.

L'inverse de la variance de log $P_{OE,i}$ est représentée par w_i ($w_i = \text{var}(\log P_{OE,i})^{-1}$).

53. L'estimation de l'erreur de la moyenne de log P_{OE} correspond à la répétabilité des log C_O/C_E déterminés durant la phase d'équilibre dans chaque unité expérimentale. Elle se traduit par l'écart-type pondéré du log $P_{OE\ moy}$ ($\sigma_{\log Poe\ moy}$) qui mesure l'erreur associée au log $P_{OE\ moy}$. L'écart-type pondéré peut être calculé à partir de la variance pondérée ($\text{var}_{\log Poe\ moy}$) de la façon suivante:

$$\text{var}_{\log Poe,moy} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OE,i} - \log P_{OE,moy})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Poe,moy} = (\text{var}_{\log Poe,moy})^{0,5}$$

où n représente le nombre d'unités expérimentales.

▼M4

Rapport d'essai

54. Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nom courant, nom chimique, numéro CAS, formule structurale (montrant la position du radiomarqueur, le cas échéant) et propriétés physico-chimiques pertinentes (voir paragraphe 17),

— pureté (impuretés) de la substance d'essai,

— pureté radiochimique des substances marquées et activité molaire (s'il y a lieu),

— estimation préliminaire du log P_{OE} et méthode utilisée pour ce calcul.

Conditions expérimentales:

— dates de la réalisation des études,

— température à laquelle s'est déroulé l'essai,

— volumes de 1-octanol et d'eau au début de l'essai,

— volumes des échantillons de 1-octanol et d'eau prélevés,

— volumes de 1-octanol et d'eau restant dans les récipients expérimentaux;

— description des récipients expérimentaux et des conditions d'agitation utilisées (géométrie de la barre d'agitation et du récipient expérimental, hauteur du vortex en mm et vitesse d'agitation si elle est connue),

— méthodes analytiques utilisées pour déterminer la substance d'essai et seuil de quantification de la méthode,

— heures de prélèvement,

— pH de la phase aqueuse et tampons utilisés, lorsqu'on a ajusté le pH pour des molécules ionisables,

— nombre d'expériences identiques.

Résultats:

— répétabilité et sensibilité des méthodes analytiques employées,

— concentrations de la substance d'essai déterminées dans le 1-octanol et dans l'eau en fonction du temps,

— démonstration du bilan massique,

— température et écart-type ou gamme de températures appliquée durant l'essai,

— régression du rapport des concentrations en fonction du temps,

— valeur moyenne de $P_{OE\ moy}$ et son écart-type,

— analyse et interprétation des résultats,

▼**M4**

— exemples de données brutes d'une analyse représentative (toutes les données brutes doivent être conservées conformément aux bonnes pratiques de laboratoire), notamment le taux de récupération des produits de substitution, le nombre de niveaux appliqué à l'étalonnage (ainsi que les critères régissant le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage) et résultats de l'assurance qualité/contrôle qualité (AQ/CQ),

— s'il est disponible: rapport de validation du protocole expérimental (à mentionner parmi les références).

BIBLIOGRAPHIE:

(1) De Bruijn J.H.M., Busser F., Seinen W., Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the «slow-stirring» method. *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 499-512.

(2) Chapitre A.8 de la présente annexe, Coefficient de partition.

(3) Chapter A.8 de la présente annexe, Coefficient de partition.

(4) OCDE (2000). Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques: 122 – Coefficient de partition (n-octanol/eau): méthode par pH-métrie pour les substances ionisables. Paris.

(5) Tolls J. (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling R.S., Mackay D. (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

(7) Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M. (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

(8) Arnold C.G., Widenhaupt A., David M.M., Müller S.R., Haderlein S.B., Schwarzenbach R.P. (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.

(9) OCDE (1981) Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques: 112 – Constantes de dissociation dans l'eau. Paris.

(10) Chapitre A.6 de la présente annexe, Solubilité dans l'eau.

(11) Chapitre C.7 de la présente annexe, Dégradation – Dégradation abiotique: hydrolyse en fonction du pH.

(12) Chapitre C.4 – Parties II à VII (Méthode A à F) de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité immédiate.

(13) Chapitre A.4 de la présente annexe, Pression de vapeur.

(14) Pinsuwan S., Li A. and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.

(15) Lyman W.J. (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.

(16) Leo A., Weininger D. (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan W. (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

(19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman W.J. (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, DC.

(21) Rekker R.F., de Kort H.M. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.

(22) Jübermann O. (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

Appendice 1

Tables permettant de calculer les volumes d'eau minimaux requis pour détecter des substances d'essai ayant différentes valeurs de log P_{OE} en phase aqueuse

Hypothèses:

— Volume maximal de chaque aliquote = 10 % du volume total; 5 aliquotes = 50 % du volume total.

— Concentration des substances d'essai = $0,7 \times$ solubilité dans chaque phase. Si les concentrations sont inférieures, il faudra utiliser de plus grands volumes.

— Volume utilisé pour la détermination du seuil de détection = 100 ml.

— Log P_{OE} en fonction du log S_E et le log P_{OE} en fonction de SR (S_{oct}/S_e) sont des représentations raisonnables de relations pour les substances d'essai.

Estimation de S_e

log P_{OE}	équation	log S_e	S_e (mg/l)
4	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–0,887	1,297E-01
6	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–1,809	1,552E-02
7	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–2,731	1,858E-03
8	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–3,192	6,427E-04

Estimation de S_{oct}

log P_{OE}	équation	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,49$	2,710E+05

▼**M4**

Masse totale de la substance d'essai (mg)	$Masse_{oct}/Masse_{eau}$	$Masse_{H2O}$ (mg)	$Conc_{H2O}$ (mg/l)	$Masse_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Calcul des volumes

Volume minimal requis pour la phase H_2O à chaque concentration du seuil de détection

log K_{OE}	Seuil de détection (microgrammes/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volume utilisé pour le seuil de détection (L)	0,1					

Légende pour les calculs

Représente < 10 % du volume total de la phase aqueuse, récipient d'équilibrage de 1 litre.

Représente < 10 % du volume total de la phase aqueuse, récipient d'équilibrage de 2 litres.

Représente < 10 % du volume total de la phase aqueuse, récipient d'équilibrage de 5 litres.

Représente < 10 % du volume total de la phase aqueuse, récipient d'équilibrage de 10 litres.

Dépasse 10 % y compris du récipient d'équilibrage de 10 litres.

▼**M4**

Vue d'ensemble des volumes requis en fonction de la solubilité dans l'eau et du log P_{OE}

Volume minimal requis pour la phase H_2O à chaque concentration du seuil de détection (ml)

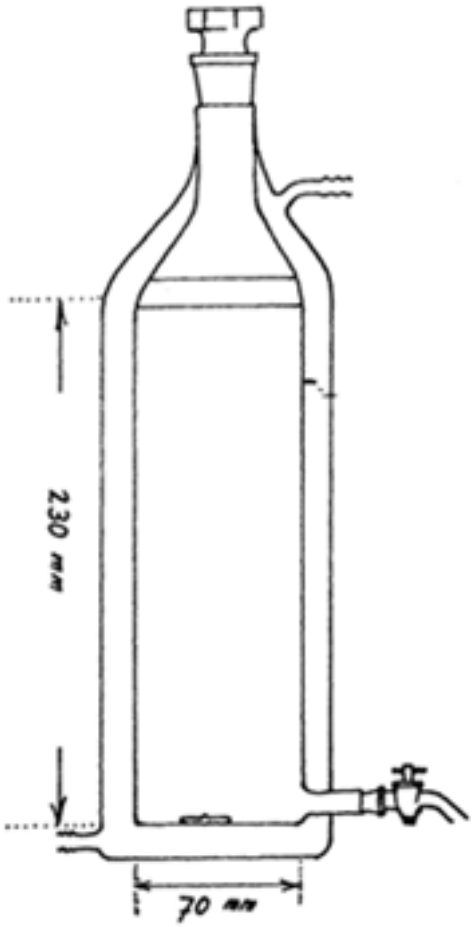
log P_{OE}	S_e (mg/l)	Seuil de détection (microgrammes/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

▼**M4**

log P_{OE}	S_e (mg/l)	Seuil de détection (microgrammes/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volume utilisé pour le seuil de détection (L)		0,1					

Appendice 2

Exemple de récipient expérimental à enveloppe de verre destiné à la détermination du P_{OE} par la méthode du brassage lent



▼B

PARTIE B: MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ ET DES AUTRES EFFETS SUR LA SANTÉ

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE

B.1 bis. TOXICITÉ ORALE AIGUË — MÉTHODE DE LA DOSE PRÉDÉTERMINÉE

B.1 ter. TOXICITÉ ORALE AIGUË — MÉTHODE DE LA CLASSE DE TOXICITÉ AIGUË

B.2. TOXICITÉ AIGUË PAR INHALATION

B.3. TOXICITÉ AIGUË (CUTANÉE)

B.4. TOXICITÉ AIGUË: IRRITATION/CORROSION CUTANÉE

B.5. TOXICITÉ AIGUË: IRRITATION/CORROSION OCULAIRE

B.6. SENSIBILISATION CUTANÉE

B.7. ÉTUDE DE TOXICITÉ ORALE À DOSE RÉPÉTÉE PENDANT 28 JOURS SUR LES RONGEURS

B.8. TOXICITÉ SUBAIGUË PAR INHALATION: ÉTUDE SUR 28 JOURS

B.9. TOXICITÉ À DOSES RÉPÉTÉES (28 JOURS) (ADMINISTRATION CUTANÉE)

B.10. MUTAGÉNICITÉ — ESSAI IN VITRO D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE

B.11. MUTAGÉNICITÉ — ESSAI IN VIVO D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR MOELLE OSSEUSE DE MAMMIFÈRE

B.12. MUTAGÉNICITÉ — ESSAI IN VIVO DU MICRONOYAU SUR ÉRYTHROCYTES DE MAMMIFÈRE

B.13/14. MUTAGÉNICITÉ — ESSAI DE MUTATION RÉVERSE SUR BACTÉRIES

B.15. TESTS DE MUTAGENÈSE ET DE DÉPISTAGE DE CANCÉROGENÈSE MUTATION GÉNIQUE — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

B.16. RECOMBINAISON MITOTIQUE — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

B.17. MUTAGÉNICITÉ — ESSAI IN VITRO DE MUTATION GÉNIQUE SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE

B.18. LÉSION ET RÉPARATION D'ADN — SYNTHÈSE NON PROGRAMMÉE DE L'ADN (UDS) — CELLULES DE MAMMIFÈRE IN VITRO

B.19. ESSAI IN VITRO D'ÉCHANGE DE CHROMATIDES-SŒURS

B.20. TEST DE LÉTALITÉ RÉCESSIVE LIÉE AU SEXE SUR *DROSOPHILA MELANOGASTER*

▼B

B.21.	TESTS DE TRANSFORMATION SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE IN VITRO
B.22.	TEST DE LÉTALITÉ DOMINANTE CHEZ LE RONGEUR
B.23.	ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR SPERMATOGONIES DE MAMMIFÈRE
B.24.	SPOT TEST CHEZ LA SOURIS
B.25.	TRANSLOCATION HÉRÉDITAIRE CHEZ LA SOURIS
B.26.	ESSAI DE TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR VOIE ORALE — TOXICITÉ ORALE À DOSES RÉPÉTÉES — RONGEURS: 90 JOURS
B.27.	ESSAI DE TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR VOIE ORALE — TOXICITÉ ORALE À DOSES RÉPÉTÉES — NON-RONGEURS: 90 JOURS
B.28.	TOXICITÉ DERMIQUE SUBCHRONIQUE — ÉPREUVE DE 90 JOURS SUR DES RONGEURS
B.29.	TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR INHALATION: ÉTUDE SUR 90 JOURS
B.30.	ÉTUDES DE TOXICITÉ CHRONIQUE
B.31.	ÉTUDE DE LA TOXICITÉ POUR LE DÉVELOPPEMENT PRÉNATAL
B.32.	ÉTUDES DE CANCÉROGENÈSE
B.33.	ÉTUDES COMBINÉES DE TOXICITÉ CHRONIQUE ET DE CANCÉROGENÈSE
B.34.	TEST DE REPRODUCTION SUR UNE GÉNÉRATION
B.35.	ÉTUDE DE TOXICITÉ POUR LA REPRODUCTION SUR DEUX GÉNÉRATIONS
B.36.	TOXICOCINÉTIQUE
B.37.	NEUROTOXICITÉ RETARDÉE DES SUBSTANCES ORGANOPHOSPORÉES APRÈS EXPOSITION AIGUË
B.38.	NEUROTOXICITÉ RETARDÉE DES SUBSTANCES ORGANOPHOSPHORÉES — ÉTUDE PAR ADMINISTRATION RÉITÉRÉE SUR 28 JOURS
B.39.	ESSAI IN VIVO DE SYNTHÈSE NON PROGRAMMÉE DE L'ADN (UDS) SUR CELLULES HÉPATIQUES DE MAMMIFÈRE
B.40.	CORROSION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI DE RÉSISTANCE ÉLECTRIQUE TRANSCUTANÉE (RET)
B.40 bis.	CORROSION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI SUR MODÈLE DE PEAU HUMAINE

▼**B**

B.41. ESSAI DE PHOTOTOXICITÉ IN VITRO 3T3 NRU

B.42. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES

B.43. ÉTUDE DE NEUROTOXICITÉ CHEZ LES RONGEURS

B.44. ABSORPTION CUTANÉE: MÉTHODE IN VIVO

B.45. ABSORPTION CUTANÉE: MÉTHODE IN VITRO

B.46. IRRITATION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ

B.47. MÉTHODE D'ESSAI D'OPACITÉ ET DE PERMÉABILITÉ DE LA CORNÉE BOVINE POUR LA MISE EN ÉVIDENCE DES SUBSTANCES CORROSIVES ET FORTEMENT IRRITANTES POUR L'ŒIL

B.48. MÉTHODE D'ESSAI SUR ŒIL DE POULET ISOLÉ POUR LA MISE EN ÉVIDENCE DES SUBSTANCES CORROSIVES ET FORTEMENT IRRITANTES POUR L'ŒIL

B.49. ESSAI IN VITRO DE MICRONOYAUX SUR CELLULES DE MAMMIFÈRES

B.50. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES: DA

B.51. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES: BRDU-ELISA

▼**M4**

B.52. TOXICITÉ AIGUË PAR INHALATION – MÉTHODE PAR CLASSE DE TOXICITÉ AIGUË

▼B

INTRODUCTION GÉNÉRALE

A. CARACTÉRISATION DE LA SUBSTANCE À TESTER

Avant d'entreprendre toute étude de toxicité, il faut connaître la composition de la substance à tester, y compris les principales impuretés, ainsi que ses propriétés physico-chimiques dont sa stabilité.

Les propriétés physico-chimiques de la substance fournissent des informations importantes pour le choix de la voie d'administration, pour la conception des différentes études, ainsi que pour la manipulation et le stockage de la substance.

La mise au point d'une méthode d'analyse permettant une évaluation qualitative et quantitative de la substance à tester (y compris, si possible, de ses principales impuretés) dans le véhicule d'administration et dans le matériel biologique doit précéder la mise en œuvre de l'étude.

Toutes les informations concernant l'identification, les propriétés physico-chimiques, la pureté et le comportement de la substance à tester doivent être consignées dans le procès-verbal d'essai.

B. SOIN DES ANIMAUX

Lors des essais de toxicité, il est essentiel de procéder à des contrôles stricts des conditions ambiantes et d'utiliser des techniques appropriées de soin des animaux.

i) *Conditions d'hébergement*

Les conditions ambiantes dans les locaux ou enceintes réservés aux animaux d'expérience doivent être adaptées à l'espèce utilisée pour l'essai. Pour les rats, les souris et les cobayes, la température ambiante doit être de 22 °C ± 3 °C et l'humidité relative de 30 à 70 %; pour les lapins, la température doit être de 20 °C ± 3 °C et l'humidité relative de 30 à 70 %.

Certaines techniques expérimentales sont particulièrement sensibles aux effets thermiques et, dans de tels cas, des indications précises concernant les conditions adéquates figurent dans la description de la méthode d'essai. Dans tous les essais de toxicité, la température et l'humidité doivent être contrôlées et consignées, et doivent figurer dans le rapport final d'étude.

Un éclairage artificiel doit garantir l'alternance de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les détails concernant les conditions d'éclairage doivent être consignés dans le rapport final d'étude.

Sauf si la méthode prévoit d'autres conditions, les animaux doivent être hébergés individuellement ou mis en cage par petits groupes de même sexe. Les cages collectives ne doivent pas contenir plus de cinq animaux.

Il est important que les comptes rendus d'expérimentation animale précisent le type de cage utilisé et le nombre d'animaux par cage lors de l'exposition à la substance chimique et pendant toute période d'observation qui suit.

▼B

ii) *Conditions d'alimentation*

Le régime alimentaire doit répondre à tous les besoins nutritionnels de l'espèce soumise à l'expérience. Lorsque les substances à tester sont administrées dans la nourriture, il se peut que la valeur nutritionnelle de cette dernière soit amoindrie par une interaction entre la substance et un ingrédient de l'alimentation. Cette éventualité doit être prise en compte lors de l'interprétation des résultats de l'essai. Les régimes alimentaires classiquement utilisés en laboratoire sont acceptables, l'eau de boisson étant fournie à satiété. Le choix du régime alimentaire peut être guidé par la nécessité de garantir une proportion appropriée de substance en cas d'administration par cette méthode.

Les contaminants alimentaires qui agissent sur la toxicité ne doivent pas être présents à des concentrations susceptibles d'influencer les résultats.

C. **MÉTHODES ALTERNATIVES**

L'UE attache une grande importance à la mise au point et à la validation de méthodes alternatives qui fournissent autant d'informations que les expérimentations animales actuelles, mais qui nécessitent moins d'animaux, minimisent leurs souffrances et permettent d'éviter leur sacrifice.

Dès que de telles méthodes sont disponibles, elles doivent être envisagées, chaque fois que cela est possible, pour la caractérisation des dangers et pour la classification et l'étiquetage des substances en fonction des dangers intrinsèques.

D. **ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION**

L'extrapolation directe à l'homme des résultats des expériences sur les animaux et des essais in vitro n'est possible que dans certaines limites; il faut en tenir compte lors de l'évaluation et de l'interprétation des essais; aussi, lorsque des effets indésirables ont été mis en évidence chez l'homme, ces données peuvent être utilisées pour confirmer les résultats expérimentaux.

E. **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

La plupart des méthodes présentées ici sont élaborées dans le cadre du programme de lignes directrices de l'OCDE en matière d'essais. Ces méthodes doivent être mises en œuvre conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, afin de garantir l'acceptation mutuelle des données.

De plus amples informations peuvent être obtenues dans les références citées dans les lignes directrices de l'OCDE et dans d'autres publications pertinentes.

▼B

B.1 bis. **TOXICITÉ ORALE AIGUË — MÉTHODE DE LA DOSE PRÉDÉTERMINÉE**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 420 (2001) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Les méthodes traditionnelles pour évaluer la toxicité aiguë utilisent comme effet observé la mort des animaux. En 1984, la British Toxicology Society (BTS) a proposé une nouvelle approche pour les essais de toxicité aiguë, utilisant des doses prédéterminées (1). Cette méthode évitait d'utiliser la mort des animaux comme effet observé et s'appuyait plutôt sur l'observation de signes manifestes de toxicité apparaissant après traitement à une dose prédéterminée. À la suite des études de validation in vivo au Royaume-Uni (2) et au niveau international (3), cette procédure a été adoptée comme ligne directrice en 1992. Après cela, les propriétés statistiques de la méthode de la dose prédéterminée ont été évaluées dans une série d'études utilisant des modèles mathématiques (4) (5) (6). Ensemble, les études in vivo et celles fondées sur des modèles mathématiques ont démontré que la procédure était reproductible et utilisait moins d'animaux auxquels elle occasionnait moins de souffrance que les méthodes traditionnelles. Elle permet de classer les substances par ordre de toxicité, de la même manière que les autres méthodes d'essai de toxicité aiguë.

Des indications permettant de choisir la méthode d'essai la plus appropriée pour un but donné sont présentées dans le document d'orientation sur les essais de toxicité orale aiguë (7). Ce document contient également de plus amples informations sur la conduite et l'interprétation de la méthode d'essai B.1 bis.

La méthode de la dose prédéterminée a comme principe de n'utiliser, pour l'étude principale, que des doses modérément toxiques et d'éviter d'administrer des doses qui peuvent s'avérer létales. De même, il n'est pas nécessaire d'administrer des doses dont on sait qu'elles provoquent des douleurs et une détresse importante du fait de propriétés corrosives ou sévèrement irritantes. Au cours de l'essai, les animaux moribonds et les animaux souffrant de façon manifeste ou montrant des signes de détresse grave devront être euthanasiés. Ces animaux devront être pris en compte dans l'interprétation des résultats au même titre que les animaux morts au cours de l'essai. Les critères pour décider d'euthanasier les animaux moribonds et ceux qui souffrent de façon manifeste, ainsi que les orientations pour reconnaître une mort prévisible ou imminente, font l'objet d'un autre document d'orientation (8).

La méthode fournit des informations qui permettent à la fois l'évaluation des dangers et le classement des substances selon le système général harmonisé de classification (SGH) des substances ayant une toxicité aiguë (9).

Le laboratoire doit rassembler toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de procéder à l'essai. Ces informations comprennent l'identité et la structure chimique de la substance, ses propriétés physico-chimiques, les résultats obtenus dans tous les autres essais de toxicité in vitro et in vivo, les données toxicologiques concernant des substances structurellement apparentées, ainsi que le ou les usages escomptés de la substance. Ces informations sont nécessaires pour rassurer les personnes concernées quant à la pertinence de l'essai pour la protection de la santé humaine et elles seront utiles dans le choix de la dose initiale appropriée.

▼B

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Toxicité orale aiguë: effets défavorables apparaissant après l'administration par voie orale d'une dose unique de substance ou de plusieurs doses données sur une période de 24 heures.

Mort différée: l'animal ne meurt ni n'apparaît moribond en l'espace de 48 heures, mais meurt ultérieurement au cours de la période d'observation de 14 jours.

Dose: la quantité de substance d'essai administrée. La dose s'exprime en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (par exemple mg/kg).

Toxicité manifeste: terme général désignant des signes évidents de toxicité qui surviennent à la suite de l'administration d'une substance d'essai [voir (3)]. Ces signes doivent être tels que l'on puisse s'attendre à ce qu'une augmentation de la dose administrée entraîne l'apparition de douleurs importantes et des signes persistants de détresse profonde, un état moribond [pour les critères, voir (8)] et probablement de la mortalité pour la plupart des animaux.

SGH: système général harmonisé de classification et d'étiquetage. Une activité conjointe de l'OCDE (santé humaine et environnement), du comité d'experts sur le transport des matières dangereuses (propriétés physico-chimiques) et du BIT (communication des dangers) et coordonnée par l'IOMC (Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals).

Mort imminente: il y a mort imminente lorsqu'on s'attend à ce qu'un état moribond ou la mort interviennent avant le prochain moment d'observation prévu. Les signes indicatifs de cet état chez les rongeurs comprennent les convulsions, la position latérale, la position couchée et les tremblements [voir (8) pour plus de détails].

DL_{50} (dose létale 50 %): dose unique d'une substance d'essai, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 % des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La valeur de la DL_{50} est exprimée en poids de la substance par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (mg/kg).

Dose limite: désigne une dose qui est la limite supérieure pour l'essai (2 000 ou 5 000 mg/kg).

État moribond: désigne l'état précédant la mort ou l'incapacité à survivre, même si un traitement est donné [pour de plus amples détails, voir (8)].

Mort prévisible: présence de signes cliniques indiquant que la mort va intervenir à un moment déterminé dans le futur, avant la fin projetée de l'expérience, par exemple incapacité à atteindre l'eau ou la nourriture [pour plus de détails, voir (8)].

▼B

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des groupes d'animaux du même sexe reçoivent des doses prédéterminées de 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg selon une procédure séquentielle. Exceptionnellement, une dose additionnelle de 5 000 mg/kg peut être envisagée (voir section 1.6.2). La dose initiale, choisie sur la base d'une étude d'orientation, est celle qui est susceptible de faire apparaître certains signes de toxicité, sans toutefois provoquer des effets toxiques graves ou la mort. Les manifestations cliniques et les effets associés à la douleur, à la souffrance et à une mort imminente sont décrits dans un document d'orientation de l'OCDE (8). D'autres groupes d'animaux reçoivent des doses plus fortes ou moins fortes en fonction de l'absence ou de la présence d'effets toxiques ou de mortalité. On continue la procédure jusqu'à ce que l'on identifie la dose qui occasionne un effet toxique évident ou la mort d'un seul animal. La procédure est également interrompue lorsque la dose la plus forte ne donne lieu à aucun effet observé ou lorsque la mort survient à la dose la plus faible.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Choix de l'espèce animale**

Le rat est l'espèce préférée, mais d'autres espèces peuvent être utilisées. Normalement, on utilise des femelles (7). L'étude de la littérature sur les essais traditionnels de DL_{50} permet de conclure qu'il y a peu de différences de sensibilité entre sexes et que, lorsqu'il y a une différence, les femelles sont en général légèrement plus sensibles (10). Si, toutefois, compte tenu des propriétés toxicologiques et toxicocinétiques de composés structurellement voisins, il apparaît que les mâles sont probablement plus sensibles, il convient d'employer des mâles. Dans ce cas, il faut fournir une justification adéquate.

On utilise de jeunes animaux adultes sains issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Au début de l'essai, chaque animal doit être âgé de 8 à 12 semaines et son poids doit se situer dans un intervalle de ± 20 % du poids moyen des animaux précédemment exposés.

1.4.2. **Conditions d'hébergement et d'alimentation**

La température du local des animaux d'expérience doit être maintenue à 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative doit atteindre au moins 30 % et rester de préférence inférieure à 70 %, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. On appliquera un éclairage artificiel alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Pour l'alimentation des animaux, on peut utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Les animaux peuvent être groupés par dose. Toutefois, le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal.

1.4.3. **Préparation des animaux**

Les animaux sont choisis au hasard, marqués pour permettre une identification individuelle et gardés dans leurs cages pour les acclimater aux conditions de laboratoire pendant au moins cinq jours avant l'expérience.

▼B

1.4.4. **Préparation des doses**

En général, il convient d'administrer la substance d'essai à volume constant quelle que soit la dose testée, en faisant varier la concentration de la préparation. Lorsqu'un produit liquide ou un mélange font l'objet de l'essai, l'utilisation du produit non dilué, donc à concentration constante, peut être plus appropriée pour l'évaluation du risque de cette substance. Certaines autorités réglementaires l'exigent. Dans tous les cas, il ne faut pas dépasser le volume de dose maximal. Le volume maximal de liquide qui peut être administré en une seule fois dépend de la taille de l'animal d'essai. Chez les rongeurs, ce volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses pour lesquelles on peut utiliser 2 ml/100 g de poids corporel. Il est recommandé d'utiliser une solution aqueuse chaque fois que cela est possible, sinon on peut utiliser une solution dans de l'huile (par exemple de l'huile de maïs) et éventuellement une solution dans d'autres véhicules. En ce qui concerne les véhicules non aqueux, leur toxicité doit être connue. Les doses doivent être préparées juste avant l'administration, sauf si la stabilité de la préparation pendant la durée de la période d'utilisation est connue et jugée acceptable.

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Administration des doses**

La substance d'essai est administrée en une seule dose par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou de toute autre canule pour intubation appropriée. Lorsqu'il n'est pas possible d'administrer la dose en une seule fois, celle-ci peut être fractionnée sur une période n'excédant pas 24 heures.

Les animaux doivent être à jeun avant l'administration de la substance (on supprimera la nourriture, mais pas l'eau, pendant toute une nuit pour les rats et pendant 3 à 4 heures pour les souris). Après la période de jeûne, les animaux doivent être pesés; la substance d'essai leur est ensuite administrée. Après l'administration de la substance, les animaux peuvent être à nouveau privés de nourriture, pendant 3 à 4 heures pour les rats et pendant 1 à 2 heures pour les souris. Si la dose est administrée par fractions sur un certain laps de temps, il peut s'avérer nécessaire, en fonction de la durée du traitement, d'alimenter et de faire boire les animaux.

1.5.2. **Étude d'orientation**

Le but de l'étude d'orientation est de permettre la sélection d'une dose initiale appropriée pour l'étude principale. L'administration des doses se fait de façon séquentielle aux animaux individuellement selon les schémas de l'annexe 1. L'étude d'orientation prend fin lorsqu'une décision au sujet de la dose initiale de l'étude principale peut être prise (ou lorsqu'une mortalité est observée à la dose prédéterminée la plus faible).

Pour la dose initiale de l'étude d'orientation, on choisit un niveau parmi les suivants: 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg. Le niveau choisi est celui pour lequel on peut s'attendre à observer des signes de toxicité évidente, si possible sur la base d'indications obtenues à partir de données in vivo et in vitro sur la même substance et sur des substances structurellement voisines. En l'absence de telles informations, la dose initiale sera de 300 mg/kg.

Les animaux sont traités à 24 heures d'intervalle au moins. Tous les animaux sont observés pendant au moins quatorze jours.

▼B

Exceptionnellement, et uniquement lorsque cela est nécessaire pour satisfaire à une exigence réglementaire particulière, l'utilisation d'une dose maximale prédéterminée supplémentaire de 5 000 mg/kg peut être envisagée (voir annexe 3). Par souci de protection des animaux, l'essai de substances en catégorie 5 du SGH (2 000 - 5 000 mg/kg) est déconseillé et ne doit être envisagé que lorsqu'il est très probable qu'il donnera des résultats qui présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé des hommes et des animaux ou de l'environnement.

Dans le cas où un animal ayant reçu la dose prédéterminée la plus faible (5 mg/kg) mourrait au cours de l'étude d'orientation, la procédure normale est de terminer l'étude et de classer la substance en catégorie 1 du SGH (voir l'annexe 1). Cependant, il peut s'avérer nécessaire de confirmer la classification, et la procédure facultative supplémentaire ci-après est alors proposée. Un deuxième animal reçoit une dose de 5 mg/kg. Si ce deuxième animal meurt, la classification en catégorie 1 du SGH est confirmée et l'étude prend fin immédiatement. Si le deuxième animal survit, un maximum de trois animaux supplémentaires reçoivent chacun 5 mg/kg. Étant donné le risque de mortalité élevé, il convient de procéder de manière séquentielle par souci de protection des animaux. L'intervalle de temps entre chaque administration doit être suffisant afin de pouvoir démontrer que l'animal précédent a des chances de survivre. Si un deuxième animal meurt, l'administration séquentielle sera immédiatement arrêtée et aucun autre animal ne recevra de dose. Avec la mort d'un deuxième animal (indépendamment du nombre d'animaux soumis à l'essai au moment où celui-ci est arrêté), le résultat est A (2 morts ou plus), et la règle de classification présentée à l'annexe 2 pour la dose prédéterminée de 5 rng/kg s'applique: catégorie 1 s'il y a 2 morts ou plus, et catégorie 2 s'il y a seulement 1 mort. En outre, l'annexe 4 propose une méthode de classification selon le système communautaire en attendant la mise en place du nouveau SGH.

1.5.3. **Étude principale**

1.5.3.1. *Nombre d'animaux et niveaux des doses*

Les schémas de l'annexe 2 indiquent la marche à suivre après administration de la dose initiale. Il y a trois possibilités: arrêter l'essai et attribuer la classification appropriée, administrer la dose prédéterminée supérieure ou administrer la dose inférieure. Cependant, par souci de protection des animaux, les doses ayant entraîné la mort au cours de l'étude d'orientation ne sont pas réappliquées lors de l'étude principale (voir annexe 2). L'expérience démontre que le résultat le plus probable à la dose initiale est que la substance pourra être classée et qu'il sera inutile de prolonger l'essai.

En général, on utilise au total cinq animaux du même sexe à chaque niveau de dose étudié. Ce groupe de cinq animaux est constitué de l'animal utilisé dans l'étude d'orientation, auquel est administrée la dose sélectionnée, et de quatre animaux supplémentaires (sauf dans les rares cas où une dose utilisée dans l'étude principale n'a pas été utilisée dans l'étude d'orientation).

L'intervalle de temps à respecter entre l'administration de chaque niveau de dose dépend du moment où se manifestent les effets toxiques, de leur durée et de leur gravité. L'administration de la dose suivante doit être retardée jusqu'à ce que l'on ait obtenu la certitude que les animaux précédemment soumis au traitement vont survivre. Un laps de temps de 3 ou 4 jours entre les administrations à chaque niveau de dose est recommandé, si nécessaire, pour permettre l'observation de signes de toxicité différée. Cet intervalle peut être ajusté selon qu'il convient, par exemple, en cas de réponse peu concluante.

▼B

Lorsque l'on envisage d'utiliser une dose prédéterminée maximale de 5 000 mg/kg, il y a lieu de suivre la procédure présentée à l'annexe 3 (voir également section 1.6.2).

1.5.3.2. *Essai limite*

L'essai limite est utilisé principalement lorsque l'expérimentateur dispose d'informations indiquant que la substance d'essai n'est probablement pas toxique, c'est-à-dire que sa toxicité ne se manifeste qu'au-delà des doses limites réglementaires. Des informations concernant la toxicité de la substance d'essai peuvent être déduites des connaissances acquises sur des substances, produits ou mélanges similaires déjà testés, compte tenu de l'identité et du pourcentage des composants importants sur le plan toxicologique. Quand on ne dispose pas d'informations concernant la toxicité de la substance, ou lorsqu'on s'attend à une substance toxique, il faut effectuer l'essai principal.

Selon la procédure normale, une étude d'orientation à la dose initiale de 2 000 mg/kg (exceptionnellement 5 000 mg/kg), suivie du traitement de quatre animaux supplémentaires à cette même dose, sert d'essai limite dans cette ligne directrice.

1.6. OBSERVATIONS

Les animaux doivent être observés individuellement au moins une fois pendant les 30 premières minutes suivant l'administration de la substance et régulièrement pendant les premières 24 heures, avec une attention particulière au cours des 4 premières heures; l'observation doit ensuite être quotidienne, pendant 14 jours en tout, sauf dans le cas des animaux qui meurent en cours d'étude ou qui doivent être retirés de l'étude et euthanasiés pour leur épargner des souffrances excessives. Toutefois, la durée d'observation ne doit pas être fixée de manière rigide. Elle doit être fonction des réactions de toxicité, du moment où elles apparaissent et de la durée de la période de récupération. Elle peut donc être prolongée si nécessaire. Les moments où les signes de toxicité apparaissent et disparaissent sont importants, surtout si les effets toxiques ont tendance à être différés (11). Toutes les observations sont enregistrées de façon systématique, une fiche individuelle étant établie pour chaque animal.

D'autres observations peuvent s'avérer nécessaires lorsque les animaux continuent à manifester des signes de toxicité. Les observations doivent porter sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux central et autonome, de l'activité somatomotrice et du comportement. L'attention portera en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsions, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets sur l'homme doivent être pris en considération (8). Les animaux moribonds et les animaux souffrant manifestement ou présentant des signes graves de détresse doivent être euthanasiés. Qu'il s'agisse d'animaux euthanasiés pour raisons éthiques ou d'animaux retrouvés morts, le moment de la mort doit être enregistré de façon aussi précise que possible.

1.6.1. **Poids corporel**

Le poids de chaque animal doit être déterminé peu de temps avant l'administration de la substance d'essai et au moins une fois par semaine ensuite. Les variations de poids doivent être calculées et enregistrées. À la fin de l'essai, les animaux survivants sont pesés puis euthanasiés.

▼B

1.6.2. **Pathologie**

Tous les animaux d'essai (y compris ceux qui sont morts au cours de l'essai ou ceux qui ont été retirés de l'étude pour des raisons éthiques) doivent être soumis à une autopsie à l'échelle macroscopique. Pour chaque animal, toutes les altérations pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Chez les animaux qui survivent 24 heures ou plus après administration de la dose initiale, l'examen microscopique des organes présentant des signes évidents de pathologie doit également être envisagé, car il peut fournir des renseignements utiles.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats obtenus pour chaque animal doivent être présentés. Toutes les données doivent être résumées dans un tableau indiquant, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts pendant l'essai ou sacrifiés pour des raisons éthiques, et pour chaque animal, le moment de la mort, la description des effets toxiques et leur évolution dans le temps ainsi que leur réversibilité éventuelle et les résultats de l'autopsie.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Substance d'essai:

— état physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (compris isomérisation),

— données relatives à l'identification, y compris numéro CAS.

Véhicule (le cas échéant):

— justification du choix du véhicule, s'il ne s'agit pas d'eau.

Animaux d'essai:

— espèce/souche utilisée,

— état microbiologique des animaux, s'il est connu,

— nombre, âge et sexe des animaux (le cas échéant, justification du choix de mâles à la place de femelles),

— origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.

Conditions de l'essai:

— détails sur la formulation de la substance d'essai, notamment état physique du produit administré,

— détails sur le mode d'administration, notamment volume des doses et moment de l'administration,

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (y compris le type de régime et sa provenance ainsi que celle de l'eau),

— justification du choix de la dose initiale.

▼B

Résultats:

— tableau des réactions aux différentes doses pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris mortalité, nature, gravité et durée des effets),

— tableau des poids corporels et des variations du poids,

— poids individuel des animaux le jour du traitement, et ensuite à intervalles d'une semaine, et au moment de la mort ou du sacrifice,

— date et heure de la mort si celle-ci intervient avant le moment prévu du sacrifice,

— pour chaque animal, moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et réversibilité éventuelle,

— pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques.

Discussion et interprétation des résultats.

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, p. 85-92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, p. 279-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, p. 469-482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, p. 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, p. 183-196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. Paris

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.

▼B

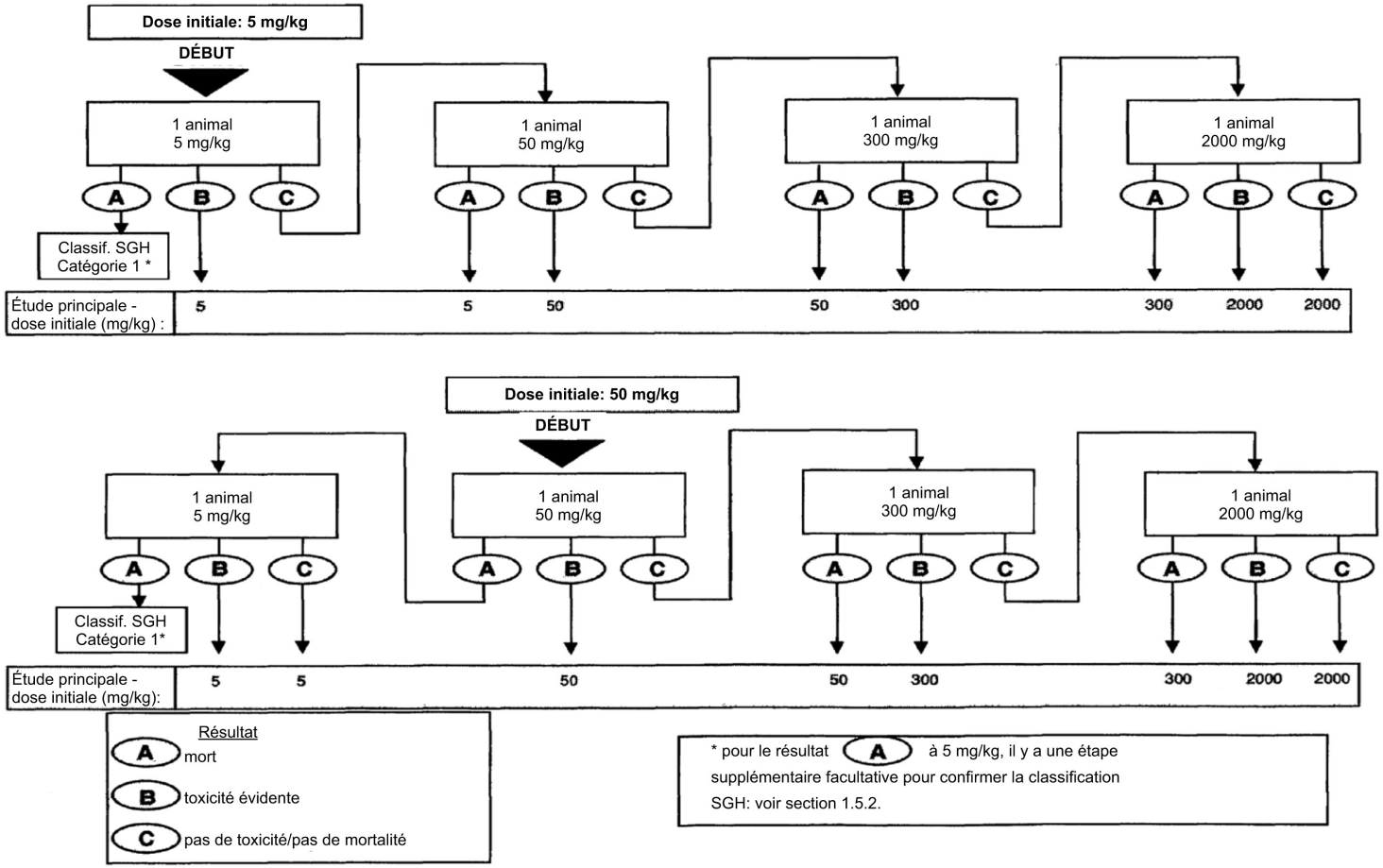
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L, Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, p. 223-231.

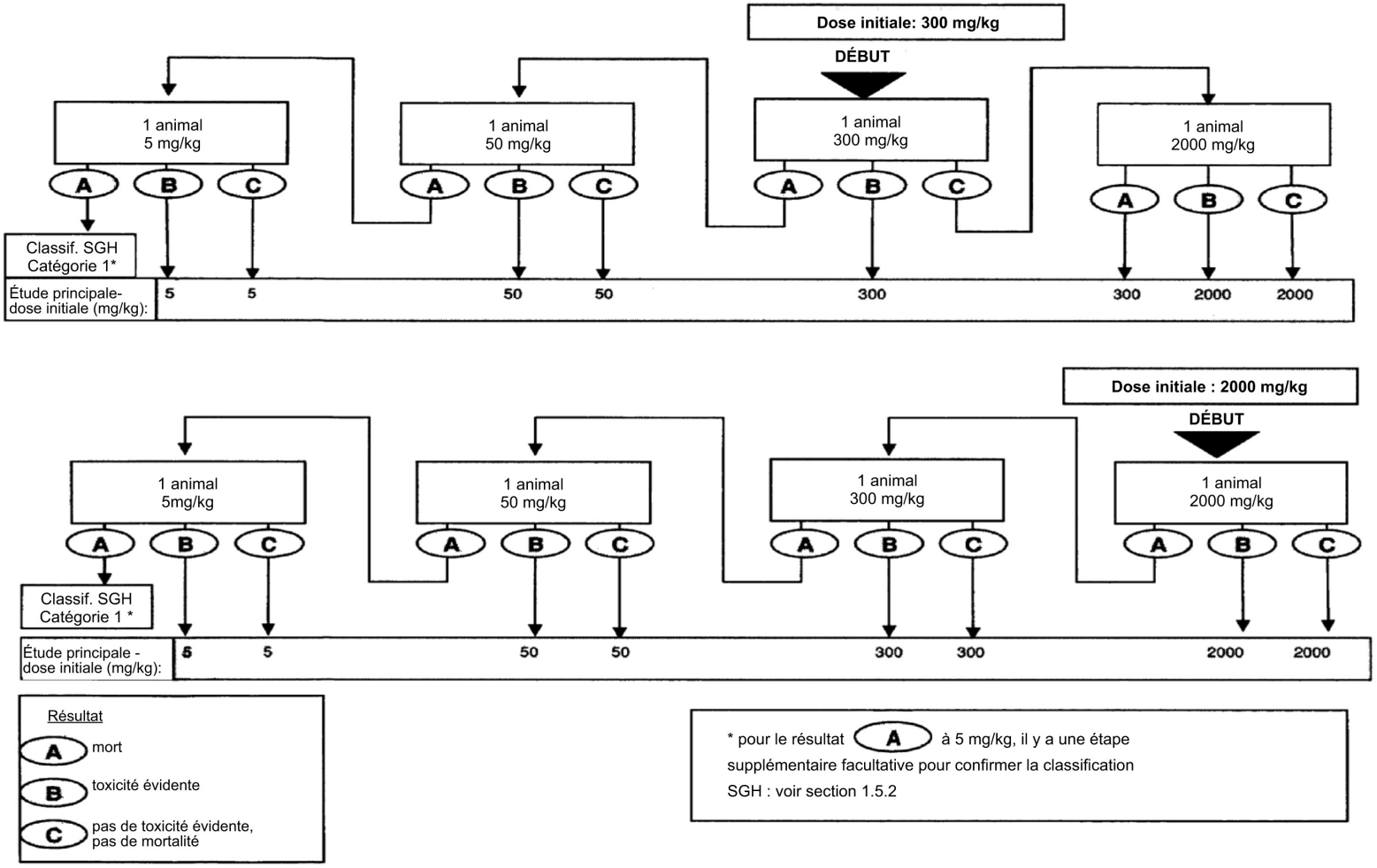
(11) Chan, P.K and A.W. Hayes (1994). Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation in: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

ANNEXE 1

SCHÉMA POUR L'ÉTUDE D'ORIENTATION

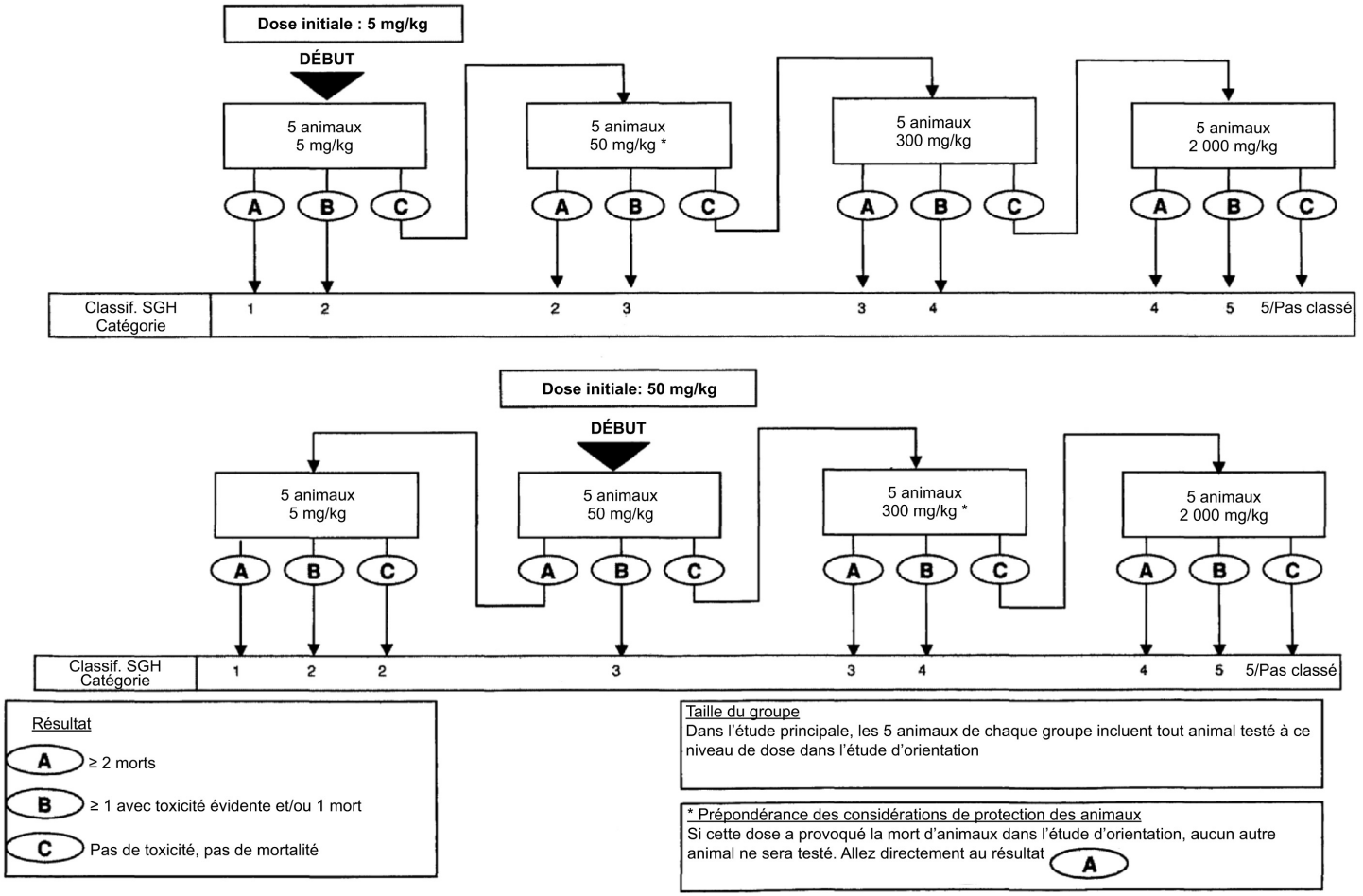


▼B

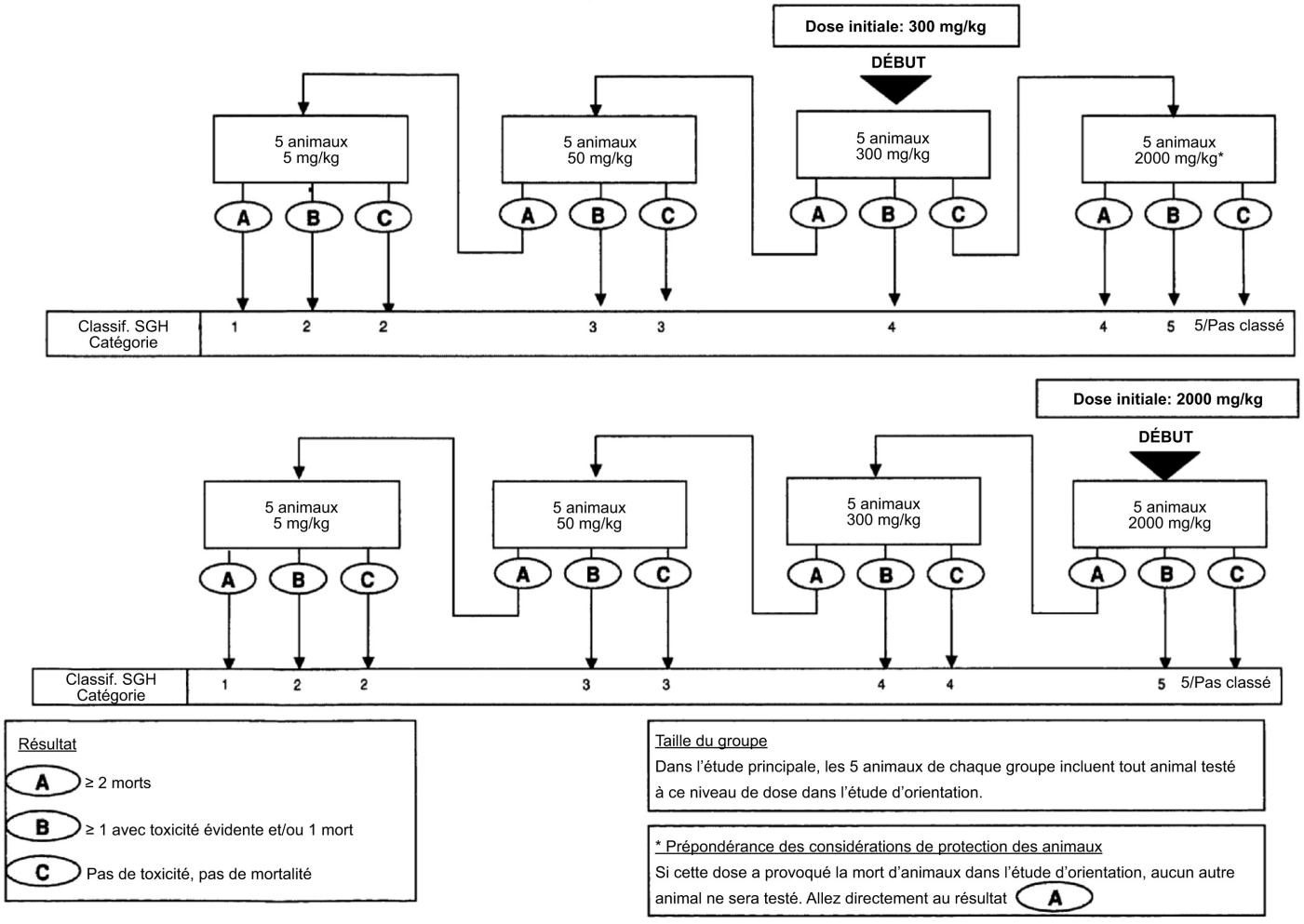

Dose initiale: 300 mg/kg
DÉBUT
1 animal
5 mg/kg
1 animal
50 mg/kg
1 animal
300 mg/kg
1 animal
2000 mg/kg
A
B
C
Classif. SGH
Catégorie 1*
Étude principale-
dose initiale (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Dose initiale : 2000 mg/kg
DÉBUT
1 animal
5mg/kg
1 animal
50 mg/kg
1 animal
300 mg/kg
1 animal
2000 mg/kg
Classif. SGH
Catégorie 1 *
Étude principale -
dose initiale (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Résultat
A mort
B toxicité évidente
C pas de toxicité évidente,
pas de mortalité
* pour le résultat A à 5 mg/kg, il y a une étape
supplémentaire facultative pour confirmer la classification
SGH : voir section 1.5.2

ANNEXE 2

SCHÉMA POUR L'ÉTUDE PRINCIPALE



▼B


Dose initiale: 300 mg/kg
DÉBUT
5 animaux 5 mg/kg
5 animaux 50 mg/kg
5 animaux 300 mg/kg
5 animaux 2000 mg/kg*
A B C
Classif. SGH Catégorie
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Pas classé
Dose initiale: 2000 mg/kg
DÉBUT
5 animaux 5 mg/kg
5 animaux 50 mg/kg
5 animaux 300 mg/kg
5 animaux 2000 mg/kg
A B C
Classif. SGH Catégorie
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Pas classé
Résultat
A ≥ 2 morts
B ≥ 1 avec toxicité évidente et/ou 1 mort
C Pas de toxicité, pas de mortalité
Taille du groupe
Dans l'étude principale, les 5 animaux de chaque groupe incluent tout animal testé à ce niveau de dose dans l'étude d'orientation.
* Prépondérance des considérations de protection des animaux
Si cette dose a provoqué la mort d'animaux dans l'étude d'orientation, aucun autre animal ne sera testé. Allez directement au résultat A

▼B

ANNEXE 3

CRITÈRES POUR LA CLASSIFICATION DE SUBSTANCES D'ESSAI DONT ON PRÉSUME QUE LA DL_{50} EST SUPÉRIEURE À 2 000 mg/kg, SANS RECOURIR À L'ESSAI

Les critères pour la catégorie de danger 5 sont destinés à permettre l'identification de substances qui ont une toxicité aiguë relativement faible mais qui, dans certaines conditions, peuvent se révéler dangereuses pour des populations vulnérables. Ces substances sont présumées avoir une DL_{50} orale ou cutanée comprise dans la plage 2 000 - 5 000 mg/kg ou correspondant à des doses équivalentes par d'autres voies. Des substances d'essai peuvent être classées dans la catégorie SGH de danger 5, définie par 2 000 mg/kg < DL_{50} < 5 000 mg/kg, dans les cas suivants:

a) lorsque, en fonction de la mortalité, l'un des schémas de l'annexe 2 oriente la substance vers cette catégorie;

b) lorsque l'on est déjà en possession de données fiables indiquant que la DL_{50} se situera dans la plage des valeurs de la catégorie 5; ou lorsque d'autres études sur des animaux ou l'observation d'effets toxiques chez l'homme suscitent de sérieuses inquiétudes pour la santé humaine;

c) par extrapolation, évaluation ou mesure de données, lorsque la classification dans une catégorie de plus grand danger n'est pas justifiée, et

   — il existe des informations fiables faisant état d'effets toxiques significatifs chez l'homme, ou

   — une certaine mortalité est observée en testant par voie orale jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, ou

   — lorsqu'un jugement d'expert confirme l'existence de signes cliniques significatifs de toxicité lors d'un essai mené jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, hormis diarrhée, hérissement des poils ou aspect mal soigné, ou

   — quand un jugement d'expert confirme l'existence d'informations fiables indiquant la possibilité d'effets aigus significatifs d'après les résultats des autres études sur animaux.

ESSAIS À DOSES SUPÉRIEURES À 2 000 mg/kg

Exceptionnellement, et uniquement lorsque cela est nécessaire pour satisfaire à une exigence réglementaire particulière, l'utilisation d'une dose maximale supplémentaire de 5 000 mg/kg peut être envisagée. Par souci de protection des animaux, l'essai de substances à la dose de 5 000 mg/kg est déconseillé et ne devrait être envisagé que lorsqu'il est fort probable que les résultats d'un tel essai présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé des hommes et des animaux (9).

Étude d'orientation

Les critères de décision de la procédure séquentielle présentée à l'annexe 1 sont étendus de manière à s'appliquer également à une dose de 5 000 mg/kg. Ainsi, lorsqu'une dose initiale de 5 000 mg/kg est utilisée dans l'étude d'orientation et que le résultat A (mortalité) est obtenu, il faut tester un deuxième animal à 2 000 mg/kg; si le premier résultat est B ou C (toxicité évidente ou pas de toxicité), on pourra choisir 5 000 mg/kg comme dose initiale dans l'étude principale. De même, si on choisit une dose initiale différente de 5 000 mg/kg, l'essai se poursuivra à la dose de 5 000 mg/kg en cas d'obtention d'un résultat B ou C à 2 000 mg/kg. L'obtention d'un nouveau résultat A à 5 000 mg/kg imposera une dose initiale de 2 000 mg/kg pour l'étude principale, alors qu'un résultat B ou C imposera 5 000 mg/kg comme dose initiale pour cette étude.

▼B

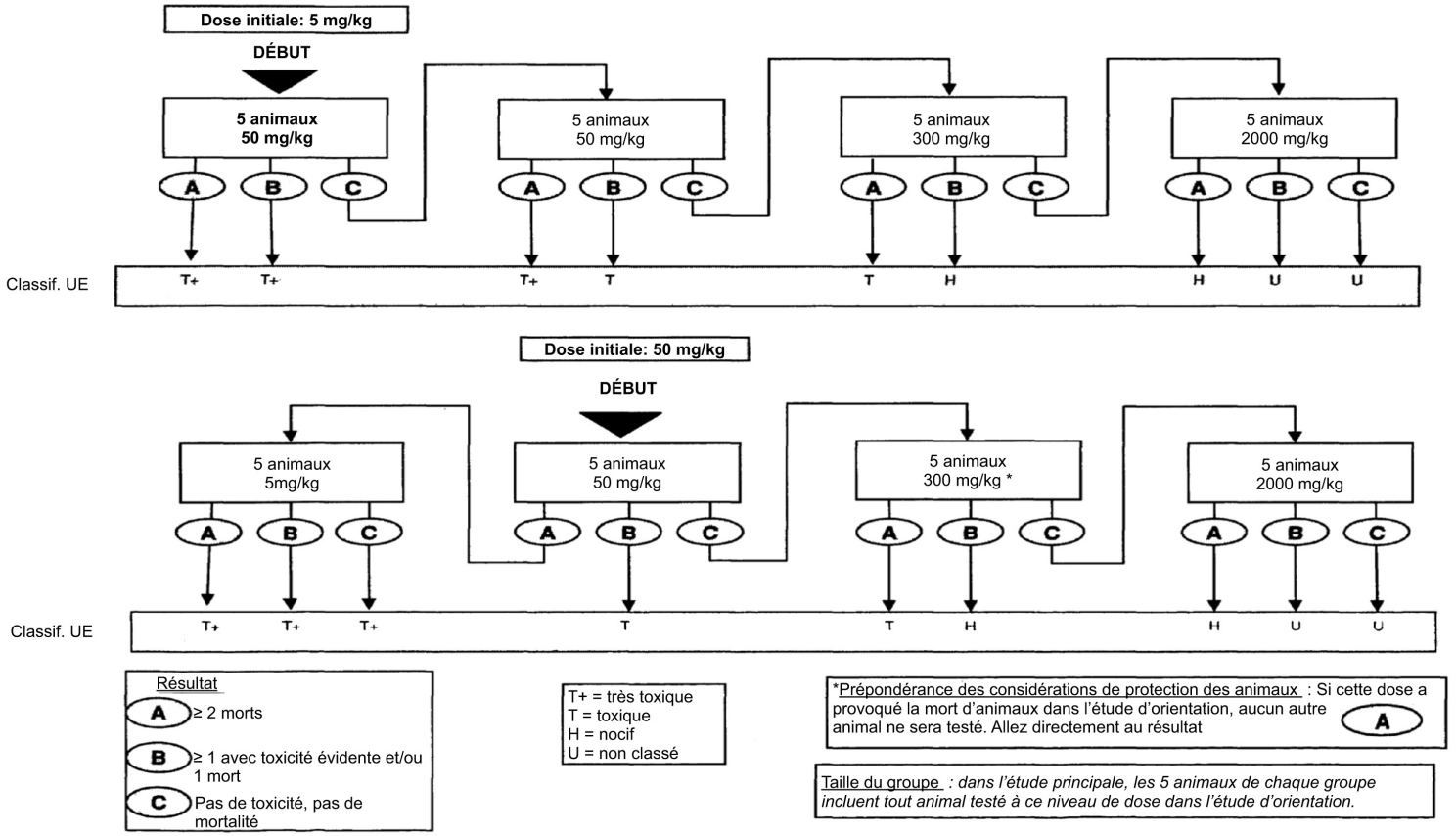
Étude principale

Les critères de décision de la procédure séquentielle présentée à l'annexe 2 sont étendus de manière à s'appliquer également à une dose de 5 000 mg/kg. Ainsi, lorsqu'une dose initiale de 5 000 mg/kg est utilisée dans l'étude principale et que le résultat A (> 2 morts) est obtenu, il faut tester un second groupe à 2 000 mg/kg. Si le premier résultat est B (toxicité évidente et/ou ≤ 1 mort) ou C (pas de toxicité), la substance ne sera pas classée dans le cadre du SGH. De façon similaire, si une dose initiale différente de 5 000 mg/kg est choisie, l'essai se poursuivra à la dose de 5 000 mg/kg en cas d'obtention d'un résultat C à 2 000 mg/kg. L'obtention d'un nouveau résultat A à 5 000 mg/kg entraînera la classification de la substance dans la catégorie 5 du SGH; si le résultat obtenu est B ou C, la substance ne sera pas classée dans le cadre du SGH.

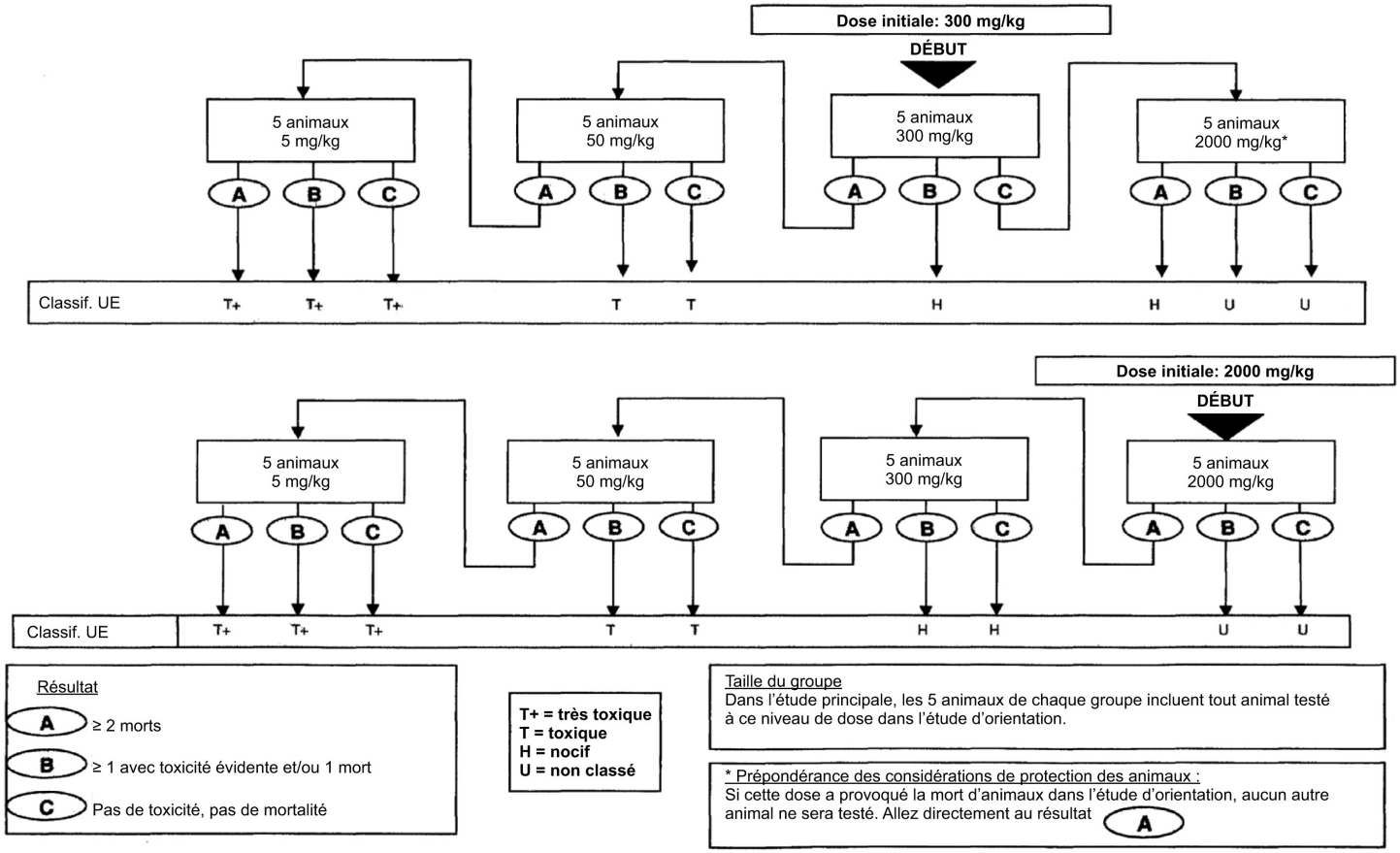
ANNEXE 4

MÉTHODE D'ESSAI B.1 *bis*

Conseils pour une classification selon le système de l'UE en attendant la mise en place effective du système général harmonisé de classification (SGH) [voir référence (8)]



▼B


Dose initiale: 300 mg/kg
DÉBUT
5 animaux 5 mg/kg
5 animaux 50 mg/kg
5 animaux 300 mg/kg
5 animaux 2000 mg/kg*
A B C
Classif. UE
T+ T+ T+ T T H H U U
Dose initiale: 2000 mg/kg
DÉBUT
5 animaux 5 mg/kg
5 animaux 50 mg/kg
5 animaux 300 mg/kg
5 animaux 2000 mg/kg
A B C
Classif. UE
T+ T+ T+ T T H H U U
Résultat
A ≥ 2 morts
B ≥ 1 avec toxicité évidente et/ou 1 mort
C Pas de toxicité, pas de mortalité
T+ = très toxique
T = toxique
H = nocif
U = non classé
Taille du groupe
Dans l'étude principale, les 5 animaux de chaque groupe incluent tout animal testé à ce niveau de dose dans l'étude d'orientation.
* Prépondérance des considérations de protection des animaux :
Si cette dose a provoqué la mort d'animaux dans l'étude d'orientation, aucun autre animal ne sera testé. Allez directement au résultat A

▼B

B.1 ter. **TOXICITÉ ORALE AIGUË — MÉTHODE DE LA CLASSE DE TOXICITÉ AIGUË**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 423 (2001) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La méthode de la classe de toxicité aiguë (1) décrite dans cet essai est une procédure séquentielle qui utilise trois animaux de même sexe à chaque étape. Suivant la mortalité et/ou l'état moribond des animaux, deux à quatre étapes sont en moyenne nécessaires pour évaluer la toxicité aiguë de la substance d'essai. Cette procédure est reproductible, utilise très peu d'animaux et permet de classer des substances par ordre de toxicité de la même manière que les autres méthodes de toxicité aiguë. La méthode par classe de toxicité aiguë est fondée sur des évaluations biométriques (2) (3) (4) (5) avec des doses prédéterminées, convenablement espacées de manière à permettre le classement des substances les unes par rapport aux autres aux fins de l'évaluation des dangers. La méthode, telle qu'elle a été adoptée en 1996, a été largement validée in vivo par rapport aux données de DL_{50} issues de la littérature, tant sur le plan national (6) que sur le plan international (7).

Des indications permettant de choisir la méthode d'essai la plus appropriée pour un but donné sont présentées dans le document d'orientation sur les essais de toxicité orale aiguë (8). Ce document contient également de plus amples informations sur la conduite et l'interprétation de la méthode d'essai B.1 *ter*.

Il n'est pas nécessaire d'administrer des substances d'essai à des niveaux de dose dont on sait qu'elles provoquent des douleurs et une détresse importante du fait des propriétés corrosives ou sévèrement irritantes. Au cours de l'essai, les animaux moribonds et les animaux souffrant de façon manifeste ou montrant des signes de détresse grave devront être euthanasiés. Ces animaux devront être pris en compte dans l'interprétation des résultats, au même titre que les animaux morts pendant l'essai. Les critères pour décider de tuer les animaux moribonds et ceux qui souffrent de façon manifeste ainsi que des orientations pour reconnaître une mort prévisible ou imminente font l'objet d'un autre document d'orientation (9).

La méthode utilise des doses prédéterminées et donne des résultats qui permettent le classement des substances selon le système général harmonisé de classification (SGH) des substances ayant une toxicité aiguë (10).

En principe, la méthode ne vise pas à calculer une valeur précise de DL_{50}, mais elle permet de déterminer dans quelle gamme de doses la substance doit être considérée comme létale, puisque la mort d'une partie des animaux reste le principal effet observé dans cet essai. La méthode permet de déterminer une DL_{50} uniquement dans le cas où au moins deux doses donnent une mortalité supérieure à 0 % et inférieure à 100 %. Grâce à l'utilisation d'un choix de doses prédéterminées, indépendamment de la substance d'essai, et au lien explicite entre classification et nombre d'animaux dans différents états observés, la cohérence entre laboratoires est favorisée.

▼B

Le laboratoire doit rassembler toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de procéder à l'essai. Ces informations comprennent l'identité et la structure chimique de la substance, ses propriétés physico-chimiques, le résultat de tout autre essai de toxicité réalisé in vivo ou in vitro sur la substance, les données toxicologiques concernant des substances structurellement apparentées, ainsi que le ou les usages escomptés de la substance. Ces informations sont nécessaires pour rassurer les personnes concernées quant à la pertinence de l'essai pour la protection de la santé humaine et elles seront utiles dans le choix de la dose initiale appropriée.

1.2. DÉFINITIONS

Toxicité orale aiguë: effets défavorables apparaissant après l'administration par voie orale d'une dose unique de substance ou de plusieurs doses données sur une période de 24 heures.

Mort différée: l'animal ne meurt ni n'apparaît moribond en l'espace de 48 heures, mais meurt ultérieurement au cours de la période d'observation de 14 jours.

Dose: la quantité de substance d'essai administrée. La dose s'exprime en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (par exemple mg/kg).

SGH: système général harmonisé de classification et d'étiquetage. Une activité conjointe de l'OCDE (santé humaine et environnement), du comité d'experts sur le transport des matières dangereuses (propriétés physico-chimiques) et du BIT (communication des dangers) et coordonnée par l'IOMC (Interorganisation Program for the Sound Management of Chemicals).

Mort imminente: il y a mort imminente lorsqu'on s'attend à ce qu'un état moribond ou la mort interviennent avant le prochain moment d'observation prévu. Parmi les signes qui sont indicatifs de cet état chez les rongeurs, il y a les convulsions, la position latérale, la position couchée et les tremblements [pour de plus amples détails, voir (9)].

DL_{50} (dose orale létale 50 %): dose unique d'une substance d'essai, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 % des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La valeur de la DL_{50} est exprimée en poids de la substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (mg/kg).

Dose limite: désigne une dose qui est la limite supérieure pour l'essai (2 000 ou 5 000 mg/kg).

État moribond: l'état avant la mort ou l'incapacité à survivre, même si un traitement est donné [pour de plus amples détails, voir (9)].

Mort prévisible: présence de signes cliniques indiquant que la mort va intervenir à un moment déterminé dans le futur, avant la fin projetée de l'expérience, par exemple incapacité à atteindre l'eau ou la nourriture [pour plus de détails, voir (9)].

▼B

1.3. PRINCIPE DE L'ESSAI

Le principe de cet essai est que, avec un processus séquentiel et un nombre minimal d'animaux par étape, il est possible d'obtenir des informations sur la toxicité aiguë de la substance d'essai qui sont suffisantes aux fins de sa classification. Une dose déterminée de la substance est administrée par voie orale à un groupe d'animaux. La substance est testée selon une procédure séquentielle utilisant trois animaux de même sexe (généralement des femelles) à chaque étape. L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante, c'est-à-dire:

— arrêt de l'essai,

— administration de la même dose à trois animaux supplémentaires,

— administration de la dose immédiatement supérieure ou immédiatement inférieure à trois animaux supplémentaires.

Des détails concernant le mode opératoire sont décrits à l'annexe 1. La méthode permet de se prononcer sur la classification de la substance d'essai dans une classe de toxicité délimitée par des valeurs préalablement fixées de DL_{50}.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.4.1. **Choix de l'espèce animale**

Le rat est l'espèce préférée mais d'autres espèces de rongeurs peuvent être utilisées. Normalement, on utilise des femelles (9). L'étude de la littérature sur les essais traditionnels de DL_{50} montre en effet qu'il y a peu de différence de sensibilité entre sexes et que, lorsqu'il y a des différences, les femelles sont en général légèrement plus sensibles (11). Si, toutefois, compte tenu des propriétés toxicologiques et toxicocinétiques de composés structurellement voisins, il apparaît que les mâles sont probablement plus sensibles, il convient d'employer des mâles. Dans ce cas, il faut fournir une justification adéquate.

On utilise de jeunes animaux adultes sains, issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Au début de l'essai, chaque animal doit être âgé de 8 à 12 semaines et son poids doit se situer dans un intervalle de ± 20 % du poids moyen des animaux précédemment exposés.

1.4.2. **Conditions d'hébergement et d'alimentation**

La température du local des animaux d'expérience doit être de 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative doit atteindre au moins 30 % et rester de préférence inférieure à 70 %, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. On appliquera un éclairage artificiel alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Pour l'alimentation des animaux, on peut utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Les animaux peuvent être groupés par dose. Toutefois, le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal.

▼B

1.4.3. **Préparation des animaux**

Les animaux sont choisis au hasard, marqués pour permettre une identification individuelle et gardés dans leurs cages pour les acclimater aux conditions de laboratoire pendant au moins cinq jours avant l'expérience.

1.4.4. **Préparation des doses**

En général, il convient d'administrer la substance d'essai à volume constant quelle que soit la dose testée, en faisant varier la concentration de la préparation. Lorsqu'un produit liquide ou un mélange font l'objet de l'essai, l'utilisation du produit non dilué, donc à concentration constante, peut être plus appropriée pour l'évaluation du risque de cette substance. Certaines autorités réglementaires l'exigent. Dans tous les cas, il ne faut pas dépasser le volume de dose maximal. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une seule fois dépend de la taille de l'animal d'essai. Chez les rongeurs, ce volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas de solutions aqueuses pour lesquelles on peut utiliser 2 ml/100 g de poids corporel. Il est recommandé d'utiliser une solution aqueuse chaque fois que cela est possible, sinon on peut utiliser une solution dans de l'huile (par exemple de l'huile de mais) et éventuellement une solution dans d'autres véhicules. En ce qui concerne les véhicules non aqueux, leur toxicité doit être connue. Les doses doivent être préparées juste avant l'administration, sauf si la stabilité de la préparation pendant la durée de la période d'utilisation est connue et jugée acceptable.

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Administration des doses**

La substance d'essai est administrée en une seule dose en utilisant une sonde gastrique ou toute autre canule pour intubation appropriée. Lorsqu'il n'est pas possible d'administrer la dose en une seule fois, celle-ci peut être fractionnée sur une période n'excédant pas 24 heures.

Les animaux doivent être à jeun avant l'administration de la substance (on supprimera la nourriture, mais pas l'eau, pendant toute une nuit pour les rats et pendant 3 à 4 heures pour les souris). Après la période de jeûne, les animaux doivent être pesés; la substance d'essai leur est ensuite administrée. Après l'administration de la substance, les animaux peuvent être à nouveau privés de nourriture, pendant 3 à 4 heures pour les rats et pendant 1 à 2 heures pour les souris. Si la dose est administrée par fractions sur un certain laps de temps, il peut s'avérer nécessaire, en fonction de la durée du traitement, d'alimenter et de faire boire les animaux.

1.5.2. **Nombre d'animaux et niveaux des doses**

Trois animaux sont utilisés à chaque étape. Pour la dose initiale, on choisit un niveau parmi les quatre suivants: 5, 50, 300 et 2 000 mg/kg de poids corporel. Le niveau choisi est celui pour lequel on peut s'attendre à observer une mortalité chez les animaux traités. Les schémas de l'annexe 1 décrivent la marche à suivre pour chacune des doses initiales. En outre, l'annexe 4 propose une méthode de classification selon le système communautaire en attendant la mise en place du nouveau SGH.

▼B

Lorsque certaines informations donnent à penser qu'il est peu probable que la dose initiale la plus élevée (2 000 mg/kg de poids corporel) provoque une mortalité, il convient de procéder à un essai limite. En l'absence de telles informations sur la substance d'essai, la dose initiale qui est recommandée par souci de protection des animaux est 300 mg/kg de poids corporel.

L'intervalle de temps à respecter entre l'administration de chaque niveau de dose dépend du moment où se manifestent les effets toxiques, de leur durée et de leur gravité. L'administration de la dose suivante doit être retardée jusqu'à ce que l'on ait obtenu la certitude que les animaux précédemment soumis au traitement vont survivre.

Exceptionnellement, et uniquement lorsque cela est nécessaire pour satisfaire une exigence réglementaire particulière, l'utilisation d'une dose maximale prédéterminée supplémentaire de 5 000 mg/kg peut être envisagée (voir annexe 2). Par souci de protection des animaux, l'essai de substances en catégorie 5 du SGH (2 000 - 5 000 mg/kg) est déconseillé et ne doit être envisagé que lorsqu'il est très probable qu'il donnera des résultats qui présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé des hommes et des animaux ou de l'environnement.

1.5.3. **Essai limite**

L'essai limite est utilisé principalement lorsque l'expérimentateur dispose d'informations indiquant que la substance d'essai n'est probablement pas toxique, c'est-à-dire que sa toxicité ne se manifeste qu'au-delà des doses limites réglementaires. Des informations concernant la toxicité de la substance d'essai peuvent être déduites des connaissances acquises sur des substances, produits ou mélanges similaires déjà testés, compte tenu de l'identité et du pourcentage des composants importants sur le plan toxicologique. Quand on ne dispose pas d'informations concernant la toxicité de la substance, ou lorsqu'on s'attend à une substance toxique, il faut effectuer l'essai principal.

Un essai limite à la dose de 2 000 mg/kg peut être effectué sur six animaux (trois animaux par étape). Exceptionnellement, un essai limite à la dose de 5 000 mg/kg peut être réalisé sur trois animaux (voir annexe 2). Si une mortalité liée à la substance est observée, il peut s'avérer nécessaire de poursuivre l'essai à la dose immédiatement inférieure.

1.6. OBSERVATIONS

Les animaux doivent être observés individuellement au moins une fois pendant les 30 premières minutes suivant l'administration de la substance et régulièrement pendant les premières 24 heures, avec une attention particulière au cours des 4 premières heures; l'observation doit ensuite être quotidienne, pendant 14 jours en tout, sauf dans le cas des animaux qui meurent en cours d'étude ou qui doivent être retirés de l'étude et euthanasiés pour leur épargner des souffrances excessives. Toutefois, la durée d'observation ne doit pas être fixée de manière rigide. Elle doit être fonction des réactions de toxicité, du moment où elles apparaissent et de la durée de la période de récupération. Elle peut donc être prolongée, si nécessaire. Les moments où apparaissent et disparaissent les signes de toxicité sont importants, particulièrement quand on constate un certain retard dans l'apparition de ces signes (12). Toutes les observations sont enregistrées de façon systématique, une fiche individuelle étant établie pour chaque animal.

▼B

D'autres observations peuvent s'avérer nécessaires lorsque les animaux continuent à manifester des signes de toxicité. Les observations doivent porter sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux central et autonome, de l'activité somato-motrice et du comportement. L'attention portera en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets sur l'homme doivent être pris en considération (9). Les animaux moribonds et les animaux souffrant manifestement ou présentant des signes graves de détresse doivent être euthanasiés. Qu'il s'agisse d'animaux euthanasiés pour raisons éthiques ou d'animaux retrouvés morts, le moment de la mort doit être enregistré de façon aussi précise que possible.

1.6.1. **Poids corporel**

Le poids de chaque animal doit être déterminé peu de temps avant l'administration de la substance d'essai, et au moins une fois par semaine ensuite. Les variations de poids doivent être calculées et enregistrées. À la fin de l'essai, les animaux survivants sont pesés puis euthanasiés.

1.6.2. **Pathologie**

Tous les animaux (y compris ceux qui sont morts au cours de l'essai ou ceux qui ont été retirés de l'étude pour des raisons éthiques) doivent être soumis à une autopsie à l'échelle macroscopique. Pour chaque animal, toutes les altérations pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Chez les animaux qui survivent 24 heures ou plus à l'administration de la dose initiale, l'examen microscopique des organes présentant des signes évidents de pathologie doit également être envisagé, car il peut fournir des renseignements utiles.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats obtenus pour chaque animal doivent être présentés. Toutes les données doivent être résumées dans un tableau indiquant, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts pendant l'essai ou sacrifiés pour des raisons éthiques, et, pour chaque animal, le moment de la mort, la description des effets toxiques et leur évolution dans le temps ainsi que leur réversibilité éventuelle et les résultats de l'autopsie.

3. **RAPPORT**

3.1. **Rapport d'essai**

Le rapport d'essai doit contenir, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Substance d'essai:

— état physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (compris isomérisation),

— données relatives à l'identification, y compris numéro CAS.

Véhicule (le cas échéant):

— justification du choix du véhicule, s'il ne s'agit pas d'eau.

Animaux d'essai:

— espèce/souche utilisée,

▼B

— état microbiologique des animaux, s'il est connu,

— nombre, âge et sexe des animaux (le cas échéant, justification du choix de mâles à la place de femelles),

— origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.

Conditions de l'essai:

— détails sur la formulation de la substance d'essai, notamment état physique du produit administré,

— détails sur le mode d'administration, notamment volume des doses et moment de l'administration,

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (y compris le type de régime et sa provenance ainsi que celle de l'eau),

— justification du choix de la dose initiale.

Résultats:

— tableau des réactions aux différentes doses pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris mortalité; nature, gravité et durée des effets),

— tableau des poids corporels et des variations de poids,

— poids individuels des animaux le jour du traitement, et ensuite à intervalles d'une semaine, ainsi qu'au moment de la mort ou du sacrifice,

— date et heure de la mort si celle-ci intervient avant le moment prévu du sacrifice,

— pour chaque animal, moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et réversibilité éventuelle,

— pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques le cas échéant.

Discussion et interprétation des résultats.

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Roll, R., Höfer-Bosse, Th. And Kayser, D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, p. 86

(2) Roll, R., Riebschläger, M., Mischke, U. and Kayser, D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, p. 336-341.

(3) Diener, W., Sichha, L., Mischke, U., Kayser, D. and Schlede, E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, p. 559-610

(4) Diener, W., Mischke, U., Kayser, D. and Schlede, E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, p. 729-734.

(5) Diener, W., and Schlede, E. (1999). Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, p. 129-134

(6) Schlede, E., Mischke, U., Roll, R. and Kayser, D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method — An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, p. 455-470.

▼B

(7) Schlede, E., Mischke, U., Diener, W. and Kayser, D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, p. 659-670.

(8) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. Paris.

(9) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.

(10) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, p. 223-231.

(12) Chan, P.K. and Hayes, A.W. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology.* Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd, New York, USA.

▼B

ANNEXE 1

MARCHE À SUIVRE POUR CHACUNE DES DOSES INITIALES

REMARQUES GÉNÉRALES

Les divers schémas d'essai présentés dans la présente annexe indiquent la marche à suivre pour chaque dose initiale.

— Annexe 1 A: dose initiale de 5 mg/kg de poids corporel

— Annexe 1 B: dose initiale de 50 mg/kg de poids corporel

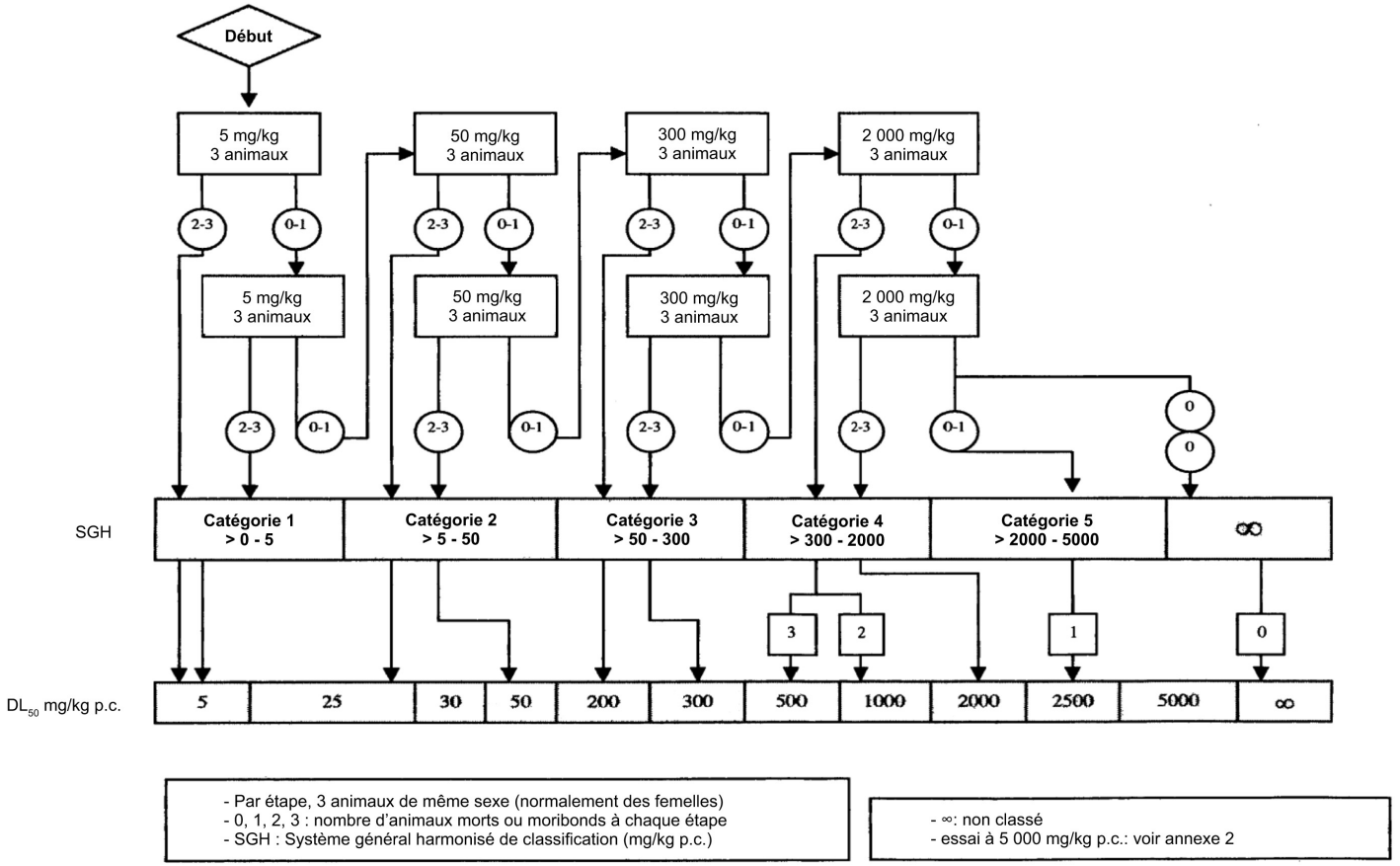
— Annexe 1 C: dose initiale de 300 mg/kg de poids corporel

— Annexe 1 D: dose initiale de 2 000 mg/kg de poids corporel

En fonction du nombre d'animaux trouvés morts ou euthanasiés, la marche à suivre est indiquée par les flèches.

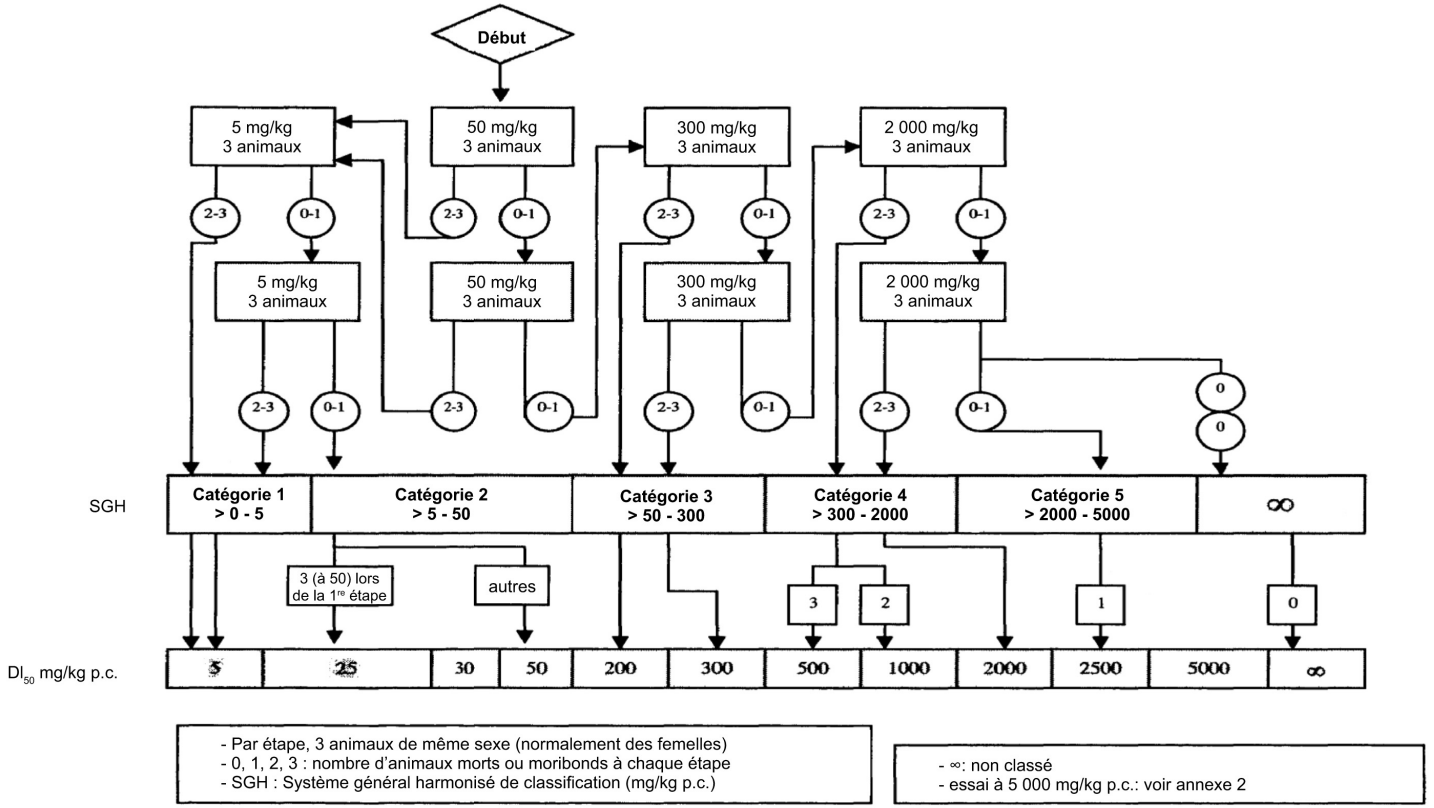
ANNEXE 1 A

MODE OPÉRATOIRE POUR UNE DOSE INITIALE DE 5 MG/KG DE POIDS CORPOREL



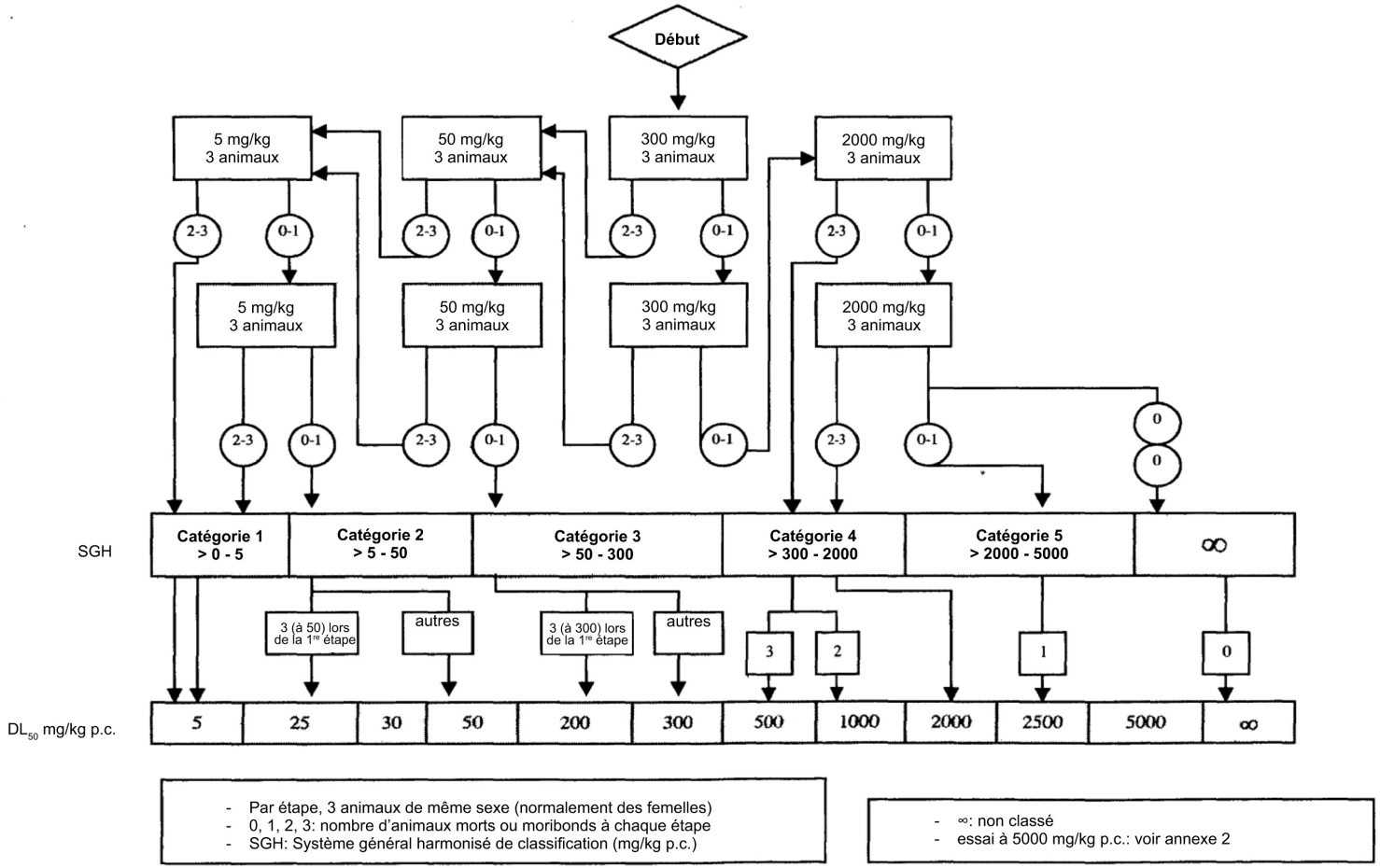
ANNEXE 1 B

MODE OPÉRATOIRE POUR UNE DOSE INITIALE DE 50 MG/KG DE POIDS CORPOREL



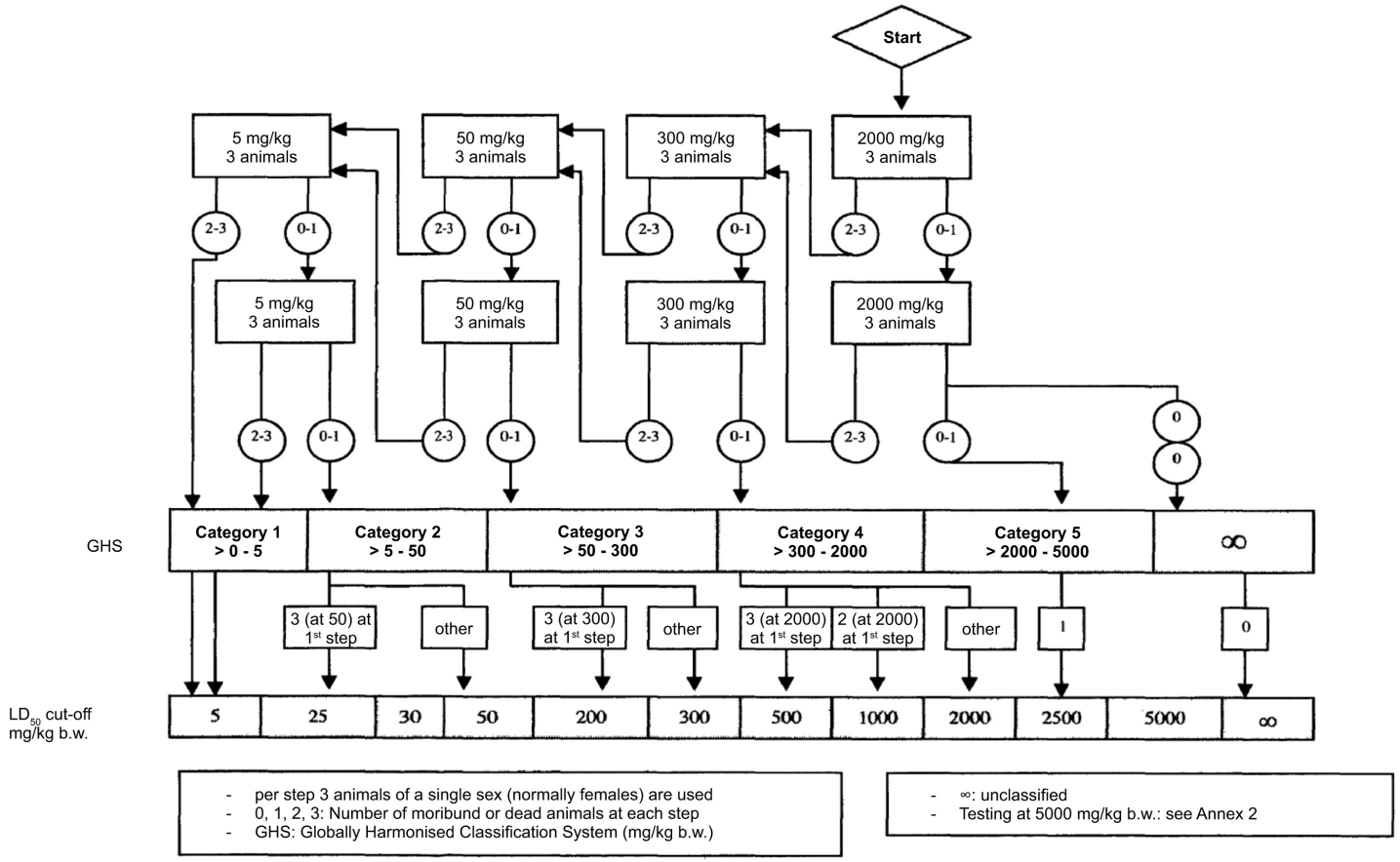
ANNEXE 1 C

MODE OPÉRATOIRE POUR UNE DOSE INITIALE DE 300 MG/KG DE POIDS CORPOREL



ANNEXE 1 D

MODE OPÉRATOIRE POUR UNE DOSE INITIALE DE 2 000 MG/KG DE POIDS CORPOREL



▼B

ANNEXE 2

CRITÈRES POUR LA CLASSIFICATION DE SUBSTANCES D'ESSAI DONT ON PRÉSUME QUE LA DL_{50} EST SUPÉRIEURE À 2 000 MG/KG, SANS RECOURIR À L'ESSAI

Les critères pour la catégorie de danger 5 sont destinés à permettre l'identification de substances qui ont une toxicité aiguë relativement faible mais qui, dans certaines conditions, peuvent se révéler dangereuses pour des populations vulnérables. Ces substances sont présumées avoir une DL_{50} orale ou cutanée comprise dans la plage 2 000 - 5 000 mg/kg ou correspondant à des doses équivalentes par d'autres voies. Les substances d'essai devraient être classées dans la catégorie SGH de danger 5, définie par 2 000 mg/kg < DL_{50} < 5 000 mg/kg, dans les cas suivants:

a) lorsque, en fonction de la mortalité, l'un des schémas des annexes 1A à 1 D oriente la substance vers cette catégorie;

b) lorsque l'on est déjà en possession de données fiables indiquant que la DL_{50} se situera dans la plage des valeurs de la catégorie 5; ou lorsque d'autres études sur des animaux ou l'observation d'effets toxiques chez l'homme suscitent de sérieuses inquiétudes pour la santé humaine;

c) par extrapolation, évaluation ou mesure de données, lorsque la classification dans une catégorie de plus grand danger n'est pas justifiée, et

   — il existe des informations fiables faisant état d'effets toxiques significatifs chez l'homme, ou

   — une certaine mortalité est observée en testant par voie orale jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, ou

   — lorsqu'un jugement d'expert confirme l'existence de signes cliniques significatifs de toxicité lors d'un essai mené jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, hormis diarrhée, hérissement des poils ou aspect mal soigné, ou

   — quand un jugement d'expert confirme l'existence d'informations fiables indiquant la possibilité d'effets aigus significatifs d'après les résultats des autres études sur animaux.

ESSAIS À DOSES SUPÉRIEURES À 2 000 MG/KG

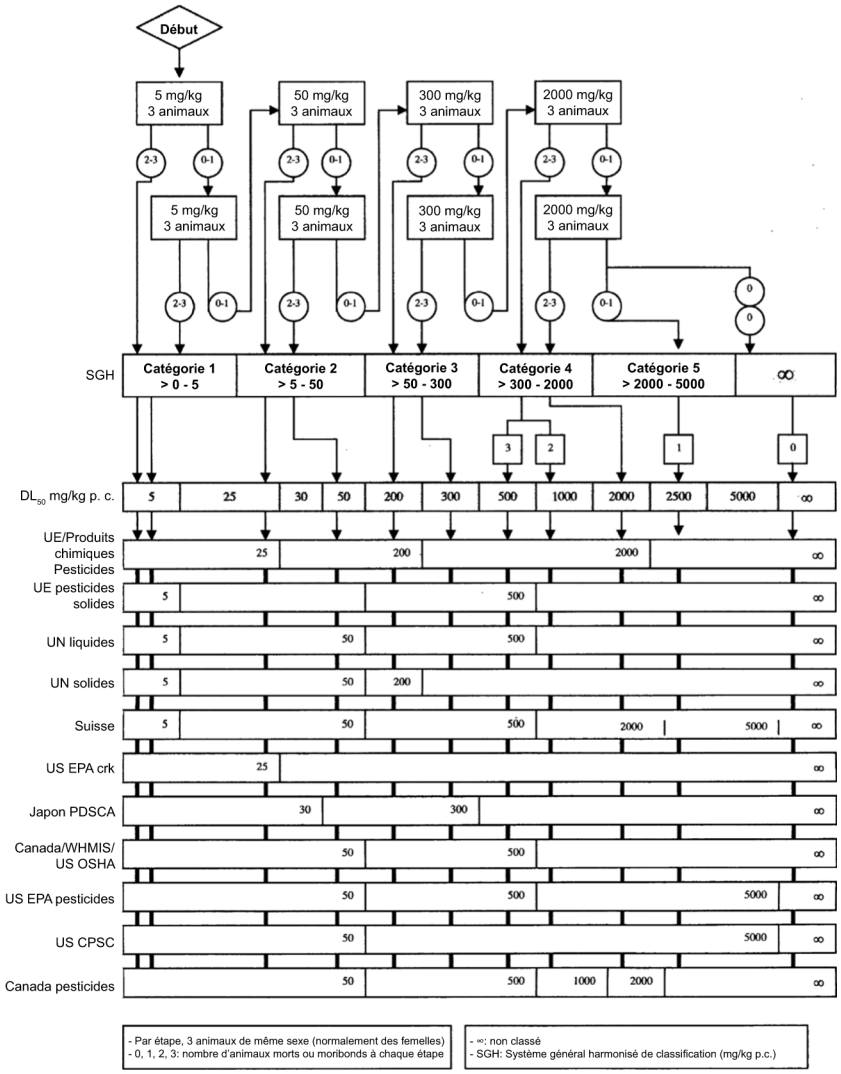
Par souci de protection des animaux, l'essai de substances à la dose de 5 000 mg/kg est déconseillé et ne devrait être envisagé que lorsqu'il est fort probable que les résultats d'un tel essai présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé des hommes et des animaux (10). Aucun essai ne doit être effectué à des doses plus élevées.

Lorsqu'un essai à 5 000 mg/kg est nécessaire, une seule étape suffit (c'est-à-dire trois animaux). Si le premier animal traité meurt, l'essai se poursuit à la dose de 2 000 mg/kg comme indiqué dans les schémas de l'annexe 1. Si le premier animal traité survit, deux autres animaux sont traités. Si un seul des trois animaux meurt, la DL_{50} est présumée supérieure à 5 000 mg/kg. Si les deux animaux meurent, l'essai se poursuit à la dose de 2 000 mg/kg.

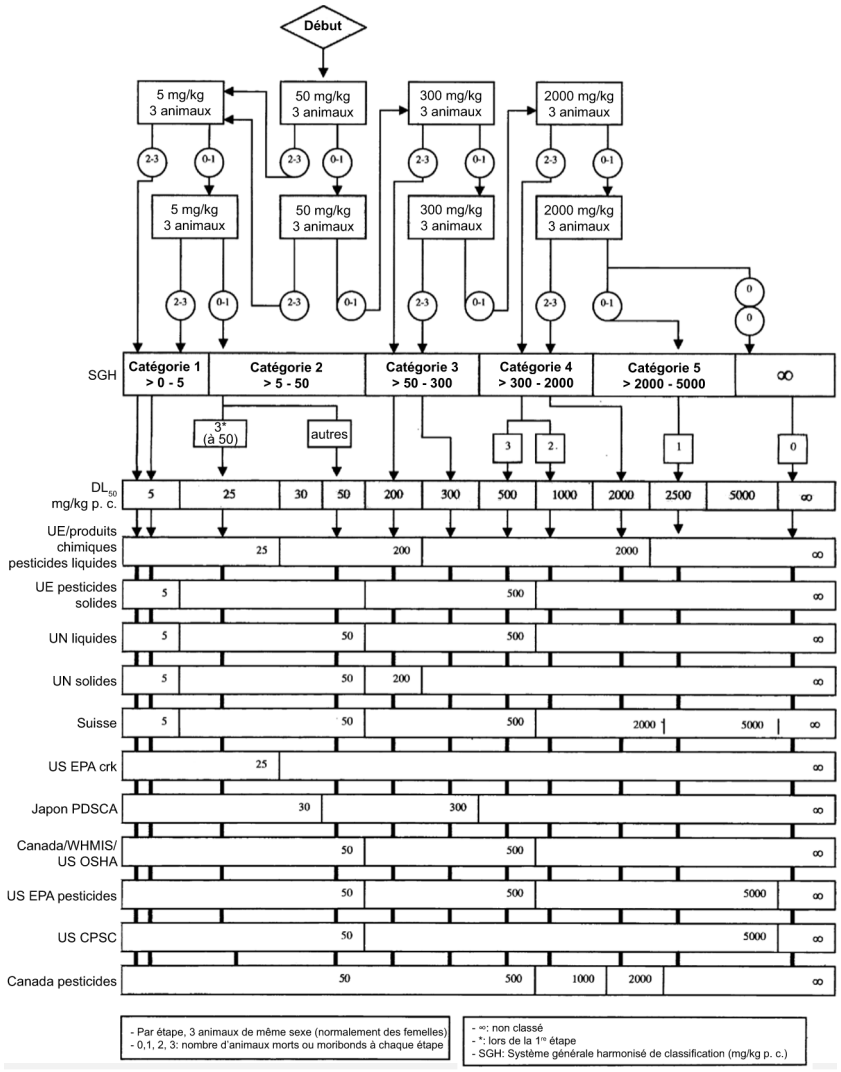
▼B

ANNEXE 3

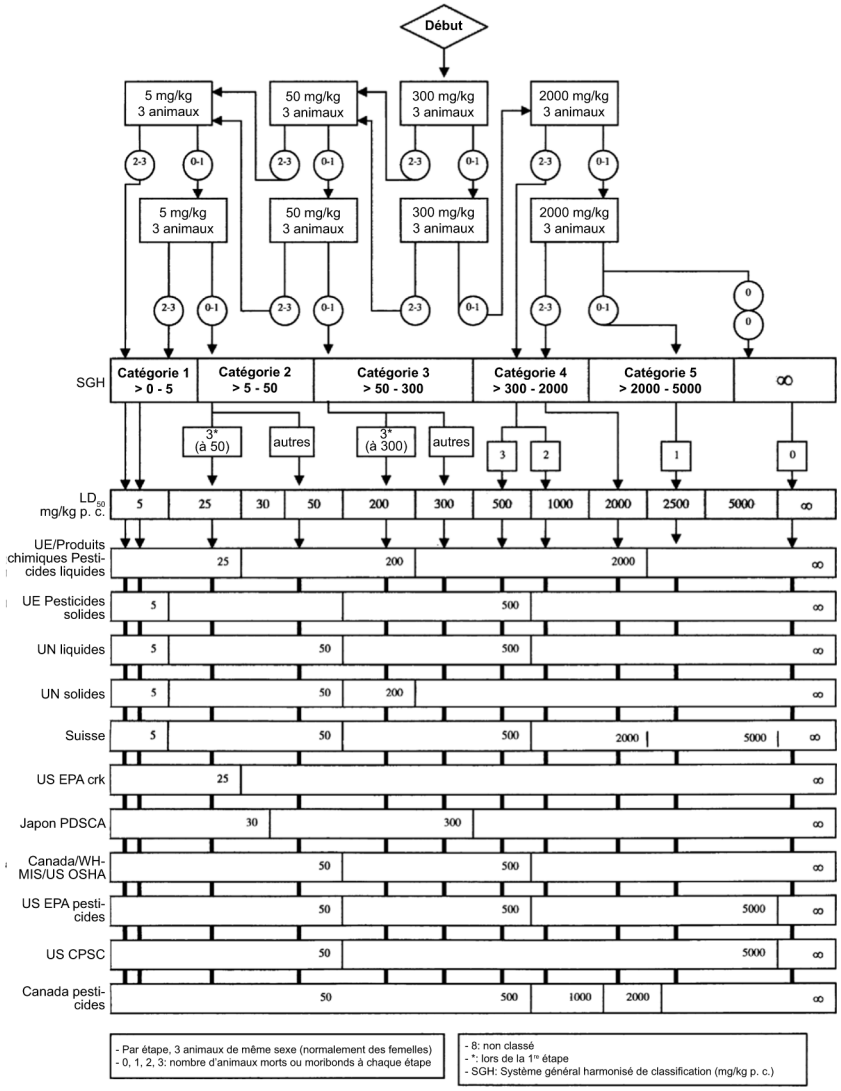
MÉTHODE D'ESSAI B.1 tris Conseils pour une classification selon le système de l'UE en attendant la mise en place effective du système général harmonisé de classification (SGH) [voir référence (8)]



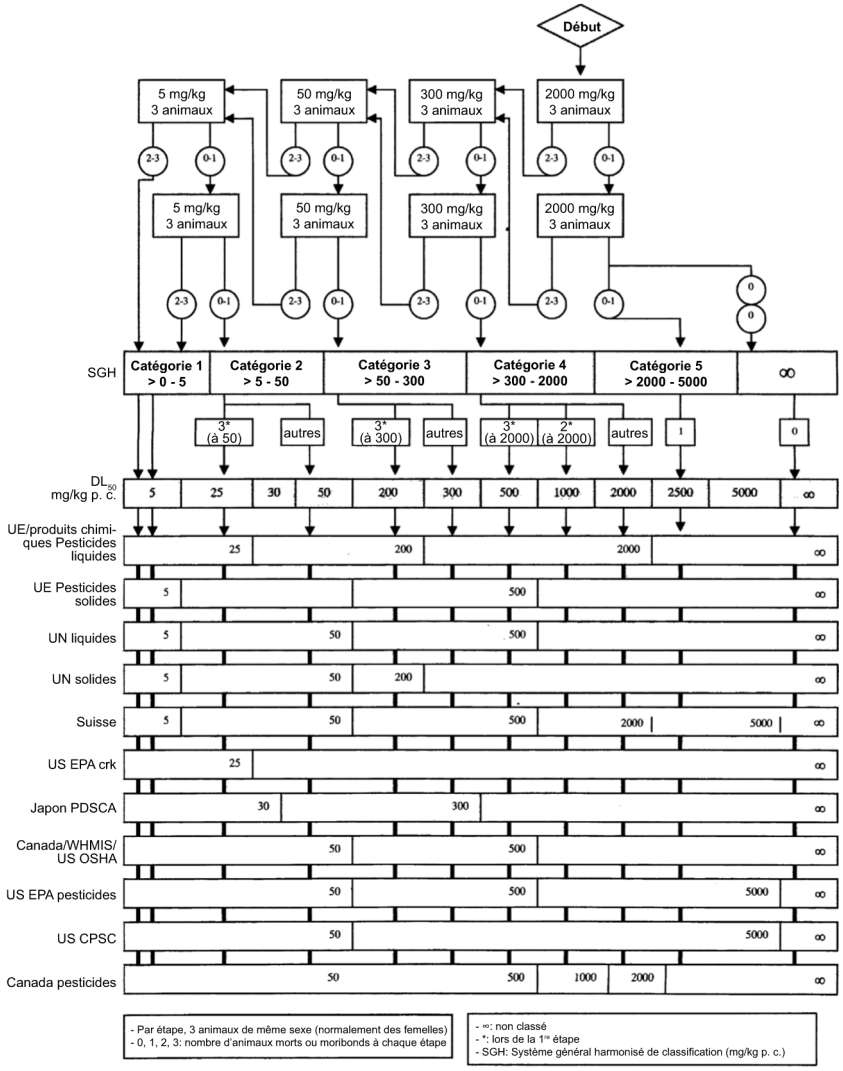
▼B


Début
5 mg/kg 3 animaux
50 mg/kg 3 animaux
300 mg/kg 3 animaux
2000 mg/kg 3 animaux
2-3
0-1
0
SGH
Catégorie 1 > 0 - 5
Catégorie 2 > 5 - 50
Catégorie 3 > 50 - 300
Catégorie 4 > 300 - 2000
Catégorie 5 > 2000 - 5000
∞
3* (à 50)
autres
DL50 mg/kg p. c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
UE/produits chimiques pesticides liquides
UE pesticides solides
UN liquides
UN solides
Suisse
US EPA crk
Japon PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticides
US CPSC
Canada pesticides
- Par étape, 3 animaux de même sexe (normalement des femelles)
- 0,1, 2, 3: nombre d'animaux morts ou moribonds à chaque étape
- ∞: non classé
- *: lors de la 1re étape
- SGH: Système générale harmonisé de classification (mg/kg p. c.)

▼B


Début
5 mg/kg 3 animaux
50 mg/kg 3 animaux
300 mg/kg 3 animaux
2000 mg/kg 3 animaux
2-3
0-1
0
SGH
Catégorie 1 > 0 - 5
Catégorie 2 > 5 - 50
Catégorie 3 > 50 - 300
Catégorie 4 > 300 - 2000
Catégorie 5 > 2000 - 5000
∞
3* (à 50)
autres
3* (à 300)
autres
3
2
1
0
LD50 mg/kg p. c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
UE/Produits chimiques Pesticides liquides
25 200 2000 ∞
UE Pesticides solides
5 500 ∞
UN liquides
5 50 500 ∞
UN solides
5 50 200 ∞
Suisse
5 50 500 2000 5000 ∞
US EPA crk
25 ∞
Japon PDSCA
30 300 ∞
Canada/WHMIS/US OSHA
50 500 ∞
US EPA pesticides
50 500 5000 ∞
US CPSC
50 5000 ∞
Canada pesticides
50 500 1000 2000 ∞
- Par étape, 3 animaux de même sexe (normalement des femelles)
- 0, 1, 2, 3: nombre d'animaux morts ou moribonds à chaque étape
- 8: non classé
- *: lors de la 1re étape
- SGH: Système général harmonisé de classification (mg/kg p. c.)

▼B


Début
5 mg/kg 3 animaux
50 mg/kg 3 animaux
300 mg/kg 3 animaux
2000 mg/kg 3 animaux
2-3
0-1
0
SGH
Catégorie 1 > 0 - 5
Catégorie 2 > 5 - 50
Catégorie 3 > 50 - 300
Catégorie 4 > 300 - 2000
Catégorie 5 > 2000 - 5000
∞
3* (à 50)
autres
3* (à 300)
3* (à 2000)
2* (à 2000)
1
DL50 mg/kg p. c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
UE/produits chimiques Pesticides liquides
UE Pesticides solides
UN liquides
UN solides
Suisse
US EPA crk
Japon PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticides
US CPSC
Canada pesticides
- Par étape, 3 animaux de même sexe (normalement des femelles)
- 0, 1, 2, 3: nombre d'animaux morts ou moribonds à chaque étape
- ∞: non classé
- *: lors de la 1re étape
- SGH: Système général harmonisé de classification (mg/kg p. c.)

▼M4

B.2. TOXICITÉ AIGUË PAR INHALATION

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 403 (2009) de l'OCDE (1) pour les essais de produits chimiques. Une première ligne directrice 403 pour les essais de toxicité aiguë par inhalation a été adoptée en 1981. La présente méthode d'essai B.2 (équivalente à la ligne directrice 403 révisée a été conçue afin d'offrir une plus grande souplesse, de réduire l'utilisation d'animaux et de répondre aux exigences règlementaires. Elle décrit deux types d'études: un protocole traditionnel de détermination de la CL_{50} et un protocole «concentration × temps» (C × t). Les principales caractéristiques de cette ligne directrice tiennent au fait qu'elle permet d'obtenir une relation concentration-réponse pour les effets non létaux à létaux, afin d'en déduire une concentration létale médiane (CL_{50}), une concentration seuil non létale (comme la CL_{01}) et une pente, ainsi que de déterminer si un des sexes est plus sensible à la substance d'essai. Le protocole C × t est utilisé lorsque s'applique une réglementation particulière ou pour un besoin scientifique qui nécessite un essai sur des animaux pour plusieurs durées d'exposition différentes, par exemple à des fins d'aménagement du territoire ou de planification des interventions d'urgence: calcul des niveaux guides d'exposition aiguë, recommandations pour la planification des mesures d'urgence, niveaux seuil d'exposition aiguë, etc.

2. On trouvera dans le document d'orientation nº 39 sur les essais de toxicité aiguë par inhalation (document d'orientation 39) des indications sur la conduite et l'interprétation des études liées à la présente méthode d'essai (2).

3. Le document d'orientation 39 (2) regroupe les définitions utilisées dans le contexte de la présente méthode d'essai.

4. La présente méthode d'essai permet de caractériser les substances d'essai, de les soumettre à une évaluation quantitative des risques, et de classer conformément au règlement (CE) nº 1272/2008 (3). Le document d'orientation 39 (2) fournit des indications sur le choix de la méthode d'essai appropriée pour les essais de toxicité aiguë. Lorsque seules sont requises des informations sur la classification et l'étiquetage, le chapitre B.52 de la présente annexe (4) est généralement recommandé [voir document d'orientation 39 (2)]. La méthode d'essai B.2 n'est pas spécifiquement destinée à tester des matériaux spéciaux comme les substances isométriques ou fibreuses faiblement solubles ou les nanomatériaux manufacturés.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

5. Avant d'entreprendre un essai conformément à la présente méthode d'essai, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, y compris les études existantes [par exemple, le chapitre B.52 de la présente annexe (4)] dont les résultats éviteraient des essais supplémentaires, afin de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination de l'espèce, de la souche, du sexe, du mode d'exposition et des concentrations d'essai appropriés, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, les résultats de tous les essais de toxicité in vitro ou in vivo auxquels elle a été soumise, son (ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine, les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées, voir document d'orientation 39 (2).

▼M4

6. Il convient d'éviter autant que possible de tester des substances corrosives et/ou irritantes à des concentrations susceptibles d'engendrer une souffrance sévère et/ou une détresse. Pour déterminer s'il est possible de renoncer à des essais complémentaires, le potentiel de corrosion/d'irritation fait l'objet d'une évaluation reposant sur un jugement d'expert basé sur les éléments suivants: données expérimentales sur l'homme et l'animal (provenant, par exemple, d'essais à doses répétées réalisés à des concentrations non corrosives ou irritantes), données in vitro existantes [par exemple chapitres B.40 (5), B.40 *bis* (6) de la présente annexe, ou ligne directrice 435 de l'OCDE (7)], valeurs du pH, informations concernant des substances analogues ou toute autre donnée pertinente. À des fins règlementaires spécifiques (par exemple pour l'établissement de plans d'urgence), la présente méthode d'essai peut être utilisée pour exposer des animaux à ces substances car elle donne au directeur de l'étude ou à l'investigateur principal la maîtrise du choix des concentrations cibles. Celles-ci ne doivent cependant pas induire d'effets corrosifs/irritants importants, mais elles sont suffisantes pour prolonger la courbe de concentration-réponse jusqu'à des niveaux correspondant à l'objectif scientifique et règlementaire de l'essai. Ces concentrations sont choisies au cas par cas et une justification du choix des concentrations est apportée, voir document d'orientation 39 (2).

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. La présente méthode d'essai B.2 révisée doit en principe permettre d'obtenir des informations suffisantes sur la toxicité aiguë d'une substance d'essai pour procéder à son classement, et fournir les données sur sa létalité nécessaires aux évaluations quantitatives des risques (CL_{50}, CL_{01} et pente, par exemple) pour l'un des sexes ou les deux. Cette méthode d'essai propose deux méthodes. La première suit un protocole traditionnel dans lequel des groupes d'animaux sont exposés à une concentration limite (essai limite) ou à une série de concentrations suivant un processus séquentiel pendant une durée prédéterminée de quatre heures en général. Des objectifs règlementaires spécifiques peuvent nécessiter de recourir à d'autres durées d'exposition. La seconde méthode suit un protocole «concentration x temps» ($C \times t$) dans lequel des groupes d'animaux sont exposés à une concentration (concentration limite) ou à une série de concentrations différentes sur des durées différentes.

8. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés. Ils sont pris en compte dans l'interprétation des résultats de l'essai au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente (8).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces animales

9. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

10. Les femelles sont nullipares et non gravides. Le jour de leur exposition, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 8 à 12 semaines. Leur poids corporel n'excède pas, pour chaque sexe, ± 20 % du poids moyen des animaux du même âge précédemment exposés. Sélectionnés au hasard, les animaux sont marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, ils sont conservés dans leur cage pour une période d'au minimum 5 jours avant le début de l'essai. Les animaux sont également acclimatés aux appareils d'essai, pendant une courte période précédant l'essai, afin d'atténuer le stress causé par leur introduction dans un nouvel environnement.

▼M4

Conditions d'élevage des animaux

11. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est de 22 ± 3 °C. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal, et ne doit engendrer qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés «nez seul», il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne doivent pas provoquer chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable, alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés «corps entier» à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour empêcher la filtration de l'aérosol d'essai par la fourrure des congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

Chambre d'inhalation

12. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de la substance d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition «nez seul» (qui inclut les dispositifs «tête seule», «nez seul» et «museau seul») est privilégié. Le mode d'exposition «nez seul» est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition «corps entier» peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais cela est alors justifié dans le rapport d'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition «corps entier», on veille à ce que le volume total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (2) décrit les principes des techniques d'exposition «corps entier» ou «nez seul», ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques.

CONDITIONS D'EXPOSITION

Administration des concentrations

13. Les expositions «nez seul» peuvent durer jusqu'à 6 heures pour les rats. Pour les souris, les expositions «nez seul» ne dépassent pas 4 heures en général. Si des essais d'une durée plus longue sont nécessaires, une justification est apportée, voir document d'orientation 39 (2). Les animaux exposés «corps entier» à des aérosols demeurent seuls dans la chambre afin d'éviter l'ingestion de la substance d'essai par le toilettage de leurs compagnons. Les animaux sont privés de nourriture pendant la période d'exposition. Dans une exposition «corps entier», les animaux peuvent boire de l'eau.

14. Les animaux sont exposés à la substance d'essai présentée sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou sous une forme mixte. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, de la concentration choisie, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion.

▼M4

Répartition granulométrique

15. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles de se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 4 μm, avec un écart type géométrique (σg) compris entre 1,5 et 3,0 (2) (9) (10). Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques peuvent avoir une taille inférieure à cette norme, tandis que les particules chargées, les fibres et les substances hygroscopiques (dont la taille augmente dans l'environnement humide de l'appareil respiratoire) peuvent avoir une taille supérieure.

Préparation de la substance d'essai dans un véhicule

16. Pour atteindre la concentration et la taille granulométrique appropriées de la substance d'essai, il est possible d'avoir recours à un véhicule; en règle générale, l'eau est choisie de préférence. Les substances particulaires peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin d'atteindre la répartition granulométrique requise, mais un soin particulier devra être pris de ne pas décomposer ou altérer la substance d'essai. Lorsque les procédés mécaniques sont suspectés d'avoir altéré la composition de la substance d'essai (température extrême due aux frictions d'un broyage excessif, par exemple), la composition de la substance d'essai devra être vérifiée analytiquement. On prendra soin de ne pas contaminer la substance d'essai. Il n'est pas nécessaire de tester les substances granulaires non friables qui sont élaborées précisément pour ne pas être inhalables. Un test d'usure de surface est réalisé pour démontrer que la manipulation de la substance granulaire ne produit pas de particules respirables. Dans le cas contraire, un essai de toxicité par inhalation est réalisé.

Animaux témoins

17. Un groupe témoin négatif (air) n'est pas nécessaire. Lorsqu'un véhicule autre que l'eau est utilisé pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est utilisé seulement quand on ne dispose pas de données historiques sur la toxicité. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude d'une substance d'essai préparée dans un véhicule, ce dernier est considéré comme non toxique à la concentration testée; il n'y a donc pas lieu d'utiliser de témoin du véhicule.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION

Débit d'air dans la chambre d'exposition

18. Le débit d'air dans la chambre est contrôlé avec soin, surveillé en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les paramètres dynamiques pertinents de production de l'atmosphère d'essai. On prendra particulièrement soin d'éviter toute re-respiration dans les chambres d'exposition «nez seul» lorsque le débit d'air à travers le système d'exposition ne permet pas de produire une circulation dynamique de l'atmosphère contenant la substance d'essai. Des méthodologies sont prévues pour démontrer l'absence de re-respiration dans les conditions expérimentales choisies (2) (11). La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasse pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées.

▼M4

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

19. La température de la chambre d'exposition est maintenue à 22 ± 3 °C. Dans les cas d'exposition «nez seul» et «corps entier» l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est surveillée et enregistrée trois fois au minimum pour les durées allant jusqu'à 4 heures, et toutes les heures pour des durées plus courtes. L'humidité relative est de préférence comprise entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple lorsque la substance d'essai se présente sous forme de solution aqueuse), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences de la substance d'essai avec la méthode d'essai.

Substance d'essai: concentration nominale

20. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de la substance d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai: concentration réelle

21. La concentration réelle est la concentration de la substance d'essai dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à la substance d'essai sont également effectuées par une préétude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre la substance d'essai (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie. Les concentrations cibles, nominales et réelles sont fournies dans le rapport d'étude, mais seules les concentrations réelles sont utilisées dans les analyses statistiques pour calculer la valeur des concentrations létales.

22. Un seul lot de la substance d'essai est utilisé, si possible, et l'échantillon est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il convient de réaliser une caractérisation de la substance d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes: temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de la substance d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).

23. L'atmosphère d'exposition est maintenue aussi constante que possible et suivie soit en continu, soit de façon intermittente suivant la méthode d'analyse. Lorsque l'injection s'effectue de façon intermittente, les échantillons d'atmosphère de la chambre sont prélevés au moins deux fois sur une étude de quatre heures. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, le recueil d'un échantillon pour toute la période d'exposition est acceptable. Si des fluctuations nettes apparaissent d'un échantillon à un autre, on a recours à quatre échantillons par exposition pour les concentrations d'essai suivantes. Les écarts entre la concentration

▼M4

dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas ± 10 % pour les gaz et vapeurs ou ± 20 % pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de la substance d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition t_{95}. Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (2).

24. Pour des systèmes très complexes constitués de gaz ou vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion ou substances d'essai propulsées à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisit donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général la substance active principale dans le mélange. Quand la substance d'essai est un mélange, la concentration analytique devra être indiquée pour le mélange et pas uniquement pour la substance active ou le composant (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Substance d'essai: répartition granulométrique

25. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum deux fois pour chaque exposition de 4 heures à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques. Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade et l'autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, voir document d'orientation 39 (2). Si cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au minimum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter une exposition. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes (voir paragraphe 15).

MODE OPÉRATOIRE

26. Les deux types d'études décrits ci-dessous sont le protocole traditionnel et le protocole C × t. Tous deux peuvent comprendre une étude préliminaire, une étude principale et/ou un essai limite (protocole traditionnel) ou un essai à une concentration limite (C × t). Si l'un des sexes est connu pour être plus sensible à la substance d'essai, le directeur de l'étude peut choisir de réaliser ces essais avec seulement des animaux de ce sexe. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Avant le début de l'étude, toutes les données disponibles sont examinées afin de réduire l'usage des animaux. Par exemple, les données obtenues selon le chapitre B.52 de la présente annexe (4) peuvent supprimer la nécessité d'une étude préliminaire et aussi démontrer si l'un des sexes est plus sensible à la substance d'essai, voir document d'orientation 39 (2).

▼M4

PROTOCOLE TRADITIONNEL

Considérations générales sur le protocole traditionnel

27. Dans une étude traditionnelle, des groupes d'animaux sont exposés à une substance d'essai pendant une période de temps fixée (généralement 4 heures) dans une chambre d'exposition «nez seul» ou «corps entier». Les animaux sont exposés soit à une concentration limite (essai limite), soit à trois concentrations au minimum selon une procédure séquentielle (étude principale). Une étude préliminaire peut précéder l'étude principale, sauf s'il existe déjà des informations concernant la substance d'essai, provenant par exemple d'une étude précédente effectuée selon l'étude B.52, voir document d'orientation 39 (2).

Étude préliminaire pour le protocole traditionnel

28. Une étude préliminaire permet d'estimer l'activité de la substance d'essai, d'identifier des différences entre les sexes quant à la sensibilité à cette substance, et de choisir plus facilement les niveaux de concentration pour l'étude principale ou l'essai limite. Lors du choix des niveaux de concentration pour l'étude préliminaire, toutes les informations disponibles sont prises en compte, y compris les données (Q)SAR et les données correspondant à des produits chimiques analogues. Pour chaque concentration, on exposera au maximum trois mâles et trois femelles (il peut être nécessaire d'utiliser 3 animaux par sexe pour établir une différence de sensibilité entre les sexes). Une étude préliminaire peut être effectuée avec une seule concentration, ou plusieurs si nécessaire. Elle ne porte pas sur un nombre d'animaux ou de concentrations tel qu'elle ressemblerait à une étude principale. Il est possible d'utiliser les résultats d'une étude B.52 (4) précédente au lieu de réaliser une étude préliminaire, voir document d'orientation 39 (2).

Essai limite pour le protocole traditionnel

29. L'essai limite est utilisé si l'on sait ou si l'on prévoit que la substance d'essai sera virtuellement non toxique, c'est-à-dire qu'elle ne suscitera une réponse de toxicité qu'au-delà de la concentration limite réglementaire. Dans un essai limite, un seul groupe de trois mâles et trois femelles est exposé à la substance d'essai à une concentration limite. Des informations sur la toxicité de la substance d'essai peuvent être tirées d'essais déjà pratiqués sur des substances analogues, en tenant compte de l'identité et du pourcentage des composants dont la toxicité est avérée. Si l'on manque d'informations sur la toxicité de la substance d'essai, ou si l'on s'attend à ce qu'elle soit toxique, l'essai principal est réalisé.

30. Le choix des concentrations limites dépend généralement des exigences règlementaires. Lorsqu'on applique le règlement (CE) nº 1272/2008, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l (ou, à défaut, la concentration maximale pouvant être atteinte) (3). Il peut s'avérer techniquement difficile d'atteindre les concentrations limites de certaines substances d'essai, en particulier pour les vapeurs et les aérosols. Pour les essais d'aérosols, le principal objectif est d'atteindre une taille de particule qui soit respirable (c'est-à-dire d'un DAMM de 1 à 4 μm), ce qui est possible avec la plupart des substances d'essai à des concentrations de 2 mg/l. Les essais sur des aérosols à des concentrations supérieures à 2 mg/l ne sont tentés que si l'on peut obtenir des particules de taille respirable, voir document d'orientation 39 (2). Selon le règlement (CE) nº 1272/2008, il est déconseillé de réaliser des essais au-delà des concentrations limites pour des raisons de bien-être des animaux (3). Les essais aux concentrations limites ne sont envisagés que s'il est très probable que leurs résultats présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé humaine (3), et une justification est fournie dans le rapport d'étude. En cas de substance potentiellement explosive, on prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de provoquer une explosion. Afin d'éviter le recours inutile à des animaux, un essai sans animaux est effectué avant l'essai limite pour s'assurer qu'il est possible d'atteindre dans la chambre les conditions expérimentales d'un essai limite.

▼M4

31. Si une mortalité ou un état moribond sont observés à la concentration limite, les résultats de l'essai limite peuvent servir d'étude préliminaire pour les essais suivants à d'autres concentrations (voir étude principale). Si la concentration limite est impossible à atteindre du fait des propriétés physiques ou chimiques de la substance d'essai, c'est la concentration maximale pouvant être atteinte qui devra être testée. Si la létalité à cette concentration est inférieure à 50 %, il n'y a pas lieu de poursuivre l'essai. Si la concentration limite n'a pas pu être atteinte, une explication, étayée par des données, est fournie dans le rapport d'étude. Si la concentration maximale pouvant être atteinte pour une vapeur ne provoque pas de toxicité, il peut être nécessaire de produire la substance d'essai sous la forme d'un aérosol liquide.

Étude principale pour le protocole traditionnel

32. Une étude principale fait en général appel à cinq mâles et cinq femelles (ou cinq animaux du sexe le plus sensible, s'il est connu) par niveau de concentration, avec au minimum trois niveaux de concentration. Les niveaux de concentration sont suffisamment nombreux pour que l'on puisse obtenir une analyse statistique fiable. L'intervalle de temps entre l'exposition des différents groupes est déterminé par le moment d'apparition, la durée et la gravité des signes de toxicité observés. L'exposition au niveau de concentration supérieur est retardée jusqu'à ce que l'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Le directeur de l'étude peut alors ajuster la concentration cible pour le groupe suivant. Pour les essais de toxicité par inhalation, qui nécessitent des technologies sophistiquées, il ne sera pas toujours possible de procéder ainsi, c'est pourquoi l'exposition des animaux à la concentration supérieure devra se baser sur l'expérience acquise et un jugement scientifique. Pour les essais portant sur des mélanges, il convient de se référer au document d'orientation 39 (2).

PROTOCOLE «CONCENTRATION × TEMPS» (C × T)

Considérations générales sur le protocole C × t

33. Une étude séquentielle «concentration × temps» (C × t) peut constituer une alternative au protocole traditionnel lorsqu'il s'agit d'évaluer la toxicité par inhalation (12) (13) (14). Avec cette approche, les animaux sont exposés à la substance d'essai à plusieurs niveaux de concentration et pour des durées d'exposition variables. Tous les essais sont réalisés dans des chambres d'exposition «nez seul», les chambres «corps entier» ne se prêtant pas à ce protocole. Un exemple de procédure séquentielle illustrant ce protocole est présenté à l'appendice 1. Une analyse de simulation a montré que le protocole traditionnel et le protocole C × t étaient tous les deux capables de donner des valeurs fiables de la CL_{50}, mais que le protocole C × t permettait en général d'obtenir des valeurs plus sûres pour la CL_{01} et la CL_{10} (15).

34. Une analyse de simulation a démontré qu'il convient généralement d'utiliser deux animaux par intervalle de C × t (un animal de chaque sexe ou deux animaux du sexe le plus sensible) pour tester 4 concentrations et 5 durées d'exposition lors de l'étude principale. Le directeur de l'étude peut choisir, dans certaines circonstances, d'utiliser deux rats de chaque sexe par intervalle de C × t (15), de manière à réduire le biais et la variabilité des estimations, augmenter le taux de succès de l'estimation et améliorer la couverture de l'intervalle de confiance. Cependant, en cas d'ajustement insuffisant aux données (en utilisant un animal par sexe ou deux animaux du sexe le plus sensible), une cinquième concentration d'exposition peut également suffire. Pour plus d'informations sur le nombre d'animaux et les concentrations à utiliser pour une étude C × t, se reporter au document d'orientation 39 (2).

▼M4

Étude préliminaire pour le protocole C × t

35. Une étude préliminaire permet d'estimer l'activité de la substance d'essai et facilite le choix des niveaux de concentration pour l'étude principale. Une étude préliminaire avec au maximum trois animaux par sexe et par concentration (pour plus de détails, voir l'appendice III du document d'orientation 39) (2) peut être utilisée afin de sélectionner une concentration de départ appropriée pour l'étude principale et de réduire le nombre d'animaux utilisés. Il peut en effet être nécessaire de recourir à trois animaux par sexe pour établir une différence selon le sexe. Ces animaux sont soumis à une exposition unique, d'une durée de 240 minutes en général. Pour évaluer la faisabilité de la production d'atmosphères d'essai appropriées, des essais techniques préliminaires sans animaux sont réalisés. Il n'est généralement pas nécessaire de procéder à une étude préliminaire si l'on dispose de données de mortalité provenant d'une étude effectuée suivant la méthode B.52 (4). Pour choisir la concentration cible initiale dans une étude B.2, le directeur de l'étude tient compte des profils de mortalité observés dans n'importe quelle étude B.52 (4) disponible, pour les deux sexes et pour toutes les concentrations testées, voir document d'orientation 39 (2).

Concentration initiale pour le protocole C × t

36. La concentration initiale (Session d'exposition I) (voir appendice 1) est soit une concentration limite, soit une concentration choisie par le directeur de l'étude sur la base d'une étude préliminaire. Des groupes constitués d'un animal de chaque sexe sont exposés à cette concentration pendant des périodes de durée variable (15, 30, 60, 120 ou 240 minutes, par exemple), soit un total de 10 animaux, pour ce qu'on appelle la Session d'exposition I (voir appendice 1).

37. Le choix des concentrations limites dépend généralement des exigences règlementaires. Lorsqu'on applique le règlement (CE) nº 1272/2008, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l (ou, à défaut, la concentration maximale pouvant être atteinte) (3). Il peut s'avérer techniquement difficile d'atteindre les concentrations limites de certaines substances d'essai, en particulier pour les vapeurs et les aérosols. Pour les essais d'aérosols, l'objectif est d'atteindre une taille de particule qui soit respirable (c'est-à- dire un DAMM de 1 à 4 μm), ce qui est possible avec la plupart des substances d'essai à des concentrations de 2 mg/l. Les essais sur des aérosols à des concentrations supérieures à 2 mg/l ne sont tentés que si l'on peut obtenir des particules de taille respirable, voir document d'orientation 39 (2). Selon le règlement (CE) nº 1272/2008, il est déconseillé de réaliser des essais au-delà des concentrations limites pour des raisons de bien-être des animaux (3). Les essais au-delà de la concentration limite ne sont envisagés que s'il est très probable que leurs résultats présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé humaine (3), et une justification est alors fournie dans le rapport d'étude. En cas de substance potentiellement explosive, on prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de provoquer une explosion. Afin d'éviter le recours inutile à des animaux, un essai sans animaux est effectué avant l'essai à la concentration initiale pour s'assurer qu'il est possible d'atteindre dans la chambre les conditions expérimentales d'un essai à cette concentration.

38. Si une mortalité ou un état moribond sont observés à la concentration initiale, les résultats obtenus à cette concentration peuvent servir de point de départ pour les essais suivants à d'autres concentrations (voir étude principale). Si la concentration limite est impossible à atteindre du fait des propriétés physiques ou chimiques de la substance d'essai, c'est la concentration maximale pouvant être atteinte qui est testée. Si la létalité à cette concentration est inférieure à 50 %, il n'y a pas lieu de poursuivre l'essai. Si la concentration limite n'a pas pu être atteinte, une explication, étayée par des données, est fournie dans le rapport d'étude. Si la concentration maximale pouvant être atteinte pour une vapeur ne provoque pas de toxicité, il peut être nécessaire de produire la substance d'essai sous la forme d'un aérosol liquide.

▼M4

Étude principale pour le protocole C × t

39. La concentration initiale (session d'exposition I) (voir appendice 1) testée dans l'étude principale est soit une concentration limite, soit une concentration choisie par le directeur de l'étude sur la base d'une étude préliminaire. Si une mortalité a été observée pendant ou après la session I, l'exposition minimale (C × t) qui a provoqué la mortalité sert de guide pour déterminer la concentration et les périodes d'exposition pour la session II. Chaque session d'exposition suivante dépendra de la session précédente (voir appendice 1).

40. Pour de nombreuses substances d'essai, les résultats obtenus à la concentration initiale, plus ceux obtenus lors de trois sessions d'exposition supplémentaires sur une échelle de temps plus courte (la durée des périodes d'exposition successives suivant une progression géométrique de facteur $\sqrt{2}$), sont suffisants pour établir la relation de mortalité C × t (15). Nonobstant, il peut être utile de recourir à une cinquième concentration d'exposition [voir appendice 1 et document d'orientation 39 (2)]. Pour le traitement mathématique des résultats concernant le protocole C × t, voir appendice 1.

OBSERVATIONS

41. Un examen clinique des animaux est pratiqué régulièrement pendant la période d'exposition. Après l'exposition, des examens cliniques sont réalisés au minimum deux fois le jour de l'exposition, ou plus fréquemment suivant la réponse des animaux au traitement, et au minimum une fois par jour par la suite pendant une période de 14 jours. La durée de la période d'observation n'est pas fixée, mais est déterminée par la nature et le moment d'apparition des signes cliniques, ainsi que par la durée de la période de récupération. Les moments d'apparition et de disparition des signes de toxicité sont importants, en particulier quand on constate un certain retard dans l'apparition de ces signes. Toutes les observations sont systématiquement enregistrées individuellement pour chaque animal. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés pour des raisons de bien-être animal. Lors de l'examen clinique des signes de toxicité, il convient de veiller à ne pas confondre une piètre apparence initiale et des troubles respiratoires passagers, imputables à la procédure d'exposition, avec une toxicité de la substance d'essai qui impliquerait d'euthanasier les animaux plus tôt. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets mesurés éthiquement acceptables sont pris en considération, voir document d'orientation 19 (7). Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.

42. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, mais aussi sur les changements affectant l'appareil respiratoire, le système circulatoire, les systèmes nerveux autonome et central, ainsi que l'activité somatomotrice et le comportement. Toute différentiation entre les effets locaux et systémiques est consignée autant que possible. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma doivent retenir l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement.

Poids corporel

43. Le poids corporel de chacun des animaux est enregistré une fois lors de la période d'acclimatation, le jour de l'exposition (jour 0) juste avant celle-ci et au moins les jours 1, 3, et 7 (puis de façon hebdomadaire par la suite), ainsi qu'au moment de la mort ou de l'euthanasie, s'il est postérieur au jour 1. Le poids corporel est un indicateur critique reconnu de la toxicité, on surveille donc attentivement les animaux, dont le poids reste constamment inférieur de 20 %, ou plus à celui précédant l'étude. Les animaux survivants sont pesés et euthanasiés à la fin de la période postexposition.

▼M4

Pathologie

44. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai ou euthanasiés et écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une autopsie macroscopique. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.

45. D'autres observations, ajoutées a priori à dessein, peuvent être envisagées afin d'élargir l'interprétation de l'étude, comme la mesure du poids pulmonaire des rats survivants et/ou la mise en évidence d'une irritation par examen de l'appareil respiratoire au microscope. Peuvent aussi être examinés les organes montrant une pathologie macroscopique chez les animaux survivant au moins 24 heures, et ceux pour lesquels une réaction au traitement est connue ou attendue. Un examen microscopique de l'intégralité de l'appareil respiratoire peut fournir des informations utiles pour les substances d'essai réactives à l'eau, comme les acides et les substances hygroscopiques.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

46. Pour chacun des animaux, le poids corporel et les conclusions de l'autopsie sont fournis. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquer pour chaque groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie.

Rapport d'essai

47. Le rapport d'essai contient, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage:

— description des conditions d'encagement, y compris: nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire,

— espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat,

— nombre, âge et sexe des animaux,

— méthode de randomisation,

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau),

— description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

▼**M4**

Substance d'essai:

— nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation),

— données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule:

— justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau),

— données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation:

— description de la chambre d'inhalation avec ses dimensions et son volume,

— source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère,

— équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle,

— source de l'air, traitement de l'air fourni/évacué et système de climatisation utilisé,

— méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai,

— différence de pression (positive ou négative),

— orifices d'exposition par chambre («nez seul») ou emplacement des animaux dans la chambre («corps entier»),

— homogénéité/stabilité temporelle de l'atmosphère d'essai,

— situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition,

— débits d'air, débit d'air par orifice d'exposition («nez seul») ou rapport du volume de l'animal à la chambre («corps entier»),

— informations sur l'équipement utilisé, le cas échéant, pour mesurer l'oxygène et le dioxyde de carbone,

— temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}),

— nombre de changements de volume par heure,

— doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition:

— justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale,

— concentrations nominales (masse totale de la substance d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre),

— concentrations réelles de la substance d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges à tester produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément,

▼M4

— toutes les concentrations atmosphériques sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m^3, etc.); les unités de volume (ppm, ppb, etc.) peuvent aussi être indiquées entre parenthèses;

— répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique σ(g), ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales:

— détails sur la préparation de la substance d'essai, y compris sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des matériaux solides ou pour préparer les solutions de la substance d'essai. Lorsque des procédés mécaniques sont susceptibles d'avoir altéré la composition de la substance d'essai, inclure les résultats des analyses effectuées pour vérifier la composition de la substance d'essai,

— description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci,

— détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération de la substance d'essai à partir du milieu d'échantillonnage),

— jutification du choix des concentrations d'essai.

Résultats:

— tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation,

— tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation,

— tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g,

— tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de mortalité, et nature, sévérité, moment d'apparition et durée des effets),

— poids corporel de chacun des animaux enregistrés lors de l'essai, date et heure de leur mort si celle-ci intervient avant l'euthanasie prévue; moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et, le cas échéant, leur réversibilité,

— pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques disponibles,

— estimations de la létalité (CL_{50}, DL_{01} par exemple), notamment limites de confiance à 95 % et pente (si elle est fournie par la méthode d'évaluation),

— relation statistique, y compris l'estimation du facteur n (pour le protocole C × t). Le nom du logiciel de statistiques utilisé est indiqué.

▼M4

Discussion et interprétation des résultats:

— un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente méthode d'essai, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules,

— la respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis,

— une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (8),

— si un essai suivant le chapitre B.52 de la présente annexe (4) a dû être interrompu en faveur de la présente méthode d'essai B.2, les justifications sont fournies,

— la cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude,

— la cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) OCDE (2009). Toxicité aiguë par inhalation. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimique nº 403, OCDE Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations nº 39, Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(3) Règlement (CE) nº 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) nº 1907/2006 (JO L 353 du 31.12.2008, p. 1).

(4) Chapitre B.52 de la présente annexe, Toxicité aiguë par inhalation – Méthode par classe de toxicité aiguë (ATC).

(5) Chapitre B.40 de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: Essai de résistance électrique transcutanée (RET).

(6) Chapter B.40 *bis* de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: Essai sur modèle de peau humaine.

(7) OCDE (2005). Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques nº 435, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(8) OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Évaluation. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations nº 19, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.

(10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

(11) Pauluhn J. and Thiel A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167.

(12) Zwart J.H.E., Arts J.M., ten Berge W.F., Appelman L.M. (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278-290.

(13) Zwart J.H.E., Arts J.M., Klokman-Houweling E.D., Schoen E.D. (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105-117.

(14) Ten Berge W.F. and Zwart A. (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65-71.

(15) OCDE (2009), Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement - Série sur les essais et évaluations n° 104, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(16) Finney D.J. (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M4

Appendice 1

Protocole C × t

1. Une étude séquentielle «Concentration × Temps» (C × t) peut constituer une alternative au protocole traditionnel lorsqu'il s'agit d'évaluer la toxicité par inhalation (12) (13) (14). Elle est privilégiée lorsqu'une réglementation particulière s'applique ou pour un besoin scientifique nécessitant des essais sur animaux portant sur des durées d'exposition multiples, par exemple à des fins d'établissement de plans d'intervention d'urgence ou d'aménagement du territoire. Cette approche débute en général avec un essai à la concentration limite (session d'exposition I) au cours duquel les animaux sont exposés à la substance d'essai pendant cinq périodes de durées différentes (15, 30, 60, 120 et 240 minutes par exemple) de façon à obtenir plusieurs durées d'exposition pour une même séance (voir figure 1). Lorsqu'on applique le règlement (CE) nº 1272/2008, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l. Ces niveaux ne peuvent être dépassés que s'il est indispensable de réaliser des essais à ces niveaux de concentration pour des raisons règlementaires ou scientifiques (voir le paragraphe 37 de la méthode B.2).

2. Si l'on manque d'informations sur la toxicité de la substance d'essai, une étude préliminaire peut être réalisée, au cours de laquelle des groupes d'au maximum 3 animaux par sexe sont exposés à des concentrations cibles sélectionnées par le directeur de l'étude, en général sur une durée de 240 minutes.

3. Si une concentration limite est testée lors de la session d'exposition I et que l'on observe une mortalité inférieure à 50 %, il n'est pas nécessaire d'effectuer des essais supplémentaires. Si, pour des raisons règlementaires ou scientifiques, il est indispensable d'établir la relation concentration/temps/réponse pour des niveaux plus élevés que la concentration limite indiquée, l'exposition suivante est réalisée, par exemple, au double de la concentration limite (c'est-à-dire 2L dans la figure 1).

4. Si une toxicité est observée à la concentration limite, des essais supplémentaires (étude principale) sont nécessaires. Ces expositions supplémentaires sont réalisées soit à des concentrations plus faibles (dans la figure 1: sessions d'exposition II, III ou IV'), soit à des concentrations plus fortes sur des durées plus courtes (dans la figure 1, session d'exposition IV) qui sont adaptées et moins espacées.

5. L'essai (concentration initiale et concentrations supplémentaires) est réalisé avec l'animal de chaque sexe par point concentration/temps, ou avec 2 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai par point concentration/temps. Le directeur de l'étude peut choisir, dans certaines circonstances, d'utiliser 2 rats de chaque sexe par point concentration/temps, ou 4 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai par point concentration/temps (15). L'utilisation de 2 animaux par point concentration/temps réduit en général le biais et la variabilité des estimations, augmente le taux de succès de l'estimation et améliore la couverture de l'intervalle de confiance lié à ce protocole. Pour plus de détails, se reporter au document d'orientation 39 (2).

6. Idéalement, chaque session d'exposition est exécutée sur une seule journée, ce qui donne la possibilité de retarder l'exposition suivante jusqu'à ce qu'on soit raisonnablement sûr de la survie des animaux, et permet au directeur de l'étude d'ajuster la concentration cible et les durées pour la prochaine séance d'exposition. Il est recommandé de commencer chaque séance d'exposition avec le groupe qui sera exposé le plus longtemps, 240 minutes par exemple, suivi du groupe qui sera exposé 120 minutes, et ainsi de suite. Si, par exemple, les animaux du groupe exposé 240 minutes meurent après 90 minutes d'exposition ou montrent des signes importants de toxicité (par exemple, modifications considérables de la respiration, notamment difficultés respiratoires), il est inutile d'exposer un groupe pendant 120 minutes car la mortalité serait très vraisemblablement de 100 %. Le directeur de l'étude choisit alors des durées d'exposition plus courtes pour cette concentration (90, 65, 45, 33 et 25 minutes par exemple).

▼M4

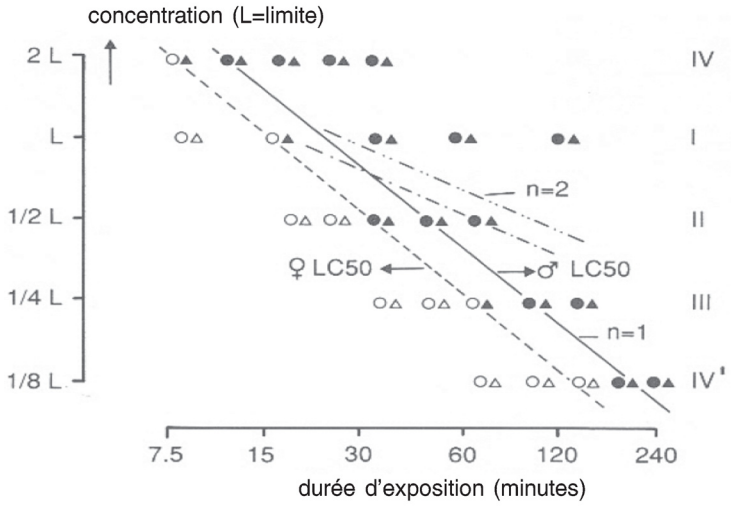
7. La concentration dans la chambre d'exposition est mesurée régulièrement pour déterminer la concentration moyenne pondérée en fonction du temps pour chaque durée d'exposition. Autant que possible, c'est l'heure de la mort de chaque animal qui est utilisée dans l'analyse statistique (et non la durée d'exposition).

8. Il convient d'examiner les résultats des quatre premières sessions d'exposition pour repérer les éventuelles données manquantes dans la courbe concentration-temps (voir figure 1). S'il manque effectivement des données, une exposition supplémentaire (5e concentration) peut être réalisée. La concentration et les durées d'exposition de cette 5e exposition sont choisies de manière à combler cette lacune.

9. Toutes les sessions d'exposition (y compris la première) seront utilisées pour calculer la relation concentration-temps-réponse au moyen d'une analyse statistique (16). On utilisera si possible, pour chaque intervalle C × t, la concentration moyenne pondérée en fonction du temps et la durée d'exposition jusqu'à la mort (si celle-ci intervient durant l'exposition).

Figure 1

Illustration hypothétique d'une relation concentration-temps-mortalité chez des rats



Symboles vides = survivants; symboles pleins = animaux morts

Triangles = femelles; cercles = mâles

Ligne pleine = valeurs de CL_{50} (de 7,5 à 240 minutes) pour les mâles, n = 1

Ligne tiretée = valeurs de CL_{50} (de 7,5 à 240 minutes) pour les femelles, n = 1

Lignes pointillées = valeurs de CL_{50} hypothétique pour les mâles et les femelles si n avait été égal à 2 (12).

Glossaire

concentration limite.

durée d'exposition.

▼M4

10. On trouvera ci-dessous un exemple de la procédure séquentielle:

Session d'exposition I – ***Essai à la concentration limite (voir figure 1)***

— 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total [a]

— Concentration cible [b] = concentration limite

— Exposer cinq groupes d'animaux à cette concentration cible pendant respectivement 15, 30, 60, 120 et 240 minutes.

↓

Session d'exposition II [c] **–** ***Étude principale***

— 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.

— Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus faible [d] (1/2L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur √2, voir figure 1).

↓

Session d'exposition III – ***Étude principale***

— 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.

— Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus faible [d] (1/4L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur √2, voir figure 1).

↓

Session d'exposition IV' – ***Étude principale***

— 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.

— Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus faible [d] (1/8L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur √2, voir figure 1).

↓ ou

---

[a] Si aucune information n'est disponible sur la sensibilité de chaque sexe à la substance d'essai, des rats des deux sexes seront utilisés, soit 1 animal de chaque sexe par concentration. À partir d'informations existantes ou s'il apparaît au cours de cette session d'exposition qu'un des sexes est plus sensible, 10 animaux de ce sexe seront utilisés (2 animaux par point concentration/temps) à chaque niveau de concentration pour les essais suivants.

[b] Lorsqu'on applique le règlement (CE) nº 1272/2008, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l. Si l'on s'attend à une toxicité ou en raison des résultats de l'étude préliminaire, on choisit des concentrations de départ plus faibles. Pour des besoins règlementaires ou scientifiques, des concentrations plus fortes peuvent être utilisées.

[c] Idéalement, l'exposition des animaux au niveau de concentration suivant est retardée jusqu'à ce qu'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Le directeur de l'étude peut alors ajuster la concentration cible et les durées pour la session d'exposition suivante.

[d] La dose minimale (concentration × temps) qui provoque la mortalité au cours de l'essai à la concentration initiale (première session d'exposition) servira de guide pour déterminer la prochaine combinaison de concentrations et de durées d'exposition. Généralement, la concentration diminuera de moitié (1/2L) et les animaux seront exposés sur une échelle de temps plus courte, les périodes d'exposition étant réparties selon une progression géométrique de facteur 1,4 (√2, voir référence 11) centrée sur le temps correspondant au niveau de la dose létale minimale (temps × concentration) observé lors de la première exposition. Dans la figure 1, la mortalité au cours de la Session d'exposition I a d'abord été observée au bout de 15 minutes; les durées de la Session II ont donc été centrées autour de 30 minutes et sont de 15, 21, 30, 42 et 60 minutes. Après les deux premières expositions, il est fortement recommandé de tracer les résultats dans un graphique similaire, comme indiqué ci-dessus, et de vérifier si la relation entre la concentration et le temps définit un angle de 45 degrés (n = 1) ou si la pente de la relation concentration-temps-réponse est moins forte (n = 2 par exemple) ou plus forte (n = 0,8 par exemple). Dans ces derniers cas, il est fortement recommandé d'adapter en conséquence les concentrations et les durées suivantes.

▼M4

Session d'exposition IV – *Étude principale*

— 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.

— Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus forte (e) (2L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur √2; voir figure 1).

Traitement mathématique des résultats pour le protocole C × t

11. Une procédure C × t constituée de 4 ou 5 concentrations d'exposition et de 5 durées d'exposition génère respectivement 20 ou 25 points de données. Avec ces points de données, la relation C × t peut être calculée à l'aide d'une analyse statistique (16):

Équation 1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t$$

où C = concentration; t = durée d'exposition, ou

Équation 2:

$$Response = f(C^n t)$$

où $n = b_1/b_2$.

Avec l'équation 1, la valeur de la CL_{50} peut être calculée pour une période de temps donnée (par exemple, 4 heures, 1 heure, 30 minutes ou n'importe quelle période de temps comprise dans la plage des périodes de temps testées) avec P = 5 (50 % de réponse). À noter que la règle de Haber ne s'applique que lorsque n = 1. La CL_{01} est calculée avec P = 2,67.

(e) Dans certains cas, il peut être nécessaire d'augmenter la concentration (2L) sur une échelle de temps plus courte, les périodes d'exposition étant réparties selon une progression géométrique de facteur 1,4 (√2) centrée sur le temps correspondant au niveau de dose létale minimale observé lors de la première exposition. La durée minimale d'exposition est de préférence supérieure à 5 minutes et la durée maximale d'exposition ne dépasse pas 8 heures.

▼B

B.3. **TOXICITÉ AIGUË (CUTANÉE)**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des doses croissantes de la substance à tester sont appliquées sur la peau à plusieurs lots d'animaux d'expérience, une seule dose étant utilisée par lot. On observe ensuite les effets et la mortalité. Les animaux qui meurent pendant l'essai sont autopsiés ainsi que ceux qui survivent à la fin de l'expérience.

Si des animaux montrent des signes de détresse et de douleur intenses et durables, il peut être nécessaire de les euthanasier; il n'y a pas lieu d'effectuer l'essai lorsque l'on sait que l'administration de la substance à étudier entraîne une détresse ou des douleurs intenses du fait de ses propriétés corrosives ou irritantes.

1.5. CRITÈRE DE QUALITÉ

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. **Préparation**

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au minimum pendant les 5 jours qui la précèdent. Avant l'expérience, des animaux adultes jeunes et sains sont distribués selon les règles du hasard dans les différents lots d'expérience. Vingt-quatre heures environ avant l'épreuve, on tond ou l'on rase les poils de la région dorsale du tronc des animaux en évitant toute lésion de la peau susceptible de modifier sa perméabilité. La surface à préparer pour l'application de la substance ne doit pas être inférieure à 10 % de la surface corporelle. Lorsque le test concerne des substances solides qui, le cas échéant, peuvent être pulvérisées, la substance à tester doit être suffisamment humectée au moyen d'eau ou, au besoin, d'un véhicule approprié, de manière à assurer un bon contact avec la peau. Si l'on utilise un véhicule, son influence sur la pénétration de la substance dans la peau doit être prise en considération. Les substances liquides sont généralement appliquées non diluées.

1.6.2. **Conditions de l'essai**

1.6.2.1. *Animaux d'expérience*

On peut utiliser des rats ou des lapins adultes. On peut également utiliser d'autres espèces, mais il faut dans ce cas en justifier l'utilisation. Il faut utiliser des souches courantes d'animaux de laboratoire. Pour chaque sexe, au début de l'essai, l'intervalle de variation du poids des animaux utilisés ne doit pas excéder ± 20 % de la valeur moyenne requise.

▼B

1.6.2.2. *Nombre et sexe*

Cinq animaux au moins sont utilisés pour chaque dose. Ils doivent être de même sexe. Si l'on utilise des femelles, elles doivent être nullipares et non gravides. Si l'on dispose d'informations qui montrent qu'un sexe est nettement plus sensible, les essais seront pratiqués sur des animaux de ce sexe.

Note: Il faut essayer d'utiliser un nombre plus restreint d'animaux lorsque les tests de toxicité aiguë sont effectués sur des animaux appartenant à un ordre plus élevé que celui des rongeurs. Les doses doivent être soigneusement choisies, en s'efforçant au maximum de ne pas dépasser des doses modérément toxiques. Il faut éviter dans ce type d'essais d'administrer des doses létales de la substance à tester.

1.6.2.3. *Doses*

Les doses doivent être en nombre suffisant, au moins trois, et espacées de manière à produire des lots présentant une gamme d'effets toxiques et de taux de mortalité. Tout effet irritant ou corrosif doit être pris en considération lors du choix des doses. Les données doivent être suffisantes pour permettre de tracer une courbe doses/réponses et, si possible, permettre une détermination acceptable de la DL_{50}.

1.6.2.4. *Essai de limite*

Un essai de limite peut être effectué en administrant une dose au moins égale à 2 000 mg/kg de poids corporel à un lot de 5 mâles et 5 femelles, en suivant le mode opératoire décrit ci-après. Si l'on observe une mortalité due à la substance, il peut être nécessaire de réaliser une étude complète.

1.6.2.5. *Période d'observation*

La période d'observation doit s'étendre au moins sur 14 jours. Cependant, sa durée ne doit pas être limitée de façon rigide. Elle doit être déterminée en fonction des réactions de toxicité, de leur vitesse d'apparition et de la durée de la période de récupération; elle peut donc être prolongée en cas de besoin. Le moment où les signes de toxicité apparaissent et disparaissent, leur durée ainsi que le moment de la mort sont importants, surtout en cas de tendance à une mortalité retardée.

1.6.3. **Mode opératoire**

Les animaux doivent être placés dans des cages individuelles. La substance d'essai doit être appliquée uniformément sur une surface à peu près égale à 10 % de la surface totale du corps. Dans le cas de substances hautement toxiques, la surface traitée peut être moindre, mais la substance d'essai doit être appliquée de manière à former un film aussi mince et uniforme que possible.

Les substances d'essai doivent être maintenues en contact avec la peau au moyen d'un pansement de gaze poreux et d'un sparadrap non irritant pendant une période de 24 heures. La partie traitée doit, en outre, être convenablement couverte, de manière à maintenir en place le pansement de gaze et la substance d'essai et à éviter que les animaux puissent ingérer cette dernière. On peut utiliser des appareils de contention pour empêcher les animaux d'ingérer la substance d'essai mais une immobilisation complète n'est pas recommandée.

▼B

À la fin de la période d'application, la substance d'essai résiduelle doit être éliminée, si possible, avec de l'eau, ou au moyen d'un autre procédé de nettoyage de la peau.

Les observations doivent être consignées systématiquement au fur et à mesure qu'elles sont effectuées, en établissant une fiche individuelle pour chaque animal. Les animaux doivent être observés fréquemment le premier jour. Un examen clinique attentif doit être pratiqué au moins une fois par jour ouvrable, d'autres observations doivent être faites quotidiennement, en prenant des mesures de façon à réduire le nombre d'animaux perdus pour l'étude, par exemple autopsie ou conservation au froid des animaux trouvés morts, ainsi qu'en isolant et sacrifiant les animaux faibles ou moribonds.

Les observations doivent concerner les modifications des poils, de la peau traitée, des yeux, des muqueuses ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire ainsi que des systèmes nerveux autonome et central, et enfin de l'activité somato-motrice et du comportement. Une attention particulière sera apportée aux tremblements, convulsions, salivation, diarrhées, léthargie, sommeil et coma. Le moment de la mort doit être enregistré avec autant de précision que possible. Les animaux qui meurent pendant l'expérience et ceux qui survivent à la fin de l'expérience sont autopsiés. Toutes les modifications pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Si nécessaire, des tissus doivent être prélevés pour un examen histopathologique.

Estimation de la toxicité pour l'autre sexe

Après avoir mené à terme l'étude portant sur des animaux appartenant à un sexe, la substance est administrée au moins à un lot de 5 animaux de l'autre sexe, afin de déterminer si les animaux de ce sexe ne sont pas nettement plus sensibles à la substance à tester. L'utilisation d'un plus petit nombre d'animaux peut être justifiée dans des circonstances particulières. Si l'on dispose d'informations appropriées qui montrent que les animaux du sexe testé sont considérablement plus sensibles, on peut se dispenser d'effectuer des essais sur les animaux de l'autre sexe.

2. **DONNÉES**

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le moment de la mort de chaque animal, le nombre d'animaux présentant d'autres signes d'intoxication, la description des effets toxiques et les résultats de l'autopsie. Le poids de chaque animal doit être déterminé et noté peu de temps avant l'application de la substance d'essai, puis une fois par semaine et au moment de la mort; les modifications du poids doivent être calculées et enregistrées lorsque la survie dépasse une journée. Les animaux qui sont euthanasiés à cause des souffrances et de l'inconfort dus à la substance sont enregistrés comme s'ils étaient morts du fait du composé étudié. La DL_{50} doit être déterminée par application d'une méthode reconnue.

L'évaluation des données doit inclure une évaluation de la relation, si elle existe, entre l'exposition des animaux à la substance à tester et l'apparition ainsi que la sévérité de toutes les anomalies, y compris les anomalies de comportement et les anomalies cliniques, les lésions macroscopiques, les modifications de poids corporel, la mortalité et tout autre effet toxique éventuel.

3. **RÉSULTATS**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

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

▼B

— espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.,

— conditions expérimentales (y compris le procédé de nettoyage de la peau et le type de pansement: occlusif ou non),

— doses (avec indication du véhicule le cas échéant, et des concentrations),

— sexe des animaux sur lesquels l'essai a été réalisé,

— tableau de données de réponses par sexe et par dose (à savoir nombre d'animaux morts ou sacrifiés au cours de l'essai, nombre d'animaux présentant des symptômes d'intoxication, nombre d'animaux exposés),

— moment de la mort après administration, raisons et critères justifiant l'euthanasie des animaux,

— toutes les observations,

— valeur de la DL_{50} pour le sexe soumis à une étude complète, déterminée à 14 jours (en précisant la méthode de calcul),

— intervalle de confiance de 95 % pour la DL_{50}, lorsque le calcul est possible,

— courbe dose/mortalité et pente de cette courbe (lorsque la méthode de calcul le permet),

— résultats d'autopsie,

— toutes les constatations histopathologiques,

— résultats de tout essai réalisé sur l'autre sexe,

— discussion des résultats (en tenant compte, en particulier, de l'effet que peuvent avoir sur la valeur de la DL_{50} calculée les animaux euthanasiés au cours de l'essai),

— interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B (point D).

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B (point E).

▼B

B.4. **TOXICITÉ AIGUË: IRRITATION/CORROSION CUTANÉE**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode est équivalente à la ligne directrice TG 404 (2002) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La mise à jour de cette méthode a porté plus particulièrement sur les possibilités d'améliorer le traitement des animaux de laboratoire et sur l'évaluation de toutes les informations existantes se rapportant aux substances d'essai en vue d'éviter les tests inutiles sur animaux. La présente méthode recommande d'analyser la valeur probante des résultats pertinents déjà disponibles avant de procéder à l'essai in vivo de corrosion/irritation décrit ci-après. Les données manquantes pourront être comblées par des essais séquentiels (1). La démarche expérimentale, décrite en annexe, inclut la réalisation d'essais in vitro validés et acceptés. Il est également recommandé d'opter, le cas échéant, pour une application successive plutôt que simultanée des trois timbres sur l'animal dans l'essai in vivo initial.

Pour assurer à la fois la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, on ne procédera pas aux essais in vivo tant que la valeur probante de toutes les données relatives au caractère éventuellement corrosif ou irritant pour la peau de la substance n'aura pas été analysée. Ces données comprendront les résultats d'études menées sur des humains et/ou des animaux, des données relatives à l'effet corrosif ou irritant d'une ou plusieurs substances structurellement proches de la substance d'essai ou de mélanges de ces substances, des données démontrant la forte acidité ou alcalinité de la substance (2) (3), et des résultats d'essais in vitro ou ex vivo validés et acceptés (4) (5) (5a). Cette analyse devrait réduire la nécessité de tester in vivo l'effet corrosif ou irritant sur la peau des substances pour lesquelles des études antérieures ont déjà livré suffisamment d'informations quant à ces deux aspects.

La démarche expérimentale préconisée, de type séquentiel, comporte des essais de corrosion et d'irritation *in vitro* ou ex vivo validés et acceptés, et est décrite dans l'annexe de la présente méthode. Cette démarche, élaborée au cours d'un atelier de l'OCDE (6) et recommandée à l'unanimité par les participants à cet atelier, a été adoptée à titre de recommandation dans le cadre du Globally Harmonized System for the Classification of Chemical Substances (GHS) (système de classification des substances chimiques harmonisé à l'échelon mondial) (7). Bien que cette stratégie séquentielle ne fasse pas partie intégrante de la méthode d'essai B.4, elle constitue cependant la procédure recommandée avant d'entreprendre les essais in vivo. S'agissant de nouvelles substances, on préconise de suivre une démarche expérimentale par étapes pour obtenir des résultats scientifiques fiables sur l'effet corrosif ou irritant de la substance. En ce qui concerne les substances existantes dont les données sur l'effet corrosif ou irritant sont insuffisantes, on suppléera à ces dernières en appliquant cette stratégie. Le choix d'une autre démarche expérimentale ou la décision de ne pas procéder par étapes doivent être justifiés.

Si l'analyse de la valeur probante des résultats ne permet pas de déterminer l'effet corrosif ou irritant, on envisagera un essai in vivo compatible avec la démarche séquentielle (voir annexe).

▼B

1.2. DÉFINITIONS

L'irritation cutanée désigne l'apparition de lésions cutanées réversibles consécutives à l'application d'une substance d'essai durant une période de quatre heures au maximum.

La corrosion cutanée désigne la survenue de lésions cutanées irréversibles, et plus précisément d'une nécrose visible à travers l'épiderme et dans le derme, à la suite de l'application d'une substance d'essai durant une période de quatre heures au maximum. La corrosion cutanée se manifeste par des ulcères, des saignements, des croûtes saignantes et, au terme de la période d'observation de 14 jours, par une décoloration due au pâlissement de la peau, des zones d'alopécie totale et des escarres. Un examen histopathologique sera envisagé en cas de lésions douteuses.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Une seule dose de la substance d'essai est appliquée sur la peau de l'animal choisi pour l'expérience, les zones non traitées de la peau de l'animal servant de témoin. L'expérimentateur observe et note selon une échelle de valeurs le degré d'irritation ou de corrosion à intervalles déterminés, et le décrit de façon plus détaillée afin de fournir une évaluation complète des effets. La durée de l'étude doit être suffisante pour permettre d'évaluer la réversibilité des effets observés.

Les animaux qui manifestent des signes persistants de détresse et/ou de douleur aiguës à n'importe quel stade de l'essai doivent être euthanasiés, et ces symptômes seront pris en compte dans l'évaluation de la substance. Les critères régissant la décision d'euthanasier les animaux moribonds et souffrant fortement sont définis dans un document cité en référence (8).

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Préparation de l'essai in vivo**

1.4.1.1. *Sélection de l'espèce animale*

On choisira de préférence de jeunes adultes sains parmi les lapins albinos. L'utilisation d'une autre espèce sera justifiée, le cas échéant.

1.4.1.2. *Préparation des animaux*

Environ 24 heures avant l'essai, la région dorsale du tronc des animaux sera tondue à ras. On prendra soin de ne pas égratigner leur peau et seuls des animaux présentant une peau saine et intacte seront utilisés.

La fourrure de certaines souches de lapins est plus touffue par endroits et ce phénomène est plus marqué à certaines périodes de l'année. Ces plages à forte pilosité ne doivent pas recevoir la substance d'essai.

1.4.1.3. *Conditions d'hébergement et d'alimentation*

Les animaux sont placés dans des cages individuelles. La température du local expérimental est réglée à 20 ºC (± 3 ºC) pour les lapins. L'humidité relative doit atteindre au moins 30 % et rester de préférence inférieure à 70 %, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. On appliquera un éclairage artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les lapins seront nourris avec un mélange classique pour animaux de laboratoire et boiront de l'eau potable à volonté.

▼B

1.4.2. **Mode opératoire**

1.4.2.1. *Application de la substance d'essai*

La substance d'essai est appliquée sur une petite zone (environ 6 cm^2) de la peau et recouverte par une compresse de gaze, maintenue en place à l'aide d'un sparadrap non irritant. Si l'application directe est impossible (dans le cas de liquides ou de certaines pâtes, par exemple), la substance d'essai est d'abord appliquée sur la compresse de gaze, laquelle est ensuite placée sur la peau. La compresse doit être maintenue en contact souple avec la peau à l'aide d'un pansement semi-occlusif durant la période d'exposition. Si la substance d'essai est déposée sur la compresse, celle-ci doit être fixée sur la peau de façon que la substance y soit répartie uniformément et entre bien en contact avec celle-ci. On fera en sorte que l'animal n'ait pas accès à la compresse et ne puisse ingérer ou inhaler la substance d'essai.

Les substances liquides sont généralement testées à l'état non dilué. Si la substance d'essai est solide (elle peut être pulvérisée si nécessaire), il y a lieu de l'humidifier avec la plus petite quantité d'eau (ou au besoin avec un autre véhicule approprié) nécessaire à assurer un bon contact avec la peau. Lorsqu'on utilise un véhicule autre que l'eau, l'influence éventuelle du véhicule sur l'irritation de la peau par la substance d'essai doit être minimale.

À la fin de la période d'exposition, qui dure normalement 4 heures, on enlève ce qui peut l'être de la substance d'essai restante, avec de l'eau ou un solvant approprié sans interférer avec la réaction ni altérer l'intégrité de l'épiderme.

1.4.2.2. *Dose*

Une dose de 0,5 ml de liquide ou de 0,5 g de solide ou de pâte est appliquée sur la plage à tester.

1.4.2.3. *Essai initial (essai d'irritation/corrosion cutanée in vivo sur un seul animal)*

Il est fortement recommandé de commencer par pratiquer l'essai in vivo sur un seul animal, surtout lorsqu'on pense que la substance risque d'être corrosive. Cette précaution obéit à la démarche expérimentale séquentielle (voir annexe 1).

Dès lors qu'une substance est jugée corrosive d'après l'analyse de la valeur probante des résultats, tout essai sur animal s'avère superflu. Pour la plupart des substances risquant d'être corrosives, il n'est généralement pas nécessaire de procéder à un essai in vivo. Toutefois, si l'on estime que les données disponibles ne sont pas assez convaincantes, on peut réaliser un essai limité sur un animal en suivant la procédure décrite ci-après. Jusqu'à trois timbres d'essai sont appliqués successivement sur l'animal. Le premier timbre est enlevé après trois minutes. Si aucune réaction cutanée grave n'est constatée, un deuxième timbre est appliqué et retiré après une heure. Si les observations effectuées à ce stade indiquent que l'exposition peut être étendue à quatre heures sans que cela fasse trop souffrir l'animal, l'expérimentateur appliquera un troisième timbre durant quatre heures et attribuera une cote à la réaction.

Si un effet corrosif est détecté à l'issue d'une des trois expositions séquentielles, l'essai s'achève immédiatement. Si aucun effet corrosif n'est relevé après l'enlèvement du troisième timbre, l'animal est gardé en observation durant 14 jours, à moins qu'un effet corrosif se déclare avant.

▼B

Dans les cas où l'on s'attend à ce que la substance d'essai soit peut-être irritante, mais pas corrosive, un seul timbre sera appliqué sur un animal durant quatre heures.

1.4.2.4. *Essai confirmatoire (essai d'irritation cutanée in vivo sur des animaux supplémentaires)*

Si l'essai initial ne révèle aucun effet corrosif, il convient de confirmer la réaction irritante ou négative sur deux animaux supplémentaires, traités chacun avec un timbre maintenu durant quatre heures. Si l'essai initial produit un effet irritant, l'essai confirmatoire peut être conduit en mode séquentiel ou par l'exposition simultanée de deux animaux supplémentaires. Au cas exceptionnel où l'essai initial ne serait pas pratiqué, deux ou trois animaux peuvent être traités au moyen d'un seul timbre appliqué durant quatre heures. Si l'on utilise deux animaux et qu'ils expriment la même réaction, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai. Dans le cas contraire, le troisième animal est également testé. L'utilisation d'animaux supplémentaires pourra être requise si les réactions sont équivoques.

1.4.2.5. *Période d'observation*

La durée de la période d'observation devrait être suffisante pour permettre d'évaluer complètement la réversibilité des effets observés. Il faudra cependant mettre fin à l'expérience dès que l'animal montre des signes persistants de douleur ou de détresse aiguës. La réversibilité des effets est déterminée par l'observation des animaux sur une période s'étendant jusqu'à 14 jours après l'enlèvement des timbres. Si la réaction s'avère réversible avant le quatorzième jour, l'expérience s'achève à ce moment-là.

1.4.2.6. *Observations cliniques et cotation des réactions cutanées*

L'observation des signes d'érythème et d'œdème chez tous les animaux et la cotation des réactions s'effectuent au bout de 60 minutes et ensuite 24, 48 et 72 heures après l'enlèvement du timbre. S'agissant de l'animal du test initial, la plage soumise à l'épreuve est aussi examinée immédiatement après l'enlèvement du timbre. Les réactions cutanées sont cotées et consignées conformément à l'échelle figurant dans le tableau ci-après. Si la peau présente des lésions qui ne caractérisent pas une irritation ou une corrosion après 72 heures, il pourra être nécessaire d'observer l'animal jusqu'au quatorzième jour afin de déterminer la réversibilité des effets. En plus de l'observation de l'irritation, tous les effets toxiques locaux, tels qu'un dessèchement de la peau, et tout effet systémique nocif (par exemple des effets se manifestant par des signes cliniques de toxicité et sur le poids corporel) doivent être relevés et décrits en détail. L'examen histopathologiques est à envisager en cas de réactions équivoques.

La cotation des réactions cutanées est forcément subjective. L'harmonisation de la cotation des réactions cutanées et l'appui aux laboratoires d'essai ainsi qu'au personnel chargé d'effectuer et d'interpréter les observations passent par une formation adéquate des expérimentateurs au système de cotation utilisé (voir tableau ci-après). Un manuel illustré sur la cotation de l'irritation cutanée et d'autres lésions pourrait être utile (9). La cotation des réactions cutanées devrait faire l'objet d'une évaluation à l'aveugle.

2. **RÉSULTATS**

2.1. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

Les résultats de l'étude devraient être récapitulés dans un tableau joint au rapport d'essai final et couvrir tous les aspects énumérés au paragraphe 3.1.

▼B

2.2. ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Le degré d'irritation cutanée devrait être évalué en considération de la gravité des lésions et de leur caractère réversible ou non. Les cotes individuelles ne fournissent pas une valeur absolue des propriétés irritantes d'une substance, celles-ci étant évaluées parallèlement à d'autres effets de la substance. Ces cotes individuelles doivent plutôt être considérées comme des valeurs de référence, à évaluer en association avec toutes les autres observations effectuées au cours de l'étude.

L'évaluation des réactions d'irritation doit tenir compte de la réversibilité des lésions cutanées. Si des réactions, telles qu'une alopécie (sur une aire limitée), une hyperkératose, une hyperplasie et une desquamation, persistent jusqu'à la fin de la période d'observation de 14 jours, il y a lieu de considérer la substance d'essai comme irritante.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Justification de l'essai in vivo: analyse de la valeur probante des résultats disponibles avant l'essai, notamment des résultats de la démarche expérimentale séquentielle:

— description des données pertinentes livrées par des essais précédents,

— données obtenues à chaque étape de la démarche expérimentale,

— description des essais in vitro effectués, exposant le détail des procédures et les résultats obtenus avec les substances d'essai et de référence,

— justification de l'étude in vivo après analyse de la valeur probante des résultats disponibles.

Substance d'essai:

— données d'identification (par exemple, numéro CAS, source, pureté, impuretés connues, numéro de lot),

— état physique et propriétés physico-chimiques (par exemple, pH, volatilité, solubilité, stabilité),

— s'il s'agit d'un mélange: composition et pourcentages relatifs des constituants.

Véhicule:

— identification, concentration (s'il y a lieu), volume utilisé,

— justification du choix du véhicule.

Animaux d'expérience:

— espèce/souche utilisée, justification de l'utilisation éventuelle d'un animal autre que le lapin albinos,

— nombre d'animaux de chaque sexe,

— poids de chaque animal au début et à la fin de l'essai,

— âge des animaux au début de l'essai,

— source des animaux, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

▼B

Conditions expérimentales:

— technique de préparation du site d'application,

— détails concernant la composition du timbre et la technique d'application de ce dernier,

— détails sur la préparation, l'application et l'enlèvement de la substance d'essai.

Résultats:

— tableau faisant apparaître, pour chaque animal et à chaque relevé, les cotes attribuées aux réactions d'irritation/corrosion observées,

— description de toutes les lésions observées,

— description circonstanciée de la nature et du degré d'irritation ou de corrosion observé, et de tout effet histopathologique,

— description de tout autre effet local néfaste (par exemple dessèchement de la peau) et des effets systémiques.

Discussion des résultats

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, p. 410-429.

(2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. In *Vitro,* 2, p. 19-26.

(3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, p. 709-720.

(4) ECETOC (1990) Monograph No 15, «Skin Irritation», European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, p. 483-524.

(5a) Méthode d'essai B.40. Corrosion cutanée.

(6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (http://wwwl.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://wwwl.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

▼B

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No 19 (http://wwwl.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

[peut être obtenu sur demande auprès du secrétariat de l'OCDE].

▼B

Tableau I

COTATION DES RÉACTIONS CUTANÉES

Formation d'érythème et d'escarres

Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarres empêchant la cotation de l'érythème	4

Maximum possible: 4

Formation d'œdème

Pas d'œdème	0
Œdème très léger (à peine perceptible)	1
Œdème léger (pourtour de la zone œdémateuse bien délimité par une enflure nette)	2
Œdème modéré (enflure d'environ 1 mm)	3
Œdème grave (enflure de plus de 1 mm s'étendant au-delà de l'aire exposée)	4

Maximum possible: 4

Un examen histopathologique pourra être réalisé en cas de réaction équivoque.

▼B

ANNEXE

Démarche expérimentale séquentielle pour les essais d'irritation et de corrosion cutanées

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

Pour concilier la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, il importe d'éviter l'utilisation inutile d'animaux d'expérience et de réduire au minimum toute procédure expérimentale susceptible de déclencher des effets graves chez les animaux. Avant d'envisager un essai in vivo, on évaluera toutes les informations relatives à l'éventuel pouvoir corrosif/irritant d'une substance sur la peau. Il se peut que les données disponibles suffisent à classer une substance d'essai quant à son pouvoir irritant ou corrosif, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer des essais sur animaux. Ainsi, le recours à une analyse de la valeur probante des résultats et l'adoption d'une démarche expérimentale séquentielle limiteront au maximum la nécessité de pratiquer des essais in vivo, surtout lorsqu'il est probable que la substance va engendrer de graves effets.

Il est recommandé d'évaluer les informations existantes concernant le pouvoir irritant ou corrosif des substances à l'aide d'une analyse de la valeur probante des résultats, afin d'établir la nécessité de réaliser des études supplémentaires, autres que des études cutanées in vivo, pour contribuer à caractériser ce pouvoir. Si cette nécessité se confirme, une démarche expérimentale séquentielle est préconisée pour produire les données expérimentales pertinentes. S'agissant des substances qui n'ont pas encore fait l'objet d'essais, il convient d'obtenir l'ensemble des données permettant d'évaluer le pouvoir corrosif ou irritant de la substance par une démarche séquentielle. La démarche expérimentale exposée dans cette annexe a été élaborée au cours d'un atelier de l'OCDE (1) avant d'être entérinée et complétée dans le cadre du système harmonisé de classification intégrée des risques pour la santé humaine et l'environnement liés aux substances chimiques (Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances), adopté par la vingt-huitième réunion conjointe du comité sur les produits chimiques et du groupe de travail sur les produits chimiques, les pesticides et la biotechnologie, en novembre 1998 (2).

Si cette démarche expérimentale séquentielle ne fait pas partie intégrante de la méthode d'essai B.4, elle constitue cependant la procédure recommandée pour déterminer l'effet irritant ou corrosif sur la peau. Cette procédure représente à la fois la meilleure pratique et une référence éthique dans ce domaine. La méthode d'essai décrit le mode opératoire de l'essai in vivo et récapitule les facteurs à prendre en considération avant d'entamer l'essai. La démarche indique comment évaluer les données existantes relatives aux propriétés irritantes ou corrosives des substances et présente les différentes étapes permettant d'obtenir des données pertinentes sur les substances qui réclament d'autres études ou qui n'ont pas encore été étudiées. Elle recommande également, dans certaines circonstances, la réalisation d'essais in vitro ou ex vivo d'irritation et de corrosion cutanées, validés et acceptés.

DESCRIPTION DE LA STRATÉGIE D'ÉVALUATION ET D'ESSAI

Avant d'entreprendre les essais inscrits dans la démarche expérimentale séquentielle (figure), il faut évaluer toutes les informations disponibles afin d'établir la nécessité d'effectuer des essais cutanés in vivo. Bien que l'évaluation de certains paramètres particuliers puisse livrer des informations significatives (par exemple un pH extrême), la totalité des informations existantes doit être prise en considération. L'analyse de la valeur probante des résultats portera sur toutes les données pertinentes concernant les effets de la substance en question, ou de ses analogues; elle débouchera sur une décision qui devra être justifiée. Il conviendra d'accorder une place prépondérante aux données se rapportant aux humains et aux animaux, et d'examiner ensuite les résultats des essais in vitro ou ex vivo sur la substance. Les essais in vivo de substances corrosives devront être évités chaque fois que cela est possible. Les facteurs pris en compte dans la démarche expérimentale sont repris ci-après:

▼B

Évaluation des données existantes sur les humains et les animaux (étape 1). Les données existantes sur l'être humain, par exemple des études cliniques ou sur les conditions de travail et des rapports sur des cas relevant de ces disciplines, et/ou les résultats d'essais sur animaux, par exemple des essais de toxicité par exposition cutanée unique ou répétée, sont à examiner en premier, car ils livrent des informations directement liées aux effets sur la peau. Les substances dont le pouvoir irritant ou corrosif est avéré et celles dont le caractère non corrosif et non irritant a été clairement démontré ne doivent pas faire l'objet d'études in vivo.

Analyse des relations structure-activité (RSA) (étape 2). Le cas échéant, les résultats d'essais sur des substances structurellement proches doivent être pris en considération. S'il existe suffisamment de données relatives aux humains et/ou aux animaux sur des substances structurellement proches ou sur des mélanges de ces substances pour attester leur pouvoir corrosif ou irritant, on peut supposer que la substance étudiée provoquera les mêmes réactions. Auquel cas, il n'est plus forcément nécessaire de tester la substance. Des résultats négatifs lors d'études de substances structurellement proches ou de mélanges de ces substances ne constituent pas une preuve suffisante de l'effet non corrosif ou non irritant d'une substance dans le cadre de la démarche expérimentale séquentielle. On déterminera le pouvoir corrosif ou irritant pour la peau en appliquant une méthode d'analyse RSA validée et acceptée.

Propriétés physico-chimiques et réactivité chimique (étape 3). Les substances présentant des valeurs de pH extrêmes, par exemple < 2,0 ou > 11,5, sont susceptibles d'induire de fortes réactions locales. Si une valeur de pH extrême est un indice décisif quant au caractère corrosif d'une substance, son pouvoir tampon doit également entrer en ligne de compte (3) (4). Si le pouvoir tampon donne à penser que la substance peut ne pas être corrosive pour la peau, cette hypothèse demande à être confirmée par un autre essai, de préférence un essai in vitro ou ex vivo validé et accepté (voir étapes 5 et 6).

Toxicité cutanée (étape 4). S'il est prouvé qu'une substance chimique est très toxique par voie cutanée, une étude d'irritation ou de corrosion cutanée risque d'être impossible à réaliser in vivo, la quantité de substance d'essai normalement appliquée pouvant dépasser la dose très toxique et entraîner ainsi la mort des animaux ou les faire terriblement souffrir. En outre, lorsque des études de toxicité cutanée ont déjà été menées sur des lapins albinos jusqu'à la dose limite de 2 000 mg/kg de poids corporel, ou au-delà, et qu'aucune irritation ou corrosion cutanées n'ont été constatées, il n'est plus forcément nécessaire d'effectuer un essai supplémentaire d'irritation ou de corrosion cutanée. Il convient de faire attention à plusieurs aspects lorsqu'on évalue la toxicité cutanée aiguë à partir d'études antérieures. À titre d'exemple, les informations rapportées sur les lésions cutanées peuvent être incomplètes. Il se peut que les essais et les observations aient été effectués sur une autre espèce que le lapin, or, la sensibilité aux substances est très variable d'une espèce à l'autre. De même, la forme sous laquelle la substance d'essai a été appliquée sur les animaux peut ne pas convenir à l'évaluation de l'irritation et de la corrosion cutanées [par exemple la dilution des substances (5)]. Néanmoins, lorsque des études bien conçues de toxicité cutanée ont été correctement menées sur le lapin, leurs résultats négatifs peuvent être considérés comme une démonstration suffisante du caractère non irritant ni corrosif de la substance.

Résultats des essais in vitro ou ex vivo (étapes 5 et 6). Les substances dont le pouvoir fortement irritant ou corrosif a été mis en évidence par un essai in vitro ou ex vivo validé et accepté (6) (7), conçu pour évaluer ces effets particuliers, ne doivent pas être testées sur des animaux. Il est en effet très vraisemblable que ces substances produiront des effets semblables in vivo.

▼B

Essai in vivo sur des lapins (étapes 7 et 8). Si la décision d'effectuer une étude in vivo a été prise sur la base d'une analyse de la valeur des résultats, celle-ci doit débuter par un essai initial réalisé sur un seul animal. Si les résultats de cet essai indiquent que la substance est corrosive pour la peau, il ne faut pas poursuivre les essais. Si l'essai initial ne montre aucun effet corrosif, il y a lieu de confirmer l'absence de réaction ou une réaction d'irritation sur un ou deux animaux supplémentaires exposés à la substance durant quatre heures. Lorsque l'essai initial fait apparaître un effet irritant, l'essai confirmatoire doit être conduit sur un mode séquentiel, ou par l'exposition simultanée des deux animaux supplémentaires.

BIBLIOGRAPHIE

(1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (http://wwwl.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://wwwl.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdail, D.J., Liebsch, M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, p. 709-720.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxic In Vitro, 2 (1), p. 19-26.

(5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): Dermatotoxicology. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, p. 411-436.

(6) Méthode d'essai B.40.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, p. 483-524.

▼B

Figure

PROCÉDURE D'ESSAI ET D'ÉVALUATION DE L'IRRITATION ET DE LA CORROSION CUTANÉES

	Activity	Finding	Conclusion
1	Existing human and/or animal data showing effects on skin or mucous membranes	Corrosive	Apical endpoint; considered corrosive. No testing is needed.
		Irritating	Apical endpoint; considered to be an irritant. No testing is needed.
		Not corrosive/not irritating	Apical endpoint; considered not corrosive or irritating. No testing required.
	↓ *No information available, or available information is not conclusive* ↓		
2	Perform SAR evaluation for skin corrosion/irritation	Predict severe damage to skin	Considered corrosive. No testing is needed.
		Predict irritation to skin	Considered an irritant. No testing is needed.
	↓ *No predictions can be made, or predictions are not conclusive or negative* ↓		
3	Measure pH (consider buffering capacity, if relevant)	pH ≤ 2 or ≥ 11.5 (with high buffering capacity, if relevant)	Assume corrosivity. No testing is needed.
	↓ *2 < pH < 11.5, or pH ≤ 2.0 or ≥ 11.5 with low/no buffering capacity, if relevant* ↓		
4	Evaluate systemic toxicity data via dermal route (1)	Very toxic	No further testing is needed.
		Not corrosive or irritating when tested to limit dose of 2000 mg/kg body weight or higher, using rabbits	Assume not corrosive or irritating. No further testing is needed.
	↓ *Such information is not available or is non-conclusive* ↓		
5	Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin corrosion	Corrosive response	Assume corrosivity *in vivo*. No further testing is needed.
	↓ *Substance is not corrosive* ↓		
6	Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin irritation	Irritant response	Assume irritancy *in vivo*. No further testing is needed.
	↓ *Validated in vitro or ex vivo testing methods for skin irritation are not yet available or substance is not an irritant* ↓		
7	Perform initial *in vivo* rabbit test using one animal	Severe damage to skin	Considered corrosive. No further testing is needed.
	↓ *No severe damage* ↓		
8	Perform confirmatory test using one or two additional animals	Corrosive or irritating	Considered corrosive or irritating. No further testing is needed
		Not corrosive or irritating	Considered not corrosive or irritating. No further testing needed

(1) can be considered before Steps 2 and 3.

▼B

B.5. **TOXICITÉ AIGUË: IRRITATION/CORROSION OCULAIRE**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode est équivalente à la ligne directrice TG 405 (2002) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La révision de la présente méthode a porté plus particulièrement sur l'évaluation préalable de toutes les informations existantes se rapportant aux substances d'essai, afin d'éviter les essais inutiles sur les animaux de laboratoire et contribuer ainsi à préserver le bien-être animal. Cette méthode préconise d'analyser la valeur probante des résultats pertinents déjà disponibles (1) avant de procéder à l'essai in vivo de corrosion/irritation oculaire décrit ci-après. Il est conseillé de combler le manque de données par des essais séquentiels (2) (3). La démarche expérimentale décrite à l'annexe de la présente méthode inclut la réalisation d'essais in vitro validés et acceptés. Il est en outre recommandé d'effectuer un essai d'irritation/corrosion cutanée in vivo, afin de prédire le pouvoir corrosif pour les yeux avant d'envisager un essai oculaire in vivo.

Afin de concilier la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, on ne procédera pas aux essais in vivo avant d'avoir analysé la valeur probante de toutes les données relatives au caractère éventuellement corrosif ou irritant de la substance pour les yeux. Ces données comprendront les résultats d'études menées sur des humains et/ou des animaux de laboratoire, des données relatives à l'effet corrosif ou irritant d'une ou plusieurs substances structurellement proches de la substance d'essai ou de mélanges de ces substances, des données démontrant la forte acidité ou alcalinité de la substance (4) (5), et des résultats d'essais in vitro et ex vivo d'irritation et de corrosion cutanées validés et acceptés (6) (6a). Ces études pourront être effectuées avant ou après l'analyse de la valeur probante des résultats.

Pour certaines substances, une telle analyse peut faire ressortir la nécessité de mener des études in vivo afin de déterminer le pouvoir corrosif/irritant de la substance pour les yeux. Dans de tels cas, il est préférable, avant d'envisager un essai oculaire in vivo, de commencer par tester in vivo les effets cutanés de la substance et de les évaluer conformément à la méthode d'essai B.4 (7). L'analyse de la valeur probante des résultats, couplée à la stratégie d'essai séquentielle, devrait réduire la nécessité de tester in vivo l'effet corrosif ou irritant sur les yeux des substances pour lesquelles des études antérieures ont déjà livré suffisamment d'informations quant à ces deux aspects. Si le pouvoir corrosif ou irritant pour les yeux est impossible à déterminer par la démarche séquentielle, même après réalisation d'un essai in vivo d'irritation/corrosion cutanée, on peut tester in vivo l'effet corrosif ou irritant sur les yeux.

▼B

La démarche expérimentale préconisée, de type séquentiel, comporte des essais de corrosion et d'irritation in vitro ou ex vivo validés, et est décrite dans l'annexe de la présente méthode. Cette démarche, élaborée au cours d'un atelier de l'OCDE (8) et recommandée à l'unanimité par les participants à cet atelier, a été adoptée à titre de recommandation dans le cadre du système de classification des substances chimiques harmonisé à l'échelon mondial (Globally Harmonized System for the Classification of Chemical Substances — GHS) (9). Bien que cette stratégie séquentielle ne fasse pas partie intégrante de la méthode d'essai B.4, elle constitue cependant la procédure recommandée avant d'entreprendre les essais in vivo. S'agissant de nouvelles substances, cette démarche expérimentale par étapes est préconisée pour obtenir des résultats scientifiques fiables sur l'effet corrosif ou irritant de la substance. En ce qui concerne les substances existantes dont les données sur l'effet corrosif ou irritant sur la peau et les yeux sont insuffisantes, on suppléera à ces dernières en appliquant cette stratégie. Le choix d'une autre démarche expérimentale ou la décision de ne pas procéder par étapes doivent être justifiés.

1.2. DÉFINITIONS

L'irritation oculaire désigne des altérations oculaires qui surviennent à la suite de l'application d'une substance d'essai sur la surface antérieure de l'œil, et qui sont totalement réversibles dans les 21 jours suivant le traitement.

La corrosion oculaire désigne la survenue de lésions tissulaires de l'œil ou une grave détérioration de la vision, qui sont provoqués par l'application d'une substance d'essai sur la surface antérieure de l'œil, et qui ne sont pas totalement réversibles dans les 21 jours suivant le traitement.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance d'essai est appliquée en une seule dose sur l'un des yeux de l'animal d'expérience, l'œil non traité servant de témoin. On évalue le degré de l'irritation ou de la corrosion oculaires en cotant la gravité des lésions affectant la conjonctive, la cornée et l'iris, à intervalles déterminés. Les autres réactions de l'œil et les troubles systémiques sont également décrits de manière à fournir une évaluation complète des effets. La durée de l'étude doit être suffisante pour permettre d'évaluer la réversibilité des effets.

Les animaux qui manifestent des signes persistants de détresse et/ou de douleur aiguës à n'importe quel stade de l'essai doivent être euthanasiés, et ces symptômes seront pris en compte dans l'évaluation de la substance. Les critères régissant la décision d'euthanasier les animaux moribonds et souffrant fortement sont définis dans un document cité en référence (10).

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Préparation de l'essai in vivo**

1.4.1.1. *Sélection de l'espèce animale*

On choisira de préférence de jeunes adultes sains parmi les lapins albinos. L'utilisation d'une autre espèce ou souche sera justifiée, le cas échéant.

1.4.1.2. *Préparation des animaux*

Les deux yeux de chaque animal susceptible de participer à l'essai doivent être examinés dans les 24 heures précédant le début de l'essai. Les animaux qui présentent des signes d'irritation oculaire, des défauts oculaires ou une lésion de la cornée seront écartés.

▼B

1.4.1.3. *Conditions d'hébergement et d'alimentation*

Les animaux sont placés dans des cages individuelles. La température du local expérimental est réglée à 20 °C (± 3 °C) pour les lapins. L'humidité relative doit atteindre au moins 30 % et rester de préférence inférieure à 70 %, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. On appliquera un éclairage artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les lapins seront nourris avec un mélange classique pour animaux de laboratoire et boiront de l'eau potable à volonté.

1.4.2. **Mode opératoire**

1.4.2.1. *Application de la substance d'essai*

L'expérimentateur introduit la substance d'essai dans le sac conjonctival de l'un des yeux de chaque animal, après avoir délicatement écarté la paupière inférieure du globe oculaire. Il ramène ensuite doucement les deux paupières l'une contre l'autre et les maintient dans cette position pendant environ une seconde afin d'éviter toute perte de substance. L'autre œil, qui ne subit pas de traitement, sert de témoin.

1.4.2.2. *Irrigation*

Il ne faut pas laver les yeux des animaux traités pendant au moins 24 heures après l'instillation de la substance d'essai, à moins que celle-ci soit à l'état solide (voir paragraphe 1.4.2.3.2) ou déclenche immédiatement des effets corrosifs ou irritants. Au besoin, un lavage pourra être effectué à l'issue de ce délai.

L'utilisation d'un groupe d'animaux satellite pour étudier l'influence du lavage n'est pas indiquée, à moins qu'elle ne se justifie d'un point de vue scientifique. Le cas échéant, on utilisera deux lapins. Les conditions du lavage doivent être décrites minutieusement en indiquant, par exemple, le moment du lavage, la composition et la température de la solution ophtalmique, la durée, le volume et la vitesse d'application.

1.4.2.3. *Dose*

1.4.2.3.1. *Essai de liquides*

Pour les liquides, on utilise une dose de 0,1 ml. Il faut éviter d'instiller la substance directement dans l'œil avec un vaporisateur à pression; il est préférable d'en expulser d'abord le contenu, de prélever 0,1 ml de celui-ci dans une fiole et de l'instiller dans l'œil.

1.4.2.3.2. *Essai de solides*

Dans le cas des solides, pâtes ou substances particulaires, la quantité utilisée doit avoir un volume de 0,1 ml ou un poids ne dépassant pas 100 mg. La substance d'essai sera broyée finement. Il convient de mesurer le volume de la substance solide après l'avoir légèrement tassée, par exemple en tapotant le récipient de mesure. Si la substance d'essai solide n'a pas encore été évacuée de l'œil de l'animal par des mécanismes physiologiques au premier moment d'observation, à savoir une heure après le traitement, l'œil peut être rincé à l'aide d'une solution saline ou à l'eau distillée.

▼B

1.4.2.3.3. *Essai des aérosols*

Il est recommandé de prélever une dose du contenu de tous les vaporisateurs à pression et aérosols avant de l'instiller dans l'œil. La seule exception concerne les substances conditionnées en bombes aérosol sous pression, qui sont impossibles à recueillir préalablement à l'instillation car elles se vaporisent. Dans ce cas, l'expérimentateur maintient l'œil de l'animal ouvert et administre la substance à tester en un seul jet d'environ une seconde, émis à 10 cm et directement en face de l'œil. Cette distance peut être modulée en fonction de la pression du jet et de sa composition. Il faut veiller à ce que la pression du jet n'endommage pas l'œil. Dans certains cas, il pourra être nécessaire d'évaluer l'ampleur des dégâts «mécaniques» risquant d'être causés à l'œil par la force du jet.

La dose d'aérosol peut être estimée grâce à une simulation de l'application menée comme suit: la substance est projetée à travers une ouverture de la taille d'un œil de lapin placée directement devant un papier. L'augmentation de poids du papier donne une idée approximative de la quantité administrée dans l'œil du lapin. Pour une substance volatile, la dose peut être estimée à partir du poids du récipient (dans lequel elle est recueillie) avant et après utilisation.

1.4.2.4. *Essai initial (essai in vivo de l'effet irritant/corrosif sur les yeux mené sur un seul animal)*

Conformément à la démarche expérimentale séquentielle (voir annexe 1), il est fortement recommandé de commencer par pratiquer l'essai in vivo sur un seul animal.

Si les résultats de cet essai, mené selon la procédure décrite, indiquent que la substance est corrosive ou fortement irritante pour l'œil, il n'y a pas lieu de mener d'autres essais d'irritation oculaire.

1.4.2.5. *Anesthésie locale*

L'anesthésie locale se pratique cas par cas. Si l'analyse de la valeur probante des résultats montre que la substance risque de provoquer une douleur, ou si l'essai initial révèle que l'animal souffrira, un anesthésique local peut être administré avant l'instillation de la substance d'essai. Le type, la concentration et la dose d'anesthésique doivent être choisis avec soin pour éviter que son utilisation n'influe sur la réaction à la substance d'essai. L'œil témoin subira une anesthésie identique.

1.4.2.6. *Essai confirmatoire (essai d'irritation oculaire in vivo sur des animaux supplémentaires)*

Si l'essai initial ne fait apparaître aucun effet corrosif, la réaction négative ou d'irritation demande à être confirmée sur un ou deux animaux supplémentaires. Si l'essai initial provoque une forte irritation, indiquant que l'essai confirmatoire pourrait donner lieu à un effet très marqué (irréversible), on recommande de conduire l'essai confirmatoire sur un mode séquentiel en n'utilisant qu'un seul animal à la fois, plutôt que d'exposer les deux animaux simultanément. Si le deuxième animal manifeste des signes de corrosion ou d'irritation grave, l'essai s'arrête là. On pourra utiliser d'autres animaux s'il y a lieu de confirmer des réactions d'irritation faibles à modérées.

▼B

1.4.2.7. *Période d'observation*

La durée de la période d'observation doit être suffisante pour permettre d'évaluer à fond l'ampleur et la réversibilité des effets observés. Il faut cependant mettre un terme à l'expérience dès qu'un animal manifeste des signes persistants de détresse ou de douleur aiguës (9). Pour déterminer la réversibilité des effets, les animaux doivent normalement être observés durant 21 jours après l'administration de la substance d'essai. Si la réversibilité est constatée avant ce délai, l'expérience prend fin à ce moment-là.

1.4.2.7.1. *Observations cliniques et cotation de la gravité des réactions oculaires*

On examine les yeux 1, 24, 48 et 72 heures après l'application de la substance d'essai. Les animaux ne seront maintenus à l'épreuve que le temps nécessaire pour obtenir un résultat concluant. Les animaux manifestant des signes persistants de douleur ou de détresse aiguës doivent être euthanasiés rapidement, et ces symptômes sont à prendre en compte dans l'évaluation de la substance d'essai. Il faudra également euthanasier les animaux qui présentent les lésions oculaires suivantes à la suite de l'instillation: perforation de la cornée ou ulcération profonde de la cornée associée à un staphylome; présence de sang dans la chambre antérieure de l'œil; opacité cornéenne de niveau 4 persistant durant 48 heures; absence de réflexe protomoteur (réaction indienne de niveau 2) durant 72 heures; ulcération de la membrane conjonctivale; nécrose des conjonctives ou de la membrane nictitante, ou décollement du tissu nécrosé. L'euthanasie s'impose parce que ces lésions sont généralement irréversibles.

Les animaux qui ne présentent pas de lésions oculaires peuvent être écartés, mais seulement à partir du quatrième jour suivant l'instillation. Les animaux affectés de lésions légères à modérées doivent être gardés en observation jusqu'à ce que ces lésions disparaissent, ou durant 21 jours, soit jusqu'au terme de l'étude. L'expérimentateur déterminera la nature et la gravité des lésions ainsi que leur réversibilité en observant les animaux aux septième, quatorzième et vingt et unième jours.

L'intensité des réactions oculaires (conjonctives, cornée et iris) doit être consignée à chaque examen (tableau I). Toute autre lésion oculaire (par exemple un pannus, une coloration) et les troubles systémiques doivent également être signalés.

Pour examiner les réactions, on peut s'aider d'une loupe binoculaire, d'une lampe à fente portative, d'un biomicroscope ou d'un autre appareil approprié. Après l'enregistrement des observations effectuées à la vingt-quatrième heure, l'examen des yeux peut se poursuivre à la fluorescéine.

La cotation des réactions oculaires est forcément subjective. L'harmonisation de la cotation des réactions oculaires et l'appui aux laboratoires d'essai ainsi qu'au personnel chargé d'effectuer et d'interpréter les observations passent par une formation adéquate des expérimentateurs au système de cotation utilisé. La cotation des réactions cutanées devrait faire l'objet d'une évaluation à l'aveugle.

2. **RÉSULTATS**

2.2. ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Le degré d'irritation oculaire devrait être évalué en considération de la gravité des lésions et de leur caractère réversible ou non. Les cotes individuelles ne fournissent pas une valeur absolue des propriétés irritantes d'une substance, celles-ci étant évaluées parallèlement à d'autres effets de la substance. En revanche, les cotes individuelles ont une valeur de référence et ne sont significatives que lorsqu'elles sont appuyées par une description et une évaluation complètes de toutes les observations.

▼B

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Justification de l'essai in vivo: analyse de la valeur probante des résultats d'essais préexistants, notamment ceux qui procèdent de la démarche expérimentale séquentielle:

— description des données pertinentes livrées par des essais précédents,

— données obtenues à chaque étape de la démarche expérimentale,

— description des essais effectués in vitro, détaillant les procédures utilisées et mentionnant les résultats obtenus avec les substances d'essai et avec les substances de référence,

— description de l'étude d'irritation/corrosion cutanée menée in vivo, mentionnant les résultats obtenus,

— justification de l'étude in vivo après analyse de la valeur probante des résultats disponibles.

Substance d'essai:

— données d'identification (par exemple, numéro CAS, source, pureté, impuretés connues, numéro de lot),

— état physique et propriétés physico-chimiques (par exemple, pH, volatilité, solubilité, stabilité, réactivité avec l'eau),

— s'il s'agit d'un mélange: composition et pourcentages relatifs des constituants,

— si on a eu recours à une anesthésie locale: identification, pureté, type, dose et interaction potentielle avec la substance d'essai.

Véhicule:

— identification, concentration (s'il y a lieu), volume utilisé,

— justification du choix du véhicule.

Animaux, d'expérience:

— espèce/souche utilisée, justification de l'utilisation éventuelle d'un animal autre que le lapin albinos,

— âge de chaque animal au début de l'essai,

— nombre d'animaux de chaque sexe dans les groupes d'essai et témoin (le cas échéant),

— poids de chaque animal au début et à la fin de l'essai,

— source des animaux, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Résultats:

— description de la méthode utilisée pour coter l'irritation à chaque moment d'observation (par exemple lampe à fente portative, biomicroscope, fluorescéine),

▼B

— présentation sous forme de tableaux des réactions d'irritation ou de corrosion relevées chez chaque animal et à chaque moment d'observation jusqu'à la fin de la participation de chaque animal à l'essai,

— description circonstanciée du degré et de la nature de l'irritation ou de la corrosion observées,

— description de toute autre lésion oculaire observée (par exemple vascularisation, formation d'un pannus, adhérences, coloration),

— description des effets non oculaires locaux et des troubles systémiques, ainsi que des observations histopathologiques, le cas échéant.

Discussion des résultats.

3.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'extrapolation à l'humain des résultats d'études d'irritation oculaire menées sur des animaux de laboratoire n'est valable que dans une certaine mesure. Dans bien des cas, le lapin albinos est plus sensible que l'espèce humaine aux substances irritantes ou corrosives pour l'œil.

Lors de l'interprétation des résultats, il faut savoir reconnaître une irritation consécutive à une infection secondaire, laquelle ne doit pas être prise en compte.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, p. 410- 429.

(2) De Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Cerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, p. 159-164.

(3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, p. 161-177.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. In Vitro, 2, p. 19-26.

(5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, p. 227-231.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, p. 483-524.

(6a) Méthode d'essai B.40. Corrosion cutanée.

(7) Méthode d'essai B.4. Toxicité aiguë: irritation/corrosion cutanée.

(8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

▼B

(9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(10) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No 19 (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

▼B

Tableau I

Cotation des réactions oculaires

Cornée

Opacité: degré de densité (les observations porteront sur les zones les plus denses) (*)

Pas d'ulcération ni d'opacité	0
Zones d'opacité (autres qu'un léger ternissement de l'éclat normal) dispersées ou diffuses; détails de l'iris nettement visibles	1
Zone translucide aisément discernable; détails de l'iris légèrement masqués	2
Zone nacrée; détails de l'iris complètement invisibles; dimension de la pupille à peine discernable	3
Cornée opaque; iris non discernable à travers l'opacité	4

Maximum possible: 4

NOTES

(*) L'étendue de l'opacité cornéenne doit être précisée.

Iris

Normal	0
Plis nettement plus profonds, congestion, tuméfaction, hyperhémie péricornéenne modérée ou conjonctives injectées; iris réactif à la lumière (une réaction lente est positive)	1
Hémorragie, destruction marquée, ou absence de réaction à la lumière	2

Maximum possible: 2

Conjonctives

Rougeur (s'applique aux conjonctives palpébrale et bulbaire, mais pas à la cornée ni à l'iris)

Normal	0
Hyperhémie de certains vaisseaux sanguins (yeux injectés)	1
Coloration pourpre diffuse, vaisseaux sanguins difficilement discernables les uns des autres	2
Coloration rouge soutenu diffuse	3

Maximum possible: 3

Chémosis

Tuméfaction (s'applique aux paupières et/ou aux membranes nictitantes)

Normal	0
Tuméfaction légèrement supérieure à la normale	1
Tuméfaction patente avec éversion partielle des paupières	2
Tuméfaction avec paupières à demi closes	3
Tuméfaction avec paupières plus qu'à demi closes	4

Maximum possible: 4

▼B

ANNEXE

Démarche expérimentale séquentielle pour les essais d'irritation et de corrosion oculaires

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

Pour concilier la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, il importe d'éviter l'utilisation inutile d'animaux d'expérience et de réduire au minimum toute procédure expérimentale susceptible de déclencher des effets graves chez les animaux. Avant d'envisager un essai in vivo, on évaluera toutes les informations disponibles concernant l'éventuel pouvoir corrosif/irritant d'une substance sur les yeux. Il se peut que les données disponibles suffisent à classer une substance d'essai quant à son pouvoir d'irritation ou de corrosion oculaire, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer des essais sur animaux. Ainsi, le recours à une analyse de la valeur probante des résultats et l'adoption d'une démarche expérimentale séquentielle limiteront au maximum la nécessité de pratiquer des essais in vivo, surtout si la substance risque d'engendrer des réactions violentes.

Il est recommandé d'évaluer les informations existantes concernant le pouvoir irritant ou corrosif des substances sur les yeux, à l'aide d'une analyse de la valeur probante des résultats, afin d'établir la nécessité de réaliser des études supplémentaires, autres que des études in vivo sur l'œil, pour contribuer à caractériser ce pouvoir. Si cette nécessité se confirme, une démarche expérimentale séquentielle est préconisée pour produire les données expérimentales nécessaires. S'agissant des substances qui n'ont pas encore fait l'objet d'essais, il convient d'obtenir l'ensemble des données permettant d'évaluer le pouvoir corrosif ou irritant de la substance par une démarche séquentielle. La démarche expérimentale exposée dans la présente annexe a été élaborée au cours d'un atelier de l'OCDE (1). Elle a par la suite été entérinée et complétée dans le cadre du système harmonisé de classification intégrée des risques pour la santé humaine et l'environnement liés aux substances chimiques (Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances), adopté par la vingt-huitième réunion conjointe du comité sur les produits chimiques et du groupe de travail sur les produits chimiques, les pesticides et la biotechnologie, en novembre 1998 (2).

Si cette démarche expérimentale séquentielle ne fait pas partie intégrante de la méthode d'essai B.5, elle constitue cependant la procédure recommandée pour déterminer l'effet irritant ou corrosif sur les yeux. Cette procédure représente à la fois la meilleure pratique et une référence éthique dans ce domaine. La méthode d'essai décrit le mode opératoire de l'essai in vivo et récapitule les facteurs à prendre en considération avant d'envisager un tel essai. La démarche séquentielle préconise une analyse de la valeur probante des données existantes concernant les propriétés d'irritation ou de corrosion oculaires des substances et présente les différentes étapes permettant d'obtenir des données pertinentes sur les substances qui nécessitent d'autres études ou qui n'ont pas encore été étudiées. Elle préconise, dans un premier temps, la réalisation des essais in vivo ou ex vivo validés et acceptés, et ensuite, dans certaines circonstances, la mise en œuvre des études d'irritation/corrosion cutanée de la méthode d'essai B.4 (3) (4).

DESCRIPTION DE LA DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE SÉQUENTIELLE

Avant d'entreprendre les essais inscrits dans la démarche expérimentale séquentielle (figure), il faut évaluer toutes les informations disponibles afin d'établir la nécessité d'effectuer des essais oculaires in vivo. Bien que l'évaluation de certains paramètres particuliers puisse livrer des informations significatives (par exemple un pH extrême), la totalité des informations existantes doit être prise en considération. L'analyse de la valeur probante des résultats portera sur toutes les données pertinentes concernant les effets de la substance en question et de ses analogues; elle débouchera sur une décision qui devra être justifiée. Il conviendra d'accorder une place prépondérante aux données se rapportant aux humains et aux animaux, et d'examiner ensuite les résultats des essais in vitro ou ex vivo sur la substance. Les essais in vivo de substances corrosives devront être évités chaque fois que cela est possible. Les facteurs pris en compte dans la démarche expérimentale sont repris ci-après:

▼B

Évaluation des données existantes sur les humains et les animaux (étape 1). Les données existantes sur l'être humain, notamment études cliniques, études sur les conditions de travail et rapports se rapportant à ces études, et/ou les résultats d'essais réalisés sur des animaux dans le cadre d'études oculaires sont à examiner en premier, car ils livrent des informations directement liées aux effets sur les yeux. Il convient ensuite d'évaluer les résultats des études d'irritation/corrosion cutanée menées sur l'homme et/ou l'animal. Les substances ayant un pouvoir avéré d'irritation ou de corrosion oculaires, de même que les substances qui provoquent une irritation ou corrosion cutanées ne doivent pas être instillées dans les yeux des animaux; ces dernières substances sont à considérer comme étant également corrosives et/ou irritantes pour les yeux. Les substances dont le caractère non corrosif et non irritant a été démontré de manière suffisante par des études oculaires antérieures ne doivent pas non plus faire l'objet d'essais in vivo sur l'œil.

Analyse des relations structure-activité (RSA) (étape 2). Le cas échéant, les résultats d'essais sur des substances structurellement proches doivent être pris en considération. S'il existe suffisamment de données relatives aux humains et/ou aux animaux sur des substances structurellement proches ou sur des mélanges de ces substances pour attester leur pouvoir corrosif ou irritant sur les yeux, on peut supposer que la substance étudiée provoquera les mêmes réactions. Auquel cas, il n'est plus forcément nécessaire de tester la substance. Des résultats négatifs lors d'études de substances structurellement proches ou de mélanges de ces substances ne constituent pas une preuve suffisante de l'effet non corrosif ou non irritant d'une substance dans le cadre de la démarche expérimentale séquentielle. On déterminera le pouvoir corrosif ou irritant pour la peau et pour l'œil en appliquant une méthode d'analyse RSA validée et acceptée.

Propriétés physico-chimiques et réactivité chimique (étape 3). Les substances présentant des valeurs de pH extrêmes, par exemple $< 2,0$ ou $\geq 11,5$, sont susceptibles d'induire de fortes réactions locales. Si une valeur de pH extrême est un indice décisif quant au caractère corrosif ou irritant d'une substance pour l'œil, son pouvoir tampon doit également entrer en ligne de compte (3) (4). Si le pouvoir tampon donne à penser que la substance peut ne pas être corrosive pour l'œil, cette hypothèse demande à être confirmée par un autre essai, de préférence un essai in vitro ou ex vivo validé et accepté (voir étapes 5 et 6).

Prise en compte des autres informations existantes (étape 4). Toutes les informations disponibles concernant la toxicité systémique par voie cutanée doivent être évaluées à ce stade. Il convient également d'évaluer la toxicité cutanée aiguë de la substance d'essai. Si la substance d'essai s'est révélée très toxique par voie cutanée, il n'est pas nécessaire de la tester sur les yeux. Même s'il n'y a pas nécessairement de lien entre la toxicité cutanée aiguë et l'irritation/corrosion oculaire, on peut considérer que, si un agent est très toxique par voie cutanée, il entraînera également une toxicité élevée en cas d'instillation dans l'œil. Ces données peuvent aussi être prises en considération entre les étapes 2 et 3.

Résultats des essais in vitro ou ex vivo (étapes 5 et 6). Il est inutile de tester sur des animaux les substances dont le pouvoir fortement irritant ou corrosif a été mis en évidence par un essai in vitro ou ex vivo validé et accepté (7) (8) pour l'évaluation spécifique de l'irritation/corrosion oculaire ou cutanée. Il est en effet très vraisemblable que ces substances produiront des effets semblables in vivo. S'il n'existe pas d'essais in vitro/ex vivo validés et acceptés, il convient de passer directement à l'étape 7 en ignorant les étapes 5 et 6.

Évaluation in vivo du pouvoir irritant ou corrosif de la substance sur la peau (étape 7). S'il n'existe pas suffisamment d'éléments pour déterminer de façon concluante le pouvoir d'irritation/corrosion oculaire d'une substance à partir des résultats des études susmentionnées, ce pouvoir doit être évalué en premier lieu in vivo, suivant la méthode d'essai B.4 (4) et son annexe (9). S'il apparaît que la substance provoque une corrosion ou une forte irritation cutanée, il y a lieu de la considérer comme corrosive ou irritante pour l'œil, à moins que d'autres éléments ne tendent à prouver le contraire. Auquel cas, un essai oculaire in vivo ne serait pas nécessaire. Si la substance n'est pas corrosive ni très irritante pour la peau, il y a lieu de pratiquer un essai oculaire in vivo.

▼B

Essai in vivo sur des lapins (étapes 8 et 9): l'étude oculaire in vivo doit débuter par un essai initial réalisé sur un seul animal. Si les résultats de cet essai indiquent que la substance est très irritante ou corrosive pour l'œil, il ne faut pas poursuivre les essais. Si cet essai ne fait apparaître aucun effet de corrosion ni d'irritation marquée, un essai confirmatoire est pratiqué sur deux animaux supplémentaires.

BIBLIOGRAPHIE

(1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (http://wwwl.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://wwwl.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, p. 161- 177.

(4) Méthode d'essai B.4. Toxicité aiguë: irritation/corrosion cutanée.

(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. In Vitro, 2, p. 19-26.

(6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, p. 227-231.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, PA, Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, p. 483-524.

(8) Méthode d'essai B.40. Corrosion cutanée.

(9) Annexe à la méthode d'essai B.4. Démarche expérimentale séquentielle pour les essais d'irritation et de corrosion cutanées.

▼B

Figure

PROCÉDURE D'ESSAI ET D'ÉVALUATION DE L'IRRITATION ET DE LA CORROSION OCULAIRES

	Activité	Observation	Conclusion
1	Données existantes sur l'humain et/ou l'animal montrant des effets sur les yeux	Graves lésions oculaires	Effet déterminant d'emblée; considérée comme corrosive pour les yeux. Essai pas nécessaire.
		Irritante pour les yeux	Effet déterminant d'emblée; considérée comme irritante pour les yeux. Essai pas nécessaire.
		Ni corrosive, ni irritante pour les yeux	Effet déterminant d'emblée; considérée comme non corrosive et non irritante pour les yeux. Essai pas nécessaire.
	Données existantes sur l'humain et/ou l'animal montrant des effets de corrosion sur la peau	Corrosive pour la peau.	Effet corrosif supposé sur les yeux. Essai pas nécessaire.
	Données existantes sur l'humain et/ou l'animal montrant des effets sévères d'irritation cutanée	Très irritante pour la peau	Supposée irritante pour les yeux. Essai pas nécessaire.
	↓		
	Pas d'information disponible ou informations non concluantes		
	↓		
2	Conduite d'une analyse RSA sur la corrosion ou l'irritation oculaire	Effet prévu sur les yeux : lésions graves	Effet corrosif supposé sur les yeux. Essai pas nécessaire.
		Effet prévu sur les yeux : irritation	Supposée irritante pour les yeux. Essai pas nécessaire.
	Conduite d'une analyse RSA sur la corrosion cutanée	Effet prévu sur la peau : corrosion	Effet corrosif supposé sur les yeux. Essai pas nécessaire.
	↓		
	Effet impossible à prédire ou prédiction incertaine ou négative		
	↓		
3	Mesure du pH (pouvoir tampon, le cas échéant)	pH ≤ 2 ou ≥ 11,5 (avec pouvoir tampon élevé, le cas échéant)	Effet corrosif supposé sur les yeux. Essai pas nécessaire.
	↓		
	2< pH < 11,5 ou pH ≤ 2,0 ou ≥ 11,5 avec pouvoir tampon faible ou nul, le cas échéant		
	↓		
4	Évaluation de la toxicité systémique par voie cutanée	Très toxique aux concentrations qui seraient utilisées dans l'essai oculaire	La substance serait trop toxique pour être testée. Essai pas nécessaire.
	↓		
	Informations non disponibles, ou substance pas très toxique		
	↓		

▼B

5	Conduite d'un essai *in vitro* ou *ex vivo* de corrosion cutanée validé et accepté	Réaction de corrosion	Effet corrosif supposé sur les yeux. Essai supplémentaire pas nécessaire.
	↓		
	Substance non corrosive, ou absence de méthode d'essai in vitro *ou* ex vivo *validé pour la corrosion oculaire*		
	↓		
6	Conduite d'un essai d'irritation oculaire *in vitro* ou *ex vivo* validé et accepté	Réaction d'irritation	Supposée irritante pour les yeux. Essai supplémentaire pas nécessaire.
	↓		
	Substance non irritante, ou absence de méthode d'essai in vitro *ou* ex vivo *validé pour l'irritation oculaire*		
	↓		
7	Évaluation expérimentale *in vivo* du pouvoir irritant/corrosif sur la peau (voir méthode d'essai B.4 et annexe).	Réaction de corrosion ou d'irritation sévère	Effet corrosif supposé sur les yeux. Essai supplémentaire pas nécessaire.
	↓		
	Substance ni corrosive ni très irritante pour la peau		
	↓		
8	Conduite d'un essai oculaire *in vivo* initial sur un seul animal	Graves lésions oculaires	Considérée comme corrosive pour les yeux. Essai supplémentaire pas nécessaire.
	↓		
	Absence de lésions graves ou absence de réaction		
	↓		
9	Conduite d'un essai confirmatoire sur un ou deux animaux supplémentaires	Corrosive ou irritante	Considérée comme corrosive ou irritante pour les yeux. Essai supplémentaire pas nécessaire.
		Ni corrosive, ni irritante.	Considérée comme non corrosive et non irritante pour les yeux. Essai supplémentaire pas nécessaire.

▼B

B.6. **SENSIBILISATION CUTANÉE**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Remarques

La sensibilité des essais et leur capacité à détecter les substances susceptibles d'entraîner une sensibilisation cutanée chez l'homme sont des critères importants dans un système de classification de la toxicité établi à des fins de santé publique.

Il n'existe pas de méthode d'essai unique qui permette d'identifier de manière adéquate toutes les substances ayant un potentiel de sensibilisation cutanée pour l'homme et qui puisse être appliquée à toutes les substances.

Divers facteurs tels que les caractéristiques physiques d'une substance, y compris son pouvoir de pénétration cutanée, doivent être pris en considération lors du choix de l'essai.

Deux types d'essai utilisant des cobayes ont été développés: d'une part, les essais avec adjuvant dans lesquels l'état est potentialisé par la dissolution ou la mise en suspension dans de l'adjuvant complet de Freund (ACF) de la substance à tester, et d'autre part les essais sans adjuvant.

Les essais avec adjuvant ont généralement un meilleur pouvoir prédictif du potentiel sensibilisant cutanée de la substance testée avec plus de précision que les méthodes qui n'utilisent pas l'adjuvant complet de Freund. C'est la raison pour laquelle leur utilisation est préférable.

L'essai de maximalisation chez le cobaye (GPMT: Guinea Pig Maximisation Test) est un essai avec adjuvant très répandu. Bien qu'il existe plusieurs autres méthodes pour détecter le potentiel de sensibilisation cutanée, le GPMT est l'essai avec adjuvant de prédilection.

Les essais sans adjuvant (l'essai de Buehler étant préférable) sont considérés comme moins sensibles vis-à-vis de nombreuses classes de produits chimiques.

Dans certains cas, l'essai de Buehler qui consiste en une application topique, peut s'avérer préférable à l'essai de maximalisation qui nécessite une injection intradermique. L'utilisation de l'essai de Buehler doit être scientifiquement justifiée.

L'essai de maximalisation chez le cobaye (GMPT) et l'essai de Buehler sont décrits dans cette méthode. D'autres méthodes peuvent être utilisées, à condition qu'elles soient correctement validées et que leur utilisation soit scientifiquement justifiée.

Si un résultat positif est obtenu dans un test de dépistage reconnu, une substance peut être considérée comme un sensibilisant potentiel et il peut ne pas être nécessaire de réaliser un essai complémentaire sur le cobaye. Cependant si un résultat négatif est obtenu dans un tel test de dépistage, un essai sur le cobaye doit être effectué en utilisant la procédure décrite dans la présente méthode d'essai.

Voir également introduction générale, partie B.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

La sensibilisation cutanée (dermite allergique de contact) est une réaction immunologique cutanée à une substance. Chez l'homme, la réaction peut se caractériser par un prurit, un érythème, un œdème, des vésicules, des bulles ou une association de ces manifestations. Dans les autres espèces, la réaction peut différer et prendre uniquement la forme d'un érythème ou d'un œdème.

Exposition d'induction: exposition expérimentale d'un sujet à une substance dans le but d'induire une hypersensibilité.

Période d'induction: période d'au moins une semaine consécutive à l'exposition d'induction, au cours de laquelle une hypersensibilité peut s'installer.

Exposition de déclenchement: exposition expérimentale, après période d'induction, d'un sujet préalablement exposé à la substance, dans le but de vérifier si le sujet présente une réaction d'hypersensibilité.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

La sensibilité et la fiabilité de la technique expérimentale utilisée doivent être vérifiées tous les six mois à l'aide de substances ayant des propriétés connues de sensibilisation cutanée faible à modérée.

Pour un essai conduit selon les règles, les substances faiblement ou moyennement sensibilisantes provoquent normalement une réaction d'au moins 30 % dans les méthodes avec adjuvant et 15 % dans les méthodes sans adjuvant.

Les substances suivantes seront de préférence utilisées:

Numéro CAS	Numéro EINECS	Dénomination EINECS	Dénomination usuelle
101-86-0	202-983-3	α-hexylcinnamaldéhyde	α-hexylcinnamaldéhyde
149-30-4	205-736-8	benzothiazole-2-thiol (mercaptobenzothiazole)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzocaïne	nordcaïne

Dans certaines circonstances dûment justifiées, il est possible d'utiliser d'autres substances répondant aux critères ci-dessus.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Les animaux d'expérience sont dans un premier temps exposés à la substance à tester par une injection intradermique et/ou une application épidermique (exposition d'induction). Après une période de repos de 10 à 14 jours (période d'induction) au cours de laquelle une réaction immunitaire peut se produire, les animaux sont exposés à une dose de déclenchement. L'étendue et le degré de la réaction cutanée des animaux sont alors comparées à celles de la réaction observée chez les animaux témoins qui ont reçu un placebo lors de 1 induction et qui ont été soumis à l'exposition de déclenchement.

1.5. DESCRIPTION DES MÉTHODES D'ESSAI

Si l'élimination de la substance à tester s'avère nécessaire, ceci doit être fait en utilisant de l'eau ou un solvant approprié afin de ne pas modifier la réaction existante ou l'intégrité de l'épiderme.

▼B

1.5.1. *Essai de maximalisation chez le cobaye (GMPT)*

1.5.1.1. Préparation

De jeunes cobayes albinos, sains, sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours avant le début de l'essai. Avant l'essai, les animaux sont répartis au hasard en lots à traiter et lots témoins. Les poils sont tondus, rasés ou épilés chimiquement selon la méthode utilisée. Il faut veiller à ne pas érafler la peau. Les animaux sont pesés avant le début et à la fin de l'essai.

1.5.1.2. Conditions de l'essai

1.5.1.2.1. Animaux d'expérience

Souches de cobayes albinos couramment utilisées en laboratoire.

1.5.1.2.2. Nombre et sexe

On peut utiliser des animaux de l'un ou l'autre sexe. Si l'on utilise des femelles, elles doivent être nullipares et non gravides.

Le lot traité comprend au minimum 10 animaux et le lot témoin, au moins 5. Si le lot traité comprend moins de 20 animaux et le lot témoin moins de 10, et qu'il n'est pas possible de conclure que la substance à tester est un agent sensibilisant. Dans ce cas, il est fortement recommandé d'utiliser d'autres animaux afin d'arriver à un total d'au moins 20 animaux d'essai et 10 animaux témoins.

1.5.1.2.3. Doses

La concentration de substance utilisée pour chaque exposition d'induction doit être bien tolérée par l'organisme des animaux et doit correspondre à la concentration maximale entraînant une irritation cutanée légère à modérée. La concentration utilisée pour l'exposition de déclenchement doit correspondre à la concentration maximale n'entraînant pas d'irritation. Si nécessaire, les concentrations appropriées peuvent être déterminées à partir d'un essai pilote impliquant deux ou trois animaux. À cet effet, il convient d'utiliser des animaux traités par l'adjuvant complet de Freund.

1.5.1.3. Mode opératoire

1.5.1.3.1. Induction

Jour 0 — lot traité

Trois séries de deux injections intradermiques d'un volume de 0,1 ml chacune sont pratiquées dans la région scapulaire préalablement débarrassée de ses poils, de part et d'autre de la ligne médiane.

Injection 1: mélange 1:1 (v/v) adjuvant complet de Freund/eau ou sérum physiologique

Injection 2: la substance à tester dans un véhicule adéquat, à la concentration sélectionnée

Injection 3: la substance à tester à la concentration voulue, mélangée dans un rapport 1:1 (v/v) à de l'adjuvant complet de Freund ou du sérum physiologique.

Pour l'injection 3, les substances hydrosolubles sont dissoutes dans la phase aqueuse avant d'être mélangées avec l'adjuvant complet de Freund. Les substances liposolubles ou insolubles sont d'abord mises en suspension dans 1 adjuvant complet de Freund, puis mises en phase aqueuse. La concentration finale de la substance à tester doit être égale à celle utilisée pour l'injection 2.

▼B

Les injections 1 et 2 sont pratiquées à proximité l'une de l'autre et le plus près possible de la tête, tandis que l'injection 3 est effectuée vers la partie caudale de la zone d'essai.

Jour 0 — lot témoin

Trois séries de deux injections intradermiques d'un volume de 0,1 ml chacune sont réalisées aux mêmes endroits que chez les animaux traités.

Injection 1: mélange 1:1 (v/v) adjuvant complet de Freund/eau ou sérum physiologique

Injection 2: le véhicule non dilué

Injection 3: formulation à 50 % du véhicule dans un mélange 1:1 d'adjuvant complet de Freund/eau ou sérum physiologique.

5e — 7e jour — lot traité et lot témoin

Environ 24 heures avant l'application topique d'induction et si la substance ne provoque pas d'irritation cutanée, la zone d'essai rasée et/ou tondue est badigeonnée avec 0,5 ml de lauryl sulfate de sodium à 10 % dans de la vaseline, afin de créer une irritation locale.

6e — 8e jour — lot traité

La zone d'essai est à nouveau débarrassée de ses poils. Un papier filtre (2 x 4 cm) imprégné de la substance dans le véhicule approprié est appliqué sur la zone d'essai et maintenu en contact avec la peau à l'aide d'un pansement occlusif pendant 48 heures. Le choix du véhicule doit être justifié. Les substances solides sont réduites en poudre fine et incorporées dans un véhicule approprié; les substances liquides peuvent éventuellement être appliquées directement.

6e — 8e jour — lot témoin

La zone d'essai est à nouveau débarrassée de ses poils. Le véhicule seul est appliqué comme indiqué précédemment sur la zone d'essai et maintenu en contact avec la peau pendant 48 heures à l'aide d'un pansement occlusif.

1.5.1.3.2. Déclenchement

20e — 22ème jour — lot traité et lot témoin

Les flancs des animaux traités et des animaux témoins sont débarrassés de leurs poils. Un patch ou une cupule chargés de la substance à tester est appliquée sur un des flancs des animaux et, s'il y a lieu, un patch ou une cupule imprégnés uniquement du véhicule est appliquée sur l'autre flanc. Les pastilles sont maintenues en contact avec la peau pendant 24 heures à l'aide d'un pansement occlusif.

1.5.1.3.3. Observation et cotation: lot traité et lot témoin

— Environ 21 heures après le retrait de la pastille, la zone étudiée est nettoyée et rasée et/ou tondue et épilée si nécessaire;

— 3 heures plus tard environ (à peu près 48 heures après le début de l'application de déclenchement), la réaction cutanée est observée et cotée d'après l'échelle indiquée en annexe;

— environ 24 heures après cette observation, on procède à une seconde observation (72 heures) et à une nouvelle cotation.

Il est recommandé de procéder à une lecture en aveugle chez les animaux traités et les animaux témoins.

S'il est nécessaire de préciser les résultats obtenus lors de la première exposition de déclenchement, une seconde exposition de déclenchement (c'est-à-dire redéclenchement), si nécessaire avec un nouveau lot témoin, sera envisagée environ une semaine après la première exposition. La nouvelle exposition de déclenchement peut également être effectuée sur le lot témoin initial.

▼B

Toutes les réactions cutanées et toutes les observations inhabituelles, y compris les réactions systémiques, résultant d'une exposition d'induction ou de déclenchement, doivent être observées et cotées d'après l'échelle de Magnusson/Kligman (voir annexe). D'autres techniques telles qu'un examen histopathologique ou la mesure de l'épaisseur du pli cutané peuvent être utilisées pour préciser les réactions douteuses.

1.5.2. *Essai de Buehler*

1.5.2.1. Préparation

De jeunes cobayes albinos, sains, sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours avant le début de l'essai. Avant l'essai, les animaux sont répartis au hasard en lots à traiter et lots témoins. Les poils sont coupés, rasés ou éventuellement épilés chimiquement selon la méthode utilisée. Il faut veiller à ne pas érafler la peau. Les animaux sont pesés avant le début et à la fin de l'essai.

1.5.2.2. Conditions de l'essai

1.5.2.2.1. Animaux d'expérience

Souches de cobayes albinos couramment utilisées en laboratoire.

1.5.2.2.2. Nombre et sexe

On peut utiliser des animaux de l'un ou l'autre sexe. Si l'on utilise des femelles, elles doivent être nullipares et non gravides.

Le lot traité comprend au minimum 20 animaux et le lot témoin, au moins 10.

1.5.2.2.3. Doses

Pour chaque exposition d'induction, la concentration de substance à utiliser est la concentration maximale entraînant une irritation modérée mais non excessive. Pour l'exposition de déclenchement, la concentration à utiliser est la concentration maximale n'entraînant pas d'irritation. Si nécessaire, les concentrations appropriées peuvent être déterminées à partir d'un essai pilote impliquant deux ou trois animaux.

Pour les substances hydrosolubles, il convient d'utiliser comme véhicule de l'eau ou une solution diluée non irritante de surfactant. Pour les autres substances, il est préférable d'utiliser un mélange d'éthanol à 80 % dans de l'eau pour l'induction, et de l'acétone pour le déclenchement.

1.5.2.3. Mode opératoire

1.5.2.3.1. Induction

Jour 0 — lot traité

Un des flancs des animaux est rasé. La compresse servant à réaliser le test est imprégnée de la substance à tester incorporée dans un véhicule approprié (le choix du véhicule doit être justifié; les substances liquides peuvent au besoin être appliquées directement). La compresse est appliquée sur la zone d'essai et maintenue en contact avec la peau pendant 6 heures à l'aide d'un pansement occlusif ou d'une cupule et d'un pansement approprié.

▼B

Le système doit être occlusif. Un tampon de ouate rond ou carré de 4 à 6 cm^2 convient. Il est préférable d'utiliser un dispositif de contention approprié pour garantir l'occlusion. Si l'on utilise des bandages, des expositions supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires.

Jour 0 — lot témoin

Un des flancs des animaux est rasé. Le véhicule seul est appliqué de la façon décrite pour les animaux traités. La compresse servant à réaliser le test est maintenue en contact avec la peau pendant 6 heures à l'aide d'un pansement occlusif ou d'une cupule et d'un pansement approprié. S'il peut être prouvé qu'il n'est pas nécessaire de simuler le traitement sur le lot témoin, cette étape peut être omise, un contrôle ne recevant rien peut être utilisé.

6^e — 8^e jour et 13^e — 15^e jour — lot traité et lot témoin

La même application que celle décrite au jour 0 est réalisée sur la même zone (débarrassée de ses poils si nécessaire) du même flanc au 6^e — 8^e jour, puis à nouveau au 13^e — 15^e jour.

1.5.2.3.2. Déclenchement

27^e — 29^e jour — lot traité et lot témoin

Le flanc non traité des animaux du lot traité et du lot témoin est rasé. Une compresse occlusive ou une cupule contenant la quantité appropriée de la substance à tester, à la concentration maximale n'entraînant pas d'irritation, est appliquée sur la partie postérieure du flanc non traité des animaux du lot traité et du lot témoin.

S'il y a lieu, on appliquera également une compresse occlusive ou une cupule ne contenant que le véhicule sur la partie antérieure du flanc non traité des animaux du lot traité et du lot témoin. Les compresses ou cupules sont maintenues en contact avec la peau à l'aide d'un pansement approprié pendant 6 heures.

1.5.2.3.3. Observations et cotation

— Environ 21 heures après le retrait de la compresse, la zone d'essai est débarrassée de ses poils;

— environ trois heures plus tard (à peu près 30 heures après le début de l'exposition de déclenchement), la réaction cutanée est observée et cotée d'après l'échelle indiquée en annexe;

— environ 24 heures après cette observation (soit environ 54 heures après l'exposition de déclenchement), la réaction cutanée est à nouveau observée et cotée.

Il est recommandé d'effectuer une lecture en aveugle de la réaction dans le lot traité et le lot témoin.

S'il est nécessaire de préciser les résultats obtenus lors de la première exposition de déclenchement, une seconde exposition de déclenchement, si nécessaire avec un nouveau lot témoin, sera envisagée environ une semaine après la première exposition. La nouvelle exposition de déclenchement peut également être effectuée sur le lot témoin initial.

▼B

Toutes les réactions cutanées et toutes les observations inhabituelles, y compris les réactions systémiques, résultant d'une exposition d'induction ou de déclenchement (c'est-à-dire de redéclenchement), doivent être consignées et cotées d'après l'échelle de Magnusson/Kligman (voir annexe). D'autres techniques telles qu'un examen histopathologique ou la mesure de l'épaisseur du pli cutané peuvent être utilisées pour préciser les réactions douteuses.

2. **RÉSULTATS (GMPT ET ESSAI DE BUEHLER)**

Les résultats sont récapitulés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque animal, la réaction cutanée lors de chaque observation.

3. **COMPTE RENDU (GMPT ET ESSAI DE BUEHLER)**

Lorsqu'un test de dépistage [par exemple essai local sur ganglions lymphatiques (LLNA), essai de gonflement de l'oreille de souris (MEST)], est effectué préalablement à l'essai sur le cobaye, il convient d'en fournir la description ou la référence, ainsi que les détails du mode opératoire et les résultats obtenus avec la substance à tester et les substances de référence.

Procès-verbal d'essai (GMPT et essai de Buehler)

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

Animaux d'expérience:

— souche de cobayes utilisée,

— nombre, âge et sexe des animaux,

— origine, conditions d'hébergement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions expérimentales:

— technique de préparation du site d'application,

— détails sur les matériaux utilisés pour l'application et la technique d'application,

— résultats de l'étude pilote et conclusions concernant les concentrations d'induction et de déclenchement à utiliser dans l'essai,

— détails concernant la préparation, l'application et l'élimination de la substance à tester,

— justification du choix du véhicule,

— concentrations du véhicule et de la substance à tester utilisées pour les expositions d'induction et de déclenchement, et quantité totale de substance appliquée pour l'induction et le déclenchement.

Résultats:

— résumé des résultats du dernier contrôle de sensibilité et de fiabilité (voir 1.3), y compris informations sur la substance, la concentration et le véhicule utilisés,

▼B

— toute observation effectuée sur chaque animal, cotations comprises,

— description de la nature et de la gravité des effets observés,

— toute observation histopathologique.

Discussion des résultats

Conclusions

4. **RÉFÉRENCES**

Cette méthode reprend la ligne directrice 406 de l'OCDE.

▼B

Appendice

TABLEAU

échelle de Magnusson et Kligman pour la cotation des réactions cutanées à une exposition de déclenchement

0 = pas de modification apparente

1 = érythème discret ou localisé

2 = érythème modéré et confluent

3 = érythème intense avec gonflement

▼M4

B.7. ÉTUDE DE TOXICITÉ ORALE À DOSE RÉPÉTÉE PENDANT 28 JOURS SUR LES RONGEURS

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 407 (2008) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La ligne directrice 407 originale avait été adoptée en 1981. Des modifications y ont été apportées en 1995 afin de tirer davantage d'informations des animaux utilisés dans l'étude, en particulier en matière de neurotoxicité et d'immunotoxicité.

2. L'OCDE a lancé en 1998 une activité prioritaire destinée à réviser les lignes directrices existantes et à en élaborer de nouvelles pour les essais et le dépistage des perturbateurs endocriniens (8). L'un des objectifs était de mettre à jour la ligne directrice de l'OCDE relative à l'«étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs» (407), en y introduisant des paramètres capables de détecter l'activité endocrinienne des substances d'essai. Le protocole a alors fait l'objet d'un programme international approfondi chargé d'évaluer la pertinence et la praticabilité de ces paramètres additionnels, leur performance pour des produits chimiques à activité (anti)œstrogénique, (anti)androgénique et (anti)thyroïdienne, leur reproductibilité intra- et inter-laboratoires et leur interférence avec les paramètres requis par la version antérieure de la ligne directrice. Les très nombreuses données ainsi recueillies ont été rassemblées et évaluées en détail dans un rapport très complet de l'OCDE (9). La présente mise à jour de la méthode B.7 est le fruit de l'expérience et des résultats accumulés durant le programme international d'essais. Elle permet de mettre certains effets à médiation endocrinienne en perspective avec d'autres effets toxicologiques.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITATIVES

3. Lors de l'appréciation et de l'évaluation des caractéristiques toxiques d'un produit chimique, la détermination de la toxicité orale à doses répétées peut s'effectuer après avoir obtenu des informations préliminaires sur la toxicité à partir d'essais de toxicité aiguë. La présente méthode d'essai vise à étudier les effets toxiques des produits chimiques sur un large spectre de cibles de toxicité. Elle fournit des informations sur les risques pour la santé que peut entraîner une exposition répétée durant une période de temps relativement limitée, notamment pour le système nerveux, le système immunitaire et le système endocrinien. Concernant ces critères d'effet précis, elle devrait permettre d'identifier des produits chimiques potentiellement neurotoxiques, pouvant justifier des études plus approfondies de cet aspect, etdes produits chimiques qui interfèrent avec la physiologie de la thyroïde. Elle pourrait également fournir des données sur les produits chimiques qui affectent les organes reproducteurs mâles et/ou femelles des jeunes animaux adultes et donner des indications sur leurs effets immunologiques.

4. Les résultats de la présente méthode d'essai B.7 devraient servir à l'identification des dangers et à l'évaluation des risques. Les résultats obtenus concernant les paramètres endocriniens devraient être interprétés à la lumière du «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des produits chimiques perturbant le système endocrinien» (11). La méthode prévoit une étude basique de toxicité à dose répétée, pouvant être utilisée sur les produits chimiques pour lesquels une étude de 90 jours n'est pas justifiée (par exemple quand le volume de production ne dépasse pas certaines limites) ou préalablement à une étude à long terme. La durée d'exposition doit être de 28 jours.

▼M4

5. Le programme international mené afin de valider les paramètres susceptibles de détecter l'activité endocrinienne d'une substance d'essai a montré que la qualité des données obtenues grâce à cette méthode d'essai B.7 dépendra beaucoup de l'expérience du laboratoire pratiquant les essais. Ce constat concerne spécifiquement la détermination histopathologique de changements cycliques dans les organes reproducteurs femelles et la détermination du poids des petits organes hormono-dépendants, difficiles à disséquer. Un document d'orientation a été élaboré en matière d'histopathologie (19). Il est disponible sur le site de l'OCDE à la rubrique consacrée aux lignes directrices pour les essais de produits chimiques. Il vise à aider les pathologistes dans leurs investigations et à améliorer la sensibilité des essais. Un certain nombre de paramètres ont été identifiés comme indicateurs de toxicité endocrinienne et ont été ajoutés à la méthode d'essai. D'autres, dont l'utilité n'a pu être prouvée faute de données suffisantes ou dont la capacité à détecter les perturbateurs endocriniens a été insuffisamment démontrée par le programme de validation, sont proposés comme paramètres facultatifs (voir appendice 2).

6. Sur la base des données produites par le processus de validation, il convient de souligner que la sensibilité de cet essai est insuffisante pour identifier toutes les substances présentant une action (anti)androgénique ou (anti)œstrogénique (9). La présente méhtode d'essai ne s'applique pas à un stade de vie très sensible aux perturbations endocriniennes. Elle a pourtant permis, pendant le processus de validation, d'identifier des substances affectant faiblement ou fortement la fonction thyroïdienne, ainsi que des substances agissant fortement ou modérément sur le système endocrinien par le biais des récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes, mais dans la plupart des cas, n'est pas parvenue à identifier les substances agissant sur le système endocrinien en affectant faiblement ces récepteurs. Ainsi ne peut-elle être décrite comme un essai de dépistage de l'activité endocrinienne.

7. Par conséquent, l'absence d'effet lié à ces modes d'action ne peut constituer une preuve de l'absence d'effet sur le système endocrinien. En ce qui concerne les effets à médiation endocrinienne, la caractérisation des substances ne doit donc pas s'appuyer uniquement sur les résultats de la présente méthode d'essai, mais doit être utilisée dans le cadre d'une démarche fondée sur le «poids de la preuve», combinant toutes les données existant sur un produit chimique pour caractériser son action potentielle sur le système endocrinien. C'est pourquoi la prise de décision réglementaire sur l'activité endocrinienne des produits chimiques (caractérisation des substances) doit adopter une méthode large ne s'appuyant pas sur les résultats de cette seule méthode d'essai.

8. Il est entendu que toutes les procédures d'essai utilisant des animaux obéiront aux normes locales en vigueur sur le traitement à leur réserver; la description des soins et traitements prodigués aux animaux utilisés dans le présent essai correspond donc à des normes de performance minimales qui seront le cas échéant adaptées à la législation locale si celle-ci est plus stricte. D'autres recommandations sur l'humanité du traitement à réserver aux animaux ont été formulées par l'OCDE (14).

9. L'appendice 1 présente les définitions utilisées.

PRINCIPE DE L'ESSAI

10. La substance à tester est administrée quotidiennement par voie orale à différents niveaux de dose à plusieurs groupes d'animaux, à raison d'un niveau de dose par groupe, pendant une période de 28 jours. Chaque jour au cours de cette période, les animaux sont examinés soigneusement afin de déceler tout signe de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont euthanasiés au cours de l'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont également euthanasiés et autopsiés. Une étude de 28 jours fournit des informations sur les effets d'une exposition répétée par voix

▼M4

orale et peut indiquer la nécessité d'études ultérieures plus longues. Elle peut également apporter des informations sur la sélection des concentrations en vue d'études plus poussées. Les données tirées de l'application de la méthode d'essai devraient permettre de caractériser la toxicité de la substance d'essai, d'avoir une indication sur la relation dose réponse et de déterminer la concentration sans effet nocif observé (CSENO).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sélection de l'espèce animale

11. L'espèce de rongeur préférée est le rat, bien que d'autres espèces de rongeurs puissent être utilisées. Si les paramètres spécifiés dans la méthode d'essai B.7 sont étudiés sur une autre espèce de rongeur, une justification détaillée devra être donnée. Bien qu'il soit biologiquement plausible que d'autres espèces répondent aux produits toxiques de manière similaire au rat, l'utilisation d'espèces plus petites peut provoquer une variabilité accrue compte tenu de la difficulté technique à disséquer des organes de plus petite taille. Le rat a été la seule espèce utilisée lors du programme international de validation des paramètres pour la détection des perturbateurs endocriniens. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains issus de souches de laboratoire courantes. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. L'administration doit commencer dès que possible après le sevrage et, dans tous les cas, avant l'âge de neuf semaines. Au début de l'étude, les différences de poids entre les animaux utilisés doivent être minimales et ne pas excéder ± 20 % de la moyenne du poids pour chaque sexe. Lorsque l'essai est conduit à titre d'étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme, il est préférable d'utiliser des animaux issus de la même souche et de la même source dans les deux études.

Encagement et alimentation

12. Toutes les procédures doivent respecter les normes locales en vigueur sur le traitement des animaux de laboratoire. La température dans le local d'expérimentation doit être de 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative doit être d'au moins 30 % et si possible ne pas dépasser 70 %, excepté pendant le nettoyage de la pièce, l'idéal étant 50-60 %. Pour l'éclairage, on doit utiliser la lumière artificielle et respecter une séquence de 12 heures d'éclairement et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai, lorsqu'elle est administrée dans la nourriture. Les animaux doivent être encagés par petits groupes du même sexe; ils peuvent être encagés individuellement si une nécessité scientifique le justifie. Pour l'encagement de groupe, il convient de ne pas dépasser cinq animaux par cage.

13. La nourriture doit être analysée régulièrement à la recherche de contaminants. Un échantillon en sera conservé jusqu'à la finalisation du rapport.

Préparation des animaux

14. De jeunes animaux adultes sains sont répartis au hasard entre le groupe témoin et les groupes traités. Les cages doivent être placées de façon à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Les animaux sont identifiés individuellement et placés dans les cages au moins cinq jours avant le début de l'étude, pour leur permettre de s'acclimater aux conditions du laboratoire.

Préparation des doses

15. La substance d'essai est administrée par gavage ou dans la nourriture ou l'eau de boisson, la méthode étant choisie en fonction de l'objectif de l'étude et des propriétés physico-chimiques, toxiques et cinétiques de la substance d'essai.

▼M4

16. Lorsque cela s'avère nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule adéquat. On recommande, de privilégier, dans la mesure du possible, l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse. À défaut, on peut utiliser une solution ou une suspension dans l'huile (par exemple l'huile de maïs) et finalement une solution dans d'autres véhicules. La toxicité des véhicules autres que l'eau doit être connue. La stabilité de la substance d'essai dans le véhicule doit être déterminée.

PROTOCOLE

Nombre et sexe des animaux

17. Au moins 10 animaux (5 femelles et 5 mâles) doivent être utilisés pour chaque dose. Si on envisage d'euthanasier des animaux au cours de l'essai, il faut accroître le nombre d'animaux d'expérience du nombre d'animaux euthanasiés avant la fin de l'épreuve. On envisagera d'inclure un groupe satellite supplémentaire de 10 animaux (5 par sexe) dans le groupe témoin et dans le groupe traité à la plus forte dose, afin d'observer la réversibilité, la persistance, ou l'apparition tardive des effets toxiques, au moins 14 jours après le traitement.

Dosage

18. De manière générale, au moins trois groupes d'essai et un groupe témoin doivent être utilisés, mais si d'après l'évaluation des autres données aucun effet n'est attendu à la dose de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, un essai limite peut être réalisé. S'il n'existe aucune donnée préalable, une étude préliminaire (animaux de la même souche et de la même provenance) peut être menée pour faciliter la détermination des doses à utiliser. Exception faite de l'exposition avec la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités d'une manière identique à ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé pour administrer la substance d'essai, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé.

19. Les niveaux de dose doivent être déterminés en tenant compte de toutes les informations disponibles concernant les propriétés toxiques ou toxico-cinétiques de la substance d'essai ou de substances analogues. La dose la plus élevée doit provoquer des effets toxiques, sans être létale ou causer de sévères souffrances. Une séquence de doses décroissantes doit ensuite être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une concentration sans effet nocif observé (CSENO) à la dose la plus faible. Des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (par exemple un facteur supérieur à 10) entre les doses.

20. En cas d'observation d'une toxicité générale (par exemple réduction du poids corporel, effets sur le foie, le cœur, les poumons ou les reins, etc.) ou d'autres modifications susceptibles de ne pas constituer une réponse toxique (par exemple diminution de la prise de nourriture, grossissement du foie), les effets observés sur les paramètres neurologiques, endocriniens ou liés au système immunitaire, devront être interprétés avec précaution.

Essai limite

21. Si un essai pratiqué avec une seule dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, ou, pour une administration par le biais de la nourriture ou de l'eau, d'un pourcentage équivalent de cette nourriture ou de cette eau (en fonction de la détermination du poids corporel), en suivant le mode opératoire décrit pour cette étude, ne produit aucun effet toxique observable et s'il n'y a pas de raison de penser que la substance soit toxique compte tenu des données dont on dispose au sujet de substances ayant une structure analogue, on peut considérer qu'il n'est pas nécessaire de réaliser une étude complète avec trois niveaux de dose. L'essai limite s'applique, sauf lorsque les données d'exposition humaine indiquent la nécessité d'utiliser une dose plus élevée.

▼M4

Administration des doses

22. La substance d'essai est administrée aux animaux quotidiennement, sept jours sur sept, sur une période de 28 jours. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, les animaux doivent recevoir une dose unique, introduite au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Ce volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où il peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Exception faite des substances irritantes ou corrosives, qui provoqueront normalement des effets exacerbés aux concentrations plus élevées, il convient de réduire au minimum la variabilité du volume d'essai en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à toutes les doses.

23. Si la substance d'essai est administrée dans les aliments ou l'eau de boisson, il importe de s'assurer que sa quantité n'interfère ni avec la nutrition normale ni avec l'équilibre hydrique. Lorsque la substance d'essai est incorporée aux aliments, deux possibilités sont offertes: soit le maintien d'une concentration constante dans les aliments (ppm), soit le maintien d'un niveau de dose constant par rapport au poids corporel des animaux; il y a lieu de préciser l'option choisie. Si la substance est administrée par gavage, la dose doit être administrée à la même heure chaque jour et ajustée si nécessaire pour rester constante par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'une étude à doses répétées sert de d'étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme, il faut applique le même régime alimentaire dans les deux études.

Observations

24. La période d'observation doit durer 28 jours. Les animaux d'un groupe satellite destinés à des observations ultérieures ne doivent recevoir aucun traitement pendant au moins 14 jours en vue de détecter d'éventuels effets toxiques différés ou persistants, ou de mettre en évidence le rétablissement des animaux traités.

25. Les animaux doivent faire l'objet d'un examen clinique général au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets prévus devraient être les plus marqués après l'administration. L'état de santé des animaux doit être consigné. Au moins deux fois par jour, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité.

26. Tous les animaux doivent faire l'objet d'un examen clinique détaillé, une fois avant la première exposition (pour pouvoir effectuer des comparaisons sur un même individu), et ensuite au moins une fois par semaine. Ces observations doivent être effectuées hors de la cage habituelle, sur une aire standard, de préférence toujours au même moment de la journée. Elles doivent être soigneusement consignées, de préférence en utilisant un système de cotation, explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Il faudrait s'efforcer de minimiser les variations des conditions d'essai et prendre les dispositions nécessaires pour que les examens soient effectués par des observateurs n'ayant pas connaissance du traitement. Les symptômes relevés devraient couvrir les observations suivantes (sans que cette liste soit exhaustive): modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions, et de réactions neuro-végétatives (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, dimension de la pupille, respiration anormale). Il convient également de consigner les changements dans la démarche, la posture et les réactions à la manipulation ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, des comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou comportements bizarres (par exemple, automutilation, marche à reculons) (2).

27. Lors de la quatrième semaine d'exposition, il faut vérifier la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (2) (stimuli auditifs, visuels et proprioceptifs, par exemple) (3) (4) (5), et évaluer la force de préhension (6) et l'activité motrice (7). On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. Toutefois, on peut également utiliser d'autres modes opératoires que ceux qui figurent dans les références.

▼M4

28. Les observations fonctionnelles réalisées au cours de la quatrième semaine d'exposition peuvent être omises lorsque l'essai sert d'étude préliminaire à une étude subchronique ultérieure (90 jours). Dans ce cas, les observations fonctionnelles devront être menées au cours de la seconde étude. Cela étant, les données tirées des observations fonctionnelles de l'étude à doses répétées peuvent faciliter la sélection des doses retenues pour l'étude subchronique ultérieure.

29. À titre exceptionnel, les observations fonctionnelles peuvent aussi être omises pour des groupes qui par ailleurs présentent des symptômes de toxicité à un degré tel qu'ils interféreraient sensiblement avec le déroulement de l'essai fonctionnel.

30. Lors de l'autopsie, le cycle œstral de l'ensemble des femelles peut être déterminé (facultatif) par frottis vaginal. Ces observations fourniront des informations sur le stade du cycle œstral atteint au moment de l'euthanasie et faciliteront l'évaluation histologique des tissus sensibles aux œstrogènes [voir le guide d'orientations sur l'histopathologie (19)].

Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau

31. Tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. La consommation de nourriture doit également être mesurée au moins une fois par semaine. Si la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la consommation d'eau doit aussi être mesurée au moins une fois par semaine.

Hématologie

32. À la fin de la période d'essai, il faut procéder aux examens hématologiques suivants: hématocrite, concentration d'hémoglobine, numération des érythrocytes, reticulocytes, numération et formule leucocytaire, numération des plaquettes et mesure du temps et potentiel de coagulation. D'autres analyses devant être menées si la substance d'essai ou ses métabolites supposés ont ou sont susceptibles d'avoir des propriétés oxydantes portent notamment sur la concentration de méthémoglobine et les corps de Heinz.

33. Des échantillons de sang doivent être prélevés à un endroit spécifié juste avant ou pendant la procédure d'euthanasie des animaux, et stockés dans des conditions appropriées. Les animaux doivent avoir jeûné la nuit précédant l'euthanasie ([1]).

Biochimie clinique

34. Les analyses de biochimie clinique destinées à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur le rein et le foie, devraient être pratiquées sur des échantillons de sang prélevés sur tous les animaux juste avant ou pendant leur euthanasie (à l'exception des animaux trouvés moribonds et/ou euthanasiés avant la fin de l'essai). Les analyses du plasma ou du sérum doivent porter sur le sodium, le potassium, le glucose, le cholestérol total, l'urée, la créatinine, la concentration totale de protéines et d'albumine, au moins deux enzymes indicatrices des effets hépatocellulaires (telles que l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatase alcaline, la gamma glutamyle transpeptidase et la glutamate déshydrogénase), ainsi que sur les acides biliaires. Le dosage d'autres enzymes (d'origine hépatique ou autre) et de la bilirubine, peut fournir des informations utiles dans certaines circonstances.

35. À titre facultatif, on peut effectuer les analyses d'urine suivantes au cours de la dernière semaine de l'étude sur des échantillons d'urine prélevés à des moments déterminés: apparence, volume, osmolalité ou poids spécifique, pH, protéines, glucose, sang et cellules sanguines.

([1]) Il est préférable de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang pour un certain nombre de dosages dans le sérum et le plasma, surtout pour le dosage du glucose. Cette recommandation est principalement motivée par l'accroissement de variabilité qui découlerait inévitablement d'une non- observation du jeûne et qui tendrait à masquer des effets plus subtils, rendant de ce fait l'interprétation des résultats plus difficile. En revanche, l'observation du jeûne durant une nuit entière risque de perturber le métabolisme général des animaux et, notamment lors d'études où la substance d'essai est administrée dans la nourriture, risque de perturber l'exposition quotidienne à la substance d'essai. Si la pratique du jeûne durant la nuit est adoptée, les analyses de biochimie clinique doivent être réalisées après les observations fonctionnelles faites au cours de la quatrième semaine de l'étude.

▼M4

36. Il faudrait envisager par ailleurs de rechercher dans le plasma ou le sérum des marqueurs de lésions générales des tissus. Si les propriétés connues de la substance d'essai risquent ou sont soupçonnées d'affecter certaines voies métaboliques, on devrait procéder à d'autres analyses, notamment celles du calcium, du phosphate, des triglycérides, d'hormones spécifiques et de la cholinestérase. La nécessité de ces analyses doit être déterminée pour certaines classes de produits chimiques ou au cas par cas.

37. Bien que l'évaluation internationale des paramètres liés au système endocrinien n'ait pas pu établir de façon claire l'intérêt de l'analyse des hormones thyroïdiennes (T3, T4) et de la TSH, il peut être utile de conserver des échantillons de plasma ou de sérum pour mesurer la T3, la T4 et la TSH (facultatif) s'il semble qu'un effet sur l'axe hypophyso-thyroïdien puisse exister. Ces échantillons pourront être congelés à - 20 °C pour être stockés. Les facteurs suivants peuvent influencer la variabilité et les concentrations absolues lors de l'analyse hormonale:

— moment de l'euthanasie, en raison de la variation diurne des concentrations hormonales,

— méthode d'euthanasie, évitant de stresser inutilement les animaux, ce qui pourrait affecter leurs concentrations hormonales,

— kits d'analyse hormonale pouvant différer par leurs courbes standards.

L'identification définitive des substances chimiques actives sur le système thyroïdien s'appuiera de manière plus fiable sur l'analyse histopathologique que sur les niveaux hormonaux.

38. Les échantillons de plasma destinés spécifiquement à l'analyse hormonale doivent être prélevés aux mêmes heures de la journée. Il est recommandé de prendre en considération les taux de T3, T4 et TSH provoqués par des altérations de l'histopathologie de la thyroïde. Les valeurs numériques obtenues lors de l'analyse des concentrations hormonales diffèrent selon les kits d'essai du commerce utilisés. Il peut ainsi ne pas être possible de fournir des critères de performance fondés sur des données historiques homogènes. Pour pallier cet inconvénient, les laboratoires s'efforceront de maintenir les coefficients de variation en dessous de 25 pour la T3 et pour la T4 et de 35 pour la TSH. Toutes les concentrations doivent être exprimées en ng/ml.

39. Si les données de référence historiques sont inappropriées, il conviendra de prendre en compte les variables d'hématologie et de biochimie clinique avant le début du dosage ou de préférence sur un groupe d'animaux distincts des groupes d'essai.

PATHOLOGIE

Autopsie générale

40. Tous les animaux utilisés dans l'étude feront l'objet d'une autopsie générale, complète et détaillée, qui comporte un examen approfondi de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie, les reins, les glandes surrénales, les testicules, les épididymes, l'ensemble formé par la prostate, les vésicules séminales et les glandes coagulantes, le thymus, la rate, le cerveau et le cœur de tous les animaux (à l'exception des animaux moribonds et/ou euthanasiés avant la fin de l'essai) doivent être débarrassés, le cas échéant, de tout tissu adhérent et pesés à l'état frais dès que possible après la dissection, afin d'éviter leur dessiccation. Il convient d'enlever très soigneusement les tissus adhérents de l'ensemble de la prostate, de façon à éviter toute ponction de la vésicule séminale remplies de liquide. Une alternative consistera à débarrasser la vésicule séminale et la prostate des tissus adhérents et de les peser après fixation.

▼M4

41. De manière facultative, deux autres organes peuvent aussi être pesés dès que possible après la dissection, afin d'éviter leur dessiccation: les deux ovaires (poids frais) et l'utérus, y compris le col de l'utérus [des orientations sur l'ablation et la préparation des tissus utérins pour leur pesée sont données par la ligne directrice 440 de l'OCDE (18)].

42. Le poids de la thyroïde (facultatif) peut être déterminé après la fixation. L'élimination des tissus adhérents doit également s'opérer avec beaucoup de soin et seulement après la fixation pour éviter d'abîmer les tissus, et par là de compromettre l'analyse d'histopathologie.

43. Les tissus suivants doivent être conservés dans le milieu de fixation le plus approprié compte tenu à la fois du type de tissu et des examens histopathologiques prévus (voir paragraphe 47): toutes les lésions macroscopiques, l'encéphale (les régions représentatives du cerveau comprenant les hémisphères cérébraux, le cervelet et la protubérance annulaire), la moelle épinière, les yeux, l'estomac, l'intestin grêle, le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, les reins, les glandes surrénales, la rate, le cœur, le thymus, la thyroïde, la trachée et les poumons (préservés par injection de fixateur, puis immergés), les gonades (testicules et ovaires), les organes génitaux auxiliaires (utérus et col de l'utérus, épididymes, prostate + vésicules séminales et glandes coagulantes), le vagin, la vessie, les ganglions lymphatiques [le ganglion lymphatique le plus proximal et un autre, en fonction de l'expérience du laboratoire (15)], un nerf périphérique (sciatique ou poplité interne), de préférence tout près du muscle, un muscle squelettique et un os, avec la moelle osseuse (coupe ou à défaut une ponction examinée immédiatement). Il est recommandé de fixer les testicules par immersion dans un fixateur de Bouin ou de Davidson modifié (16) (17). L'albuginée du testicule doit être ponctionnée délicatement et superficiellement aux deux pôles de l'organe avec une aiguille pour permettre la pénétration rapide du fixateur. Les résultats des observations cliniques et autres peuvent conduire à l'examen de tissus supplémentaires. En outre, il y a lieu de conserver tout organe qui pourrait être considéré comme un organe cible possible, eu égard aux propriétés connues de la substance d'essai.

44. Les tissus suivants peuvent apporter des informations utiles sur les effets endocriniens: gonades (ovaires et testicules), organes génitaux auxiliaires (utérus et col de l'utérus, épididymes, vésicules séminales et glande coagulante, prostate dorsolatérale et ventrale), vagin, hypophyse, glande mammaire mâle, glande thyroïdienne et glande surrénale. Les changements survenant dans les glandes mammaires mâles n'ont pas encore été insuffisamment documentés, mais ce paramètre peut s'avérer très sensible aux substances à action œstrogénique. L'observation des organes/tissus non cités au paragraphe 43 est facultative (voir appendice 2).

45. Le document d'orientation sur l'histopathologie (19) fournit des informations supplémentaires sur la dissection, la fixation, le prélèvement et l'histopathologie des tissus endocriniens.

46. Au cours du programme d'essais international, des éléments de preuve ont été apportés montrant que des effets subtils sur le système endocrinien de substances chimiques susceptibles de faiblement déséquilibrer l'homéostasie des hormones sexuelles peuvent être identifiés par leur capacité à perturber la synchronisation du cycle œstral dans différents tissus plutôt que par une nette altération histopathologique des organes sexuels femelles. Bien qu'aucune preuve définitive n'ait été apportée sur ces effets, il est recommandé que les preuves d'une asynchronie possible du cycle oestral soient prises en compte dans l'interprétation de l'examen histopathlogique des ovaires (cellules folliculaires, thécales et de la granulosa), de l'utérus, du col de l'utérus et du vagin. Si elle est évaluée (facultatif), la période du cycle déterminée par les frottis vaginaux peut également être incluse dans cette comparaison

▼M4

Histopathologie

47. Un examen histopathologique complet doit être pratiqué sur les tissus et organes conservés de tous les animaux appartenant au groupe témoin et au groupe traité à la dose la plus élevée. Ces examens devront être étendus aux animaux de tous les autres groupes de dosage dès lors qu'on observe des modifications liées au traitement dans le groupe traité à la dose la plus élevée.

48. Toutes les lésions macroscopiques seront examinées.

49. Si un groupe satellite est inclus, les tissus et organes sur lesquels des effets ont été observés dans les groupes traités doivent faire l'objet d'un examen histopathologique.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

50. Il faut présenter les résultats correspondant à chaque animal. En outre, toutes les données doivent être résumés sous forme de tableaux faisant apparaître, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou de l'euthanasie, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, et une description des ces signes, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions, leur gravité et le pourcentage d'animaux affecté par chaque type de lésion.

51. Dans la mesure du possible, les résultats numériques devraient être évalués par une méthode statistique appropriée et largement reconnue. La comparaison des effets au sein d'une même fourchette de dosage devrait éviter d'avoir à recourir à des tests de t multiples. Les méthodes statistiques devront être sélectionnées au stade de la conception de l'étude.

52. À des fins de contrôle de la qualité, il est suggéré de recueillir des données de contrôle historiques et de calculer les coefficients de variation pour les données numériques, en particulier pour les paramètres liés à la détection des perturbateurs endocriniens. Ces données peuvent être utilisées à des fins comparatives lorsque des études réelles sont évaluées.

Rapport d'essai

53. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique, pureté et propriétés physico-chimiques,

— données permettant l'identification chimique.

Véhicule, le cas échéant:

— justification du choix du véhicule, s'il est autre que l'eau.

Animaux d'essai:

— espèce/souche utilisée,

— nombre, âge et sexe des animaux,

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai,

— justification du choix de l'espèce s'il ne s'agit pas de rat.

Conditions d'essai:

— justification du choix des doses,

— description détaillée de la préparation de la substance à tester et/ou de son incorporation dans la nourriture, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,

▼**M4**

— détails relatifs à l'administration de la substance d'essai,

— conversion de la concentration de la substance d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (en ppm) en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu,

— détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau.

Paramètres optionnels étudiés:

— liste des paramètres facultatifs étudiés.

Résultats:

— poids corporel/variation du poids corporel,

— consommation de nourriture et d'eau, le cas échéant,

— données sur la réponse toxique par sexe et par dose et description des symptômes de toxicité,

— nature, gravité et durée des observations cliniques (réversibles ou non),

— évaluations de l'activité sensorielle, de la force de préhension et de l'activité motrice,

— analyses de sang et valeurs normales de référence,

— analyses de biochimie clinique et valeurs normales de référence,

— poids corporel lors de l'euthanasie et poids des organes,

— résultats d'autopsie,

— description détaillée de tous les résultats des examens histopathologiques,

— données relatives à l'absorption, si elles sont disponibles,

— traitement statistique des résultats, s'il y a lieu.

Discussion des résultats

Conclusions

▼M4

Appendice 1

DÉFINITIONS

Activité antiandrogénique: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un mammifère.

Activité antiœstrogénique: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone œstrogénique naturelle (par exemple l'œstradiol 17ß) chez un mammifère.

Activité antithyroïdienne: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple la T3) chez un mammifère.

Activité thyroïdienne: capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple la T3) chez un mammifère.

Androgénicité: capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un mammifère.

CSENO: sigle pour «concentration (maximale) sans effet nocif observé», c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif lié au traitement n'est observé.

Dosage: terme général recouvrant la dose, sa fréquence et la durée de l'administration

Dose: quantité de substance d'essai administrée. La dose est exprimée en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience par jour (par exemple en mg/kg de poids corporel/jour), ou en concentration constante dans la nourriture.

Œstrogénicité: capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone œstrogénique naturelle (par exemple l'œstradiol 17ß) chez un mammifère.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Toxicité manifeste: terme général désignant des signes évidents de toxicité qui surviennent à la suite de l'administration d'une substance d'essai. Ces signes doivent être suffisants pour permettre l'évaluation des dangers et doivent être tels qu'on puisse s'attendre à ce qu'une augmentation de la dose administrée entraîne l'apparition de signes de toxicité grave et probablement la mort.

Validation: processus scientifique destiné à caractériser les impératifs opérationnels et les limites d'une méthode d'essai et à démontrer sa fiabilité et sa pertinence pour un objectif particulier.

▼M4

Appendice 2

Paramètres recommandés dans la méthode d'essai B.7 pour la détection des perturbateurs endocriniens

Paramètres obligatoires	Paramètres facultatifs
Poids	
— Testicules — Épididymes — Glandes surrénales — Prostate + vésicules séminales et glandes coagulantes	— Ovaires — Utérus, y compris col de l'utérus — Thyroïde
Histopathologie	
— Gonades: — Testicules et — Ovaires — Organes sexuels auxiliaires: — Épididymes, — Prostate + vésicules séminales et glandes coagulantes — Utérus, y compris col de l'utérus — Glandes surrénales — Thyroïde — Vagin	— Frottis vaginaux — Glandes mammaires mâles — Hypophyse
Dosages hormonaux	
	— Niveaux circulants de T3 et de T4 — Niveaux circulants de TSH

BIBLIOGRAPHIE:

(1) OCDE (Paris, 1992). Rapport du président de la réunion du groupe de travail ad hoc d'experts sur la neurotoxicité systémique à court terme (et différée).

(2) PISC (1986). Principes et méthodes de la neurotoxicité liée à l'exposition aux produits chimiques. Critères d'hygiène de l'environnement n° 60.

(3) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(4) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

(5) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(6) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼**M4**

(7) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(8) OCDE (1998). Rapport de la première réunion du Groupe d'étude sur les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens, 10 et 11 mars 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OCDE (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OCDE (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OCDE (2012).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr 2649 37407 2348794 1 1 1 37407,00.html

(12) OCDE (2006). Compte rendu final de la réunion du Groupe de gestion de la validation pour les essais sur les mammifères. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OCDE. Projet de compte rendu du Groupe d'étude sur les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OCDE (2000) Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(15) Haley P., Perry R., Ennulat D., Frame S., Johnson C., Lapointe J.-M., Nyska A., Snyder P.W., Walker D. et Walter G. (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

(16) Hess R.A., Moore B.J. (1993) Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, p. 52-85.

(17) Latendresse J.R., Warbrittion A.R., Jonassen H., Creasy D.M. (2002). Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

(18) OCDE (2007). Ligne directrice pour les essais de produits chimiques de l'OCDE nº 440: Bio-essai utérotrophique chez les rongeurs: Essai de dépistage à court terme des propriétés œstrogéniques.

(19) OCDE. (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8. TOXICITÉ SUBAIGUË PAR INHALATION: ÉTUDE SUR 28 JOURS

RÉSUMÉ

La présente méthode d'essai B.8 révisée a été conçue afin de caractériser pleinement la toxicité par inhalation de la substance d'essai, à la suite d'une exposition répétée sur une période de temps limitée (28 jours), et de fournir des données pour les estimations quantitatives des risques liés à l'inhalation. Des groupes de rongeurs, composés d'au minimum 5 mâles et 5 femelles, sont exposés 6 heures par jour, pendant 28 jours: a) à la substance d'essai à trois niveaux de concentration ou plus, b) à de l'air filtré (témoin négatif), et/ou c) au véhicule (groupe témoin du véhicule). Les animaux sont exposés en général 5 jours par semaine, mais il est aussi permis de les exposer 7 jours par semaine. Des mâles et des femelles sont toujours utilisés, mais peuvent être exposés à des niveaux de concentration différents si l'un des sexes est connu pour être plus sensible à une substance d'essai donnée. Afin de mieux caractériser la toxicité de la substance d'essai, la présente méthode d'essai laisse la possibilité au directeur de l'étude d'inclure des groupes satellites (réversibilité), des lavages broncho-alvéolaires (LBA), des tests neurologiques et des évaluations histopathologiques ou de pathologie clinique supplémentaires.

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 412 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Le texte original de la ligne directrice 412 sur la toxicité subaiguë par inhalation avait été adopté en 1981 (1). La présente méthode d'essai B.8 (équivalente à la ligne directrice 412) a été révisée pour prendre en compte l'état de la science et répondre aux exigences règlementaires actuelles et futures.

2. La présente méthode permet de caractériser les effets nocifs résultant d'une exposition quotidienne répétée, par inhalation, à une substance d'essai pendant 28 jours. Les données issues d'une étude sur la toxicité subaiguë par inhalation sur 28 jours peuvent être utilisées pour des estimations quantitatives de risques (si l'étude n'est pas suivie d'un essai de toxicité subchronique par inhalation sur une période de 90 jours, voir chapitre B.29 de la présente annexe). Ces données peuvent également fournir des informations permettant la détermination des concentrations pour des études à plus long terme comme l'essai de toxicité subchronique par inhalation sur une période de 90 jours. La présente méthode d'essai n'est pas spécifiquement destinée à tester les nanomatériaux. Le document d'orientation n° 39 (2) regroupe les définitions utilisées dans le contexte de cette méthode d'essai.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

3. Avant toute étude, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai afin d'améliorer la qualité de l'étude et de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination des concentrations d'essai appropriées, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les résultats de tous les essais de toxicité in vitro ou in vivo auxquels elle a été soumise; son (ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées; ainsi que les données issues des essais de toxicité aiguë par inhalation. En cas de neurotoxicité, connue ou observée au cours de l'étude, le directeur de l'étude pourra décider d'inclure les évaluations jugées nécessaires, comme une batterie d'observations fonctionnelles (FOB) et des mesures de l'activité motrice. Bien que la durée des expositions par rapport à des examens spécifiques puisse être critique, l'exécution de ces activités supplémentaires n'interfère pas avec la conception de l'étude principale.

▼M4

4. Les dilutions de substances corrosives ou irritantes peuvent être testées à des concentrations qui permettront d'atteindre le degré de toxicité désiré, voir document d'orientation 39 (2). Lors de l'exposition des animaux à ces substances, les concentrations cibles sont assez faibles pour ne causer ni souffrance manifeste ni détresse, mais suffisantes pour prolonger la courbe concentration-réponse jusqu'à des niveaux correspondant à l'objectif scientifique et règlementaire de l'essai. Le choix de ces concentrations est fait au cas par cas, de préférence sur la base d'une étude préliminaire de détermination des concentrations, conçue de façon appropriée, et qui fournit des informations sur l'effet critique mesuré, un éventuel seuil d'irritation et le moment de son apparition (voir paragraphes 11-13). La justification du choix des concentrations est fournie.

5. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés. Les animaux moribonds sont pris en compte au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (3) détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sélection des espèces animales

6. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs adultes en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

7. Les femelles sont nullipares et non gravides. Le jour de la randomisation, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 7 à 9 semaines. Leur poids corporel ne devra pas excéder ± 20 % du poids moyen pour chaque sexe. Sélectionnés au hasard, les animaux seront marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, ils seront conservés dans leur cage pour une période d'au minimum 5 jours avant le début de l'essai.

Conditions d'élevage des animaux

8. Les animaux sont identifiés de façon individuelle, de préférence à l'aide de dispositifs sous-cutanés, afin de faciliter leur observation et d'éviter toute confusion. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est maintenue à 22 ± 3 °C. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne fait pas obstacle à une observation précise de chaque animal, et n'engendrer qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés «nez seul», il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne provoquent pas chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable, alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés «corps entier» à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour les empêcher de filtrer l'aérosol d'essai grâce à la fourrure de leurs congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

▼M4

Chambres d'inhalation

9. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de la substance d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition «nez seul» (qui inclut les dispositifs «tête seule», «nez seul» et «museau seul») est privilégié. Le mode d'exposition «nez seul» est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition «corps entier» peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais cela est justifié dans le rapport de l'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition «corps entier», on veillera à ce que le «volume» total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (2) décrit les principes des techniques d'exposition «corps entier» ou «nez seul», ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques.

ÉTUDES DE TOXICITÉ

Concentrations limites

10. Contrairement aux études de toxicité aiguë, aucune concentration limite n'est définie pour les études de toxicité subaiguë par inhalation sur 28 jours. La concentration maximale testée prend en compte: 1) la concentration maximale pouvant être atteinte, 2) le niveau d'exposition humaine correspondant au «pire des cas», 3) la nécessité de maintenir une alimentation adéquate en oxygène, et/ou 4) le bien-être des animaux. En l'absence de limites fondées sur des données, les valeurs limites pour la toxicité aiguë du règlement (CE) n° 1272/2008 (13) peuvent être utilisées (c'est-à-dire jusqu'à une concentration maximale de 5 mg/l pour les aérosols, 20 mg/l pour les vapeurs et 20 000 ppm pour les gaz); voir document d'orientation 39 (2). S'il est nécessaire de dépasser ces limites lors d'essais de gaz ou de substances d'essai hautement volatiles (comme les réfrigérants), une justification est produite. La concentration limite permet d'obtenir une toxicité sans équivoque, sans causer de stress excessif chez les animaux ni affecter leur longévité (3).

Étude préliminaire de détermination des concentrations

11. Avant le début de l'étude principale, une étude préliminaire de détermination des concentrations peut s'avérer nécessaire. Plus complète qu'une étude d'observation, elle n'est pas limitée au choix des concentrations. Les connaissances acquises grâce à une étude préliminaire de détermination des concentrations peuvent conduire à la réussite de l'étude principale. En effet, une telle étude peut fournir des informations techniques sur les méthodes d'analyse, la taille des particules, la découverte de mécanismes de toxicité, les données histopathologiques et de pathologie clinique, et les estimations de la concentration sans effet nocif observé (CSENO) et de la concentration maximale acceptable (CMA) dans une étude principale. Le directeur d'étude peut décider de s'appuyer sur une étude préliminaire de détermination des concentrations pour identifier: le seuil d'irritation de l'appareil respiratoire (par exemple avec une histopathologie de l'appareil respiratoire, des tests de la fonction pulmonaire ou des lavages bronchoalvéolaires), la concentration la plus élevée tolérée par les animaux sans provoquer de stress excessif, et les paramètres qui permettront de caractériser au mieux la toxicité de la substance d'essai.

12. Une étude préliminaire de détermination des concentrations peut comporter un ou plusieurs niveaux de concentration. Pour chaque niveau de concentration, on exposera au maximum trois mâles et trois femelles. La durée d'une étude préliminaire de détermination des concentrations est d'au minimum 5 jours et ne pas excéder 14 jours en général. Il convient d'exposer dans le rapport d'étude les raisons du choix des concentrations retenues pour l'étude principale, dont l'objet est de démontrer une relation concentration-réponse basée sur l'effet mesuré le plus sensible auquel on s'attend. La concentration la plus faible n'engendre en principe aucune manifestation de toxicité, tandis que la concentration la plus élevée permet d'obtenir une toxicité sans équivoque, sans causer de stress excessif chez les animaux ni affecter leur longévité (3).

▼M4

13. Lors du choix des niveaux de concentration pour l'étude préliminaire de détermination des concentrations, toutes les informations disponibles sont prises en compte, y compris les relations structure-activité et les données correspondant à des produits chimiques analogues (voir paragraphe 3). Une étude préliminaire de détermination des concentrations peut confirmer ou réfuter le choix des effets mesurés les plus sensibles selon des critères mécanistiques, comme l'inhibition de la cholinestérase par des composés organophosphorés, la formation de méthémoglobine par des agents cytotoxiques d'isomérie érythro, les hormones thyroïdiennes (T3, T4) dans le cas de thyrotoxiques, les protéines, la LDH, ou les neutrophiles dans les lavages bronchoalvéolaires dans le cas de particules inoffensives faiblement solubles ou d'aérosols irritants pour les poumons.

Étude principale

14. L'étude principale de toxicité subaiguë comporte en général trois niveaux de concentration ainsi qu'un témoin négatif (air) et/ou un témoin du véhicule, s'il y a lieu (voir paragraphe 17). L'ensemble des informations disponibles doit permettre de déterminer les niveaux d'exposition appropriés, y compris les résultats des études systémiques de toxicité, le métabolisme et la cinétique (on prendra garde d'éviter les niveaux de concentration élevée avec des processus cinétiques de saturation). Chaque groupe d'essai comprend au moins 10 rongeurs (5 mâles et 5 femelles) exposés à la substance d'essai 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 4 semaines (soit une durée totale de l'étude de 28 jours). Les animaux peuvent aussi être exposés 7 jours par semaine (par exemple dans le cas d'essais sur des produits pharmaceutiques inhalés). S'il est connu qu'un des sexes est plus réactif à la substance d'essai, les niveaux de concentration peuvent différer selon le sexe afin d'optimiser la concentration-réponse telle que décrite au paragraphe 15. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Lorsque la durée d'exposition est inférieure à 6 heures par jour ou qu'il est nécessaire de mener une étude d'exposition «corps entier» de longue durée (par exemple de 22 heures par jour), des justifications sont fournies, voir document d'orientation 39 (2). Les animaux sont privés de nourriture pendant l'exposition sauf si sa durée dépasse 6 heures. Dans une exposition «corps entier», les animaux peuvent boire de l'eau.

15. Les concentrations cibles choisies permettent d'identifier le(s) organe(s) cible(s) et de mettre en évidence une concentration-réponse claire:

— le niveau de concentration élevé produit des effets toxiques sans engendrer de signes persistants ou la mort, ce qui empêcherait une évaluation valable des résultats,

— le(s) niveau(x) de concentration intermédiaire(s) doi(ven)t être espacé(s) de manière à produire une gradation dans les effets toxiques observés avec une concentration faible et avec une concentration élevée,

— le niveau de concentration faible ne produit quasiment aucune manifestation de toxicité.

Étude satellite (étude de réversibilité)

16. Une étude de réversibilité peut être utilisée pour mettre en évidence le caractère réversible, persistant ou retardé de la toxicité, pour une période post-traitement d'une durée appropriée d'au minimum 14 jours. Les groupes satellites sont constitués de cinq mâles et de cinq femelles exposés en même temps que les animaux d'expérience de l'étude principale. Ils sont exposés à la concentration la plus élevée de la substance d'essai. Il convient également de faire appel à un témoin concurrent (air) et, le cas échéant, à un témoin du véhicule (voir paragraphe 17).

▼M4

Animaux témoins

17. Les animaux du groupe témoin négatif (air) sont traités d'une manière identique à ceux du groupe d'animaux d'essai, mais au lieu de la substance d'essai, ils sont exposés à de l'air filtré. Lorsque de l'eau ou une autre substance est utilisée pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est inclus dans l'étude, à la place du groupe témoin négatif exposé à l'air seulement. Autant que possible, l'eau est le véhicule utilisé. Dans ce cas, les animaux témoins sont exposés à un air dont le taux d'humidité relative est le même que pour les groupes exposés à la substance d'essai. Le choix du véhicule s'opère sur la base d'une étude préliminaire appropriée ou de données historiques. Si la toxicité d'un véhicule est mal connue, le directeur de l'étude peut choisir d'utiliser un témoin négatif (air) et un témoin du véhicule, mais cela est toutefois fortement déconseillé. Si les données historiques montrent qu'un véhicule n'est pas toxique, le groupe témoin à l'air n'est pas nécessaire et seul un témoin du véhicule est utilisé. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude préliminaire d'une substance d'essai préparée dans un véhicule, ce véhicule est considéré comme non toxique à la concentration testée et ce véhicule témoin est utilisé.

CONDITIONS D'EXPOSITION

Administration des concentrations

18. Les animaux sont exposés à la substance d'essai présenté sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou d'un mélange des deux. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, de la concentration choisie, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion. Les substances particulaires peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin de réduire la taille des particules. Pour plus d'informations, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Répartition granulométrique

19. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser (4) des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 3 μm, avec un écart type géométrique (σ_g) compris entre 1,5 et 3,0. Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques peuvent avoir une taille inférieure à cette norme, et les particules chargées ou les fibres une taille supérieure.

Préparation de la substance d'essai dans un véhicule

20. La substance d'essai est idéalement testée sans véhicule. S'il est nécessaire d'avoir recours à un véhicule pour atteindre la concentration et la taille particulaire voulues de la substance d'essai, l'eau est choisie de préférence. Chaque fois qu'une substance d'essai est dissoute dans un véhicule, sa stabilité est démontrée.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION

Débit d'air dans la chambre d'exposition

21. Le débit d'air dans la chambre d'exposition est contrôlé avec soin, surveillé en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi en temps réel de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les paramètres d'inhalation dynamiques pertinents. Si la concentration est suivie en temps réel, la fréquence peut être ramenée à une seule mesure du débit de l'air par

▼M4

exposition et par jour. Un soin particulier est apporté à éviter toute rerespiration dans les chambres d'exposition «nez seul». La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasser pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées. Si les mesures du premier jour d'exposition montrent que la concentration de ces gaz est appropriée, aucune mesure complémentaire ne devrait être nécessaire.

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

22. La température de la chambre d'exposition est maintenue à 22 ± 3 °C. Dans les cas d'exposition «nez seul» et «corps entier», l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est autant que possible surveillée en continu et enregistrée toutes les heures pendant chaque exposition. L'humidité relative est de préférence comprise entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple lorsque la substance d'essai se présente sous forme de solution aqueuse), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences de la substance d'essai avec la méthode d'essai.

Substance d'essai: concentration nominale

23. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de la substance d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai: concentration réelle

24. La concentration réelle est la concentration de la substance d'essai prélevée dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à la substance d'essai sont également effectuées par une pré-étude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre le produit à tester (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie.

25. Pendant toute la durée de l'étude, il est recommandé de n'employer si possible qu'un seul lot de la substance d'essai, et l'échantillon de la substance est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il conviendrait de réaliser une caractérisation de la substance d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes: temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de la substance d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).

▼M4

26. L'atmosphère d'exposition est maintenue constante autant que possible. Un dispositif de suivi en temps réel, tel qu'un photomètre à aérosol pour les aérosols ou un analyseur d'hydrocarbures totaux pour les vapeurs, peut être utilisé pour démontrer la stabilité des conditions d'exposition. La concentration réelle dans la chambre est mesurée au moins 3 fois chaque jour d'exposition et pour chaque niveau d'exposition. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, l'utilisation d'un échantillon par période d'exposition est acceptée. En principe, cet échantillon est alors recueilli pendant la totalité de la période d'exposition. Les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas ± 10 % pour les gaz et vapeurs et ± 20 % pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de la substance d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition (t_{95}) et leur déclin. Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (2).

27. Pour des systèmes très complexes constitués de gaz ou de vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion et substances d'essai propulsées à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisira donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général la principale substance active du mélange. Quand la substance d'essai est un mélange, la concentration analytique devra être indiquée pour le mélange global et pas uniquement pour le principe actif ou la substance indicatrice (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Substance d'essai: répartition granulométrique

28. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum chaque semaine pour chaque niveau de concentration, à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques (APS). Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade et l'autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude.

29. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, voir document d'orientation 39 (2). Si pour toutes les concentrations testées, cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au minimum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter l'essai.

30. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes.

OBSERVATIONS

31. Un examen clinique attentif des animaux est pratiqué avant, pendant, et après la période d'exposition. Des observations plus fréquentes peuvent être réalisées en fonction de la réponse des animaux pendant l'exposition. Lorsque l'observation des animaux s'avère difficile en raison des tubes de contention, du mauvais éclairage des chambres d'exposition «corps entier» ou d'atmosphères opaques, les animaux seront observés attentivement après l'exposition. Les observations effectuées avant l'exposition du lendemain peuvent permettre d'estimer une éventuelle réversibilité ou exacerbation des effets toxiques.

▼M4

32. Toutes les observations sont enregistrées individuellement pour chaque animal. Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.

33. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux, ainsi que de l'activité somatomotrice et du comportement. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma retiennent l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement. Il est possible d'enrichir le protocole d'étude par des estimations complémentaires telles que: cinétique, surveillance biologique, fonction pulmonaire, rétention de produits peu solubles qui s'accumulent dans les tissus pulmonaires et changements comportementaux.

POIDS CORPOREL

34. Le poids de chacun des animaux est enregistré individuellement: juste avant la première exposition (jour 0), deux fois par semaine par la suite (par exemple les vendredis et lundis, afin de mettre en évidence leur rétablissement après un week-end sans exposition, ou dans un délai permettant l'évaluation de la toxicité systémique), et au moment de leur mort ou de leur euthanasie. Si aucun effet n'est observé les 2 premières semaines, le poids corporel peut n'être mesuré qu'une fois par semaine pendant le reste de l'étude. Les animaux du groupe satellite (étude de réversibilité) sont toujours pesés de façon hebdomadaire tout au long de la période de récupération. Au terme de l'étude, tous les animaux sont pesés juste avant leur sacrifice pour ne pas fausser le calcul des rapports du poids des organes au poids du corps.

CONSOMMATION D'EAU ET DE NOURRITURE

35. La quantité de nourriture consommée est mesurée une fois par semaine. La consommation d'eau peut également l'être.

PATHOLOGIE CLINIQUE

36. Tous les animaux, y compris ceux des groupes témoins et satellites, quand ils sont sacrifiés, subissent des examens cliniques. Le délai entre la fin de l'exposition et la prise de sang est enregistré, en particulier quand la reconstitution de l'effet visé est rapide. À la fin de l'exposition, un échantillonnage est recommandé pour les paramètres ayant une courte demi-vie plasmatique (HbCO, ChE et MetHb, par exemple).

37. Le tableau 1 énumère les paramètres de pathologie clinique généralement requis pour toutes les études toxicologiques. Une analyse d'urine n'est pas nécessaire en règle générale, mais peut être réalisée si on l'estime utile d'après la toxicité probable ou observée. Afin de mieux caractériser la toxicité de la substance d'essai, le directeur de l'étude peut faire appel à d'autres paramètres (cholinestérase, lipides, hormones, équilibre acido-basique, méthémoglobine ou corps de Heinz, créatine kinase, rapport myéloïde/érythroïde, troponines, gaz du sang, lactate déshydrogénase, sorbitol déshydrogénase, glutamate déshydrogénase, gamma glutamyl transpeptidase, etc.).

▼M4

Tableau 1

Paramètres standards de pathologie clinique

Hématologie	
Nombre d'érythrocytes	Nombre total de leucocytes
Hématocrite	Différentiel leucocytaire
Concentration d'hémoglobine	Nombre de plaquettes sanguines
Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine	Potentiel de coagulation (en choisir un):
Volume corpusculaire moyen	— Temps de prothrombine
Concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine	— Temps de coagulation
Réticulocytes	— Temps de thromboplastine partielle
Chimie clinique	
Glucose (*)	Alanine aminotransférase
Cholestérol total	Aspartate aminotransferase
Triglycérides	Phosphatase alcaline
Azote uréique dans le sang	Potassium
Bilirubine totale	Sodium
Créatinine	Calcium
Protéines totales	Phosphore
Albumine	Chlore
Globuline	
Analyse d'urines (facultative)	
Apparence (couleur et turbidité)	Protéines totales
Volume	Glucose
Densité ou osmolarité	Sang/cellules sanguines
pH	

(*) Le directeur d'étude décidera si une période de jeûne est nécessaire ou non pour les animaux, une longue période de jeûne pouvant conduire à des mesures de glucose partiellement erronées pour les animaux traités par rapport aux animaux témoins. La période de jeûne est appropriée à l'espèce utilisée: pour le rat, elle peut être de 16 heures environ (jeûne pendant sa nuit). La détermination de la glycémie à jeun peut être effectuée après la période de jeûne de la nuit, pendant la dernière semaine d'exposition, ou après la période de jeûne de la nuit précédant l'autopsie (avec, dans ce dernier cas, tous les autres paramètres de pathologie clinique).

38. Quand il est prouvé que les voies respiratoires basses (c'est-à-dire les alvéoles pulmonaires) sont le principal site de dépôt et de rétention, le lavage broncho-alvéolaire (LBA) peut alors être la technique de choix pour effectuer une analyse quantitative les paramètres de la relation dose-effet basée sur les hypothèses, en se concentrant sur l'alvéolite, l'inflammation pulmonaire et la phospholipidose. Ceci permet d'étudier convenablement l'évolution de la relation dose-effet et du décours temporel d'une lésion alvéolaire. Le fluide du LBA peut être analysé en se basant sur le nombre total et différentiel de leucocytes, les protéines totales et la lactate déshydrogénase. D'autres paramètres peuvent également être considérés, comme ceux mettant en évidence une lésion lysosomale, une phospholipidose, une fibrose, une inflammation allergique ou irritante, laquelle peut inclure la détermination de cytokines ou de chimiokines pro-inflammatoires. Les mesures liées au LBA complètent souvent les résultats des examens histopathologiques sans toutefois s'y substituer. Des indications sur la manière de réaliser un lavage de poumon sont disponibles dans le document d'orientation 39 (2).

▼M4

MACROPATHOLOGIE ET POIDS DES ORGANES

39. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai et ceux écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une exsanguination complète (si cela est possible) et une autopsie macroscopique. Il convient d'enregistrer le délai entre la fin de la dernière exposition de chaque animal et leur sacrifice. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.

40. Le tableau 2 énumère les organes et tissus devant être conservés dans un milieu approprié lors de l'autopsie macroscopique en vue d'un examen histopathologique. La conservation des organes et tissus [entre crochets], et de tous les autres organes et tissus, est à la discrétion du directeur d'étude. Les organes indiqués **en gras** sont découpés et pesés à l'état humide, le plus tôt possible après la dissection, pour éviter leur dessiccation. La thyroïde et les épididymes ne sont pesés que si cela est nécessaire car leur découpe peut gêner l'évaluation histopathologique. Les organes et tissus sont fixés à l'aide de formol tamponné à 10 %, ou d'un autre fixateur approprié, dès que l'autopsie est effectuée, et pas moins de 24 à 48 heures avant le découpage, en fonction du fixateur utilisé.

Tableau 2

Organes et Tissus à Conserver Pendant L'autopsie Macroscopique

[Bulbe olfactif]	**Reins**
Capsules surrénales	**Testicules**
Cerveau (y compris les tronçons du cortex cérébral et de la moelle/du pont)	**Testicules**
Cœur	**Thymus**
Estomac	Thyroïde
Foie	Tissus nasopharyngés [au moins 4 niveaux; 1 niveau comprenant le conduit du nasopharynx et le tissu lymphoïde associé à la muqueuse nasale (NALT)]
Ganglions lymphatiques depuis la région hilaire du poumon, spécialement pour les substances d'essai particulaires peu solubles. Pour des examens plus approfondis et/ou des études à but immunologique, d'autres ganglions lymphatiques peuvent être envisagés, comme ceux des régions médiastinale, cervicale/submandibulaire et/ou auriculaire.	Trachée (au moins 2 niveaux comprenant 1 coupe longitudinale le long de la carène et 1 coupe transversale)
Larynx (3 niveaux, dont 1 niveau qui comprend la base de l'épiglotte)	Utérus
Moelle épinière (niveau cervical, au milieu du thorax et lombaire)	Vésicules séminales
Moelle osseuse (et/ou un aspirat frais)	[Vessie]
Œsophage	[Yeux (rétine, nerf optique) et paupières]
Ovaires	Toutes lésions macroscopiques
Poumons (tous les lobes sur un niveau, y compris les bronches principales)	
Rate	

▼M4

41. Les poumons sont retirés intacts, pesés et perfusés avec un fixateur approprié à une pression de 20 à 30 cm d'eau pour veiller à ce que l'architecture pulmonaire soit préservée (5). Les coupes sont recueillies pour tous les lobes sur un niveau, comprenant les bronches principales. Si un lavage du poumon est réalisé, le lobe qui n'a pas été lavé est sectionné sur trois niveaux (pas de coupe en série).

42. Au moins 4 niveaux des tissus nasopharyngés sont examinés, dont un devant comporter le conduit du nasopharynx (5) (6) (7) (8) (9) pour permettre un examen adéquat de l'épithélium squameux, transitionnel (respiratoire non-cilié), respiratoire (respiratoire cilié) et olfactif, ainsi que du tissu lymphatique (NALT) (10) (11). Trois niveaux du larynx sont examinés, dont un comprenant la base de l'épiglotte (12). Au moins deux niveaux de la trachée sont examinés, y compris une coupe longitudinale le long de la carène de la bifurcation des bronches extrapulmonaires et une coupe transversale.

HISTOPATHOLOGIE

43. Une évaluation histopathologique de tous les organes et tissus du tableau 2 est réalisée pour les animaux des groupes témoins et des groupes exposés à une concentration élevée de la substance d'essai, ainsi que pour les animaux qui meurent ou sont sacrifiés au cours de l'étude. On portera une attention particulière aux voies respiratoires, aux organes cibles et aux lésions macroscopiques. Les organes et tissus présentant des lésions dans le groupe exposé à une concentration élevée sont examinés pour tous les groupes. Le directeur de l'étude peut choisir de réaliser des évaluations histopathologiques pour d'autres groupes afin de mettre en évidence une relation concentration-réponse claire. Lorsqu'un groupe satellite (étude de réversibilité) est utilisé, il y a lieu d'effectuer un examen histopathologique pour tous les tissus et organes ayant laissé apparaître des effets dans les groupes traités. Lorsqu'un trop grand nombre de morts précoces ou d'autres problèmes survenant dans le groupe exposé à une concentration élevée compromettent la portée des résultats, le groupe exposé à la concentration immédiatement inférieure subit un examen histopathologique. On tentera de corréler les observations macroscopiques et les constatations au niveau microscopique.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

44. Pour chacun des animaux, les données suivantes sont fournies: poids corporel, consommation de nourriture, pathologie clinique, pathologie macroscopique, poids des organes et histopathologie. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquent pour chaque groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie. Tous les résultats, quantitatifs et fortuits, sont évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique généralement reconnue peut être utilisée; il y a lieu de sélectionner les méthodes statistiques au stade de la conception de l'étude.

Rapport d'essai

45. Le rapport d'essai contient les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage

— Description des conditions d'encagement, y compris: nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire.

▼**M4**

— Espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat. Des données sources et historiques peuvent être fournies si elles proviennent d'animaux exposés à des conditions d'exposition, d'encagement et de jeûne similaires.

— Nombre, âge et sexe des animaux.

— Méthode de randomisation.

— Description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

Substance d'essai

— Nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation).

— Données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule

— Justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau).

— Données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation

— Description détaillée de la chambre d'inhalation, y compris son volume et son schéma.

— Source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère.

— Équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle.

— Source d'air et système de climatisation utilisé.

— Méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai.

— Différence de pression (positive ou négative).

— Orifices d'exposition par chambre («nez seul») ou emplacement des animaux dans la chambre («corps entier»).

— Stabilité de l'atmosphère d'essai.

— Situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition.

— Traitement de l'air fourni/évacué.

— Débits d'air, débit d'air/orifice d'exposition («nez seul») ou rapport du volume de l'animal à la chambre («corps entier»).

— Temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}).

— Nombre de changements de volume par heure.

— Doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition

— Justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale.

▼M4

— Concentrations nominales (masse totale de substance d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre).

— Concentrations réelles de la substance d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges d'essai produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément.

— Toutes les concentrations d'air sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m^3, etc.) plutôt qu'en unités de volume (ppm, ppb, etc.).

— Répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique (σg), ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales

— Détails sur la préparation de la substance d'essai, y compris sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des solides ou pour préparer les solutions de la substance d'essai.

— Description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci.

— Détails sur l'équipement utilisé pour contrôler la température et le taux d'humidité de la chambre ainsi que le débit d'air dans chambre (réalisation d'une courbe d'étalonnage).

— Détails sur l'équipement utilisé pour recueillir les échantillons servant à déterminer les concentrations dans la chambre et la répartition granulométrique.

— Détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération de la substance d'essai à partir du milieu d'échantillonnage).

— Méthode de randomisation utilisée pour l'assignation des animaux aux groupes d'essai et aux groupes témoins.

— Détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau).

— Justification du choix des concentrations d'essai.

Résultats

— Tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation.

— Tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation.

— Tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g.

— Tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (pour les animaux montrant des signes de toxicité, notamment mortalité, nature, sévérité, moment d'apparition et durée des effets).

▼M4

— Tableau du poids de chacun des animaux.

— Tableau de la consommation de nourriture.

— Tableau des résultats de pathologie clinique.

— Résultats de l'autopsie et observations histopathologiques pour chaque animal, s'ils sont disponibles.

— Tableau de tous les autres paramètres mesurés.

Discussion et interprétation des résultats

— Un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente méthode d'essai, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules.

— La respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis.

— La cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude.

— La cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés.

— Une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (3).

— Le ou les organes cibles sont identifiés.

— La concentration sans effet nocif observé (CSENO) et la concentration minimale avec effet nocif observé (CMENO) sont déterminées.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) OCDE (1981). Toxicité à doses répétées par inhalation, Ligne directrice n° 412 d'origine, direction de l'environnement, OCDE, Paris.

(2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Évaluation, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

(4) Whalan J.E. et Redden J.C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, p. 229-258.

(6) Young J.T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes M.P. and Ward J.M. (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J, Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Règlement (CE) nº 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) nº 1907/2006 (JO L 353 du 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼B

B.9. **TOXICITÉ À DOSES RÉPÉTÉES (28 JOURS) (ADMINISTRATION CUTANÉE)**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance à tester est appliquée quotidiennement, à doses croissantes, sur la peau de plusieurs lots d'animaux d'expérience pendant une période déterminée, à raison d'une seule dose par lot, pendant une durée de 28 jours. Durant la période d'application, les animaux sont observés quotidiennement afin de déceler les signes de toxicité. Les animaux qui meurent en cours d'expérience ainsi que ceux qui sont encore en vie à l'issue de l'expérience sont autopsiés.

1.5. CRITÈRE DE QUALITÉ

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. **Préparation**

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au minimum pendant les 5 jours qui la précèdent. Avant l'expérience, des animaux jeunes et sains sont répartis selon les règles du hasard entre les différents lots témoins et traités. Peu de temps avant l'essai, on tond la région dorsale du tronc des animaux. On peut avoir recours au rasage mais, dans ce cas, l'opération doit être effectuée 24 heures environ avant l'essai. Il est en général nécessaire de répéter les opérations de tonte ou de rasage à des intervalles d'une semaine environ, en évitant toute lésion de la peau. La surface à préparer pour l'application de la substance ne doit pas être inférieure à 10 % de la surface corporelle. Le poids de l'animal doit être pris en considération pour décider de la taille de la zone à épiler, et de la dimension de la surface à traiter. Lorsque le test concerne des substances solides qui, le cas échéant, peuvent être pulvérisées, la substance à tester doit être humectée au moyen d'eau ou, au besoin, d'un véhicule approprié, de manière à garantir un bon contact avec la peau. Les substances liquides sont généralement appliquées non diluées. On procède à une application quotidienne à raison de 5 à 7 jours par semaine.

1.6.2. **Conditions de l'essai**

1.6.2.1. *Animaux d'expérience*

On peut utiliser des rats, des lapins ou des cobayes adultes. On peut également utiliser d'autres espèces, mais il faut dans ce cas en justifier l'utilisation.

▼B

Au début de l'essai, l'intervalle de variation du poids des animaux utilisés ne doit pas excéder ± 20 % de la valeur moyenne requise.

1.6.2.2. *Nombre et sexe*

Dix animaux au moins (cinq femelles et cinq mâles), à la peau saine, sont utilisés pour chaque dose. Les femelles doivent être nullipares et non-gravides. S'il est prévu dans le protocole expérimental des sacrifices intermédiaires en cours d'expérience, il y a lieu d'ajouter la quantité d'animaux nécessaire pour ces sacrifices. De plus, un lot satellite de 10 animaux (5 par sexe) peut être traité à la dose la plus élevée pendant 28 jours et faire l'objet d'une observation relative à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive d'effets toxiques durant les 14 jours qui suivent l'arrêt du traitement. On utilise aussi un lot satellite témoin de 10 animaux (cinq animaux par sexe).

1.6.2.3. *Doses*

On utilise au moins trois doses ainsi qu'un lot témoin ou, le cas échéant, un lot témoin traité avec le véhicule. La période d'exposition devra être d'au moins 6 heures par jour. La substance à tester doit être appliquée chaque jour au même moment et les quantités à administrer doivent faire l'objet d'une adaptation régulière (hebdomadaire ou bihebdomadaire) afin de conserver un niveau de dose constant par rapport au poids corporel des animaux. Excepté l'administration de substance d'essai, les animaux du lot témoin doivent être traités de la même manière que les animaux des lots d'expérience. Lorsqu'un véhicule est utilisé pour faciliter l'administration, celui-ci sera administré au lot témoin dans les mêmes conditions qu'aux lots traités et la quantité de véhicule correspondra à celle reçue par le groupe traité avec la dose de substance d'essai la plus élevée. La dose la plus élevée doit être suffisamment forte pour produire des effets toxiques mais sans toutefois entraîner la mort (ou rarement). La dose la plus faible ne doit faire apparaître aucun effet toxique. Lorsque l'on dispose d'une estimation concernant l'exposition de l'homme, la dose la plus faible doit être supérieure à cette valeur. Dans les conditions idéales, la concentration intermédiaire doit produire des effets toxiques minimaux observables. Si l'on utilise plusieurs concentrations intermédiaires, celles-ci doivent être espacées de façon à entraîner une gradation des effets toxiques. En cas de mortalité dans les lots recevant les doses faibles et intermédiaires, ainsi que dans les lots témoins, celle-ci devra être minime pour que l'évaluation des résultats soit valable.

Si l'application de la substance d'essai provoque une irritation cutanée grave, les concentrations doivent être réduites, ce qui peut entraîner une diminution, voire une disparition, des autres effets toxiques à la dose la plus élevée. De plus, si les lésions cutanées sont très graves, il peut se révéler nécessaire d'arrêter l'expérience et de la recommencer avec des concentrations plus faibles.

1.6.2.4. *Essai «limite»*

Si une expérience préliminaire réalisée avec une dose de 1 000 mg/kg de poids corporel ou avec une dose plus élevée en fonction de l'exposition possible pour l'homme, n'a provoqué aucun effet toxique, il peut s'avérer inutile de poursuivre l'expérience.

1.6.2.5. *Période d'observation*

Les animaux d'expérience doivent faire l'objet d'une observation quotidienne afin de déceler les symptômes d'intoxication. Le moment où les symptômes d'intoxication apparaissent et disparaissent ainsi que le moment de la mort doivent être consignés.

▼B

1.6.3. **Mode opératoire**

Les animaux doivent être placés dans des cages individuelles. Dans les conditions idéales, la substance d'essai est administrée aux animaux 7 jours sur 7, pendant une période de 28 jours. Les animaux de tous les lots satellites destinés à des observations complémentaires doivent être gardés en vie pendant 14 jours encore, sans traitement, afin de constater la régression ou la persistance des effets toxiques. La durée de l'exposition doit être au moins de 6 heures par jour.

La substance d'essai doit être appliquée uniformément sur une surface représentant environ 10 % de la surface corporelle totale mais lorsqu'il s'agit de substances hautement toxiques, la surface couverte peut être réduite. La couche de substance doit être aussi mince et uniforme que possible.

Durant l'exposition, la substance d'essai est maintenue en contact avec la peau au moyen d'une compresse de gaze poreuse et d'un sparadrap non irritant. La surface traitée doit, en outre, être convenablement couverte de manière à maintenir en place le pansement de gaze et la substance d'essai et de manière à éviter que les animaux puissent ingérer la substance à tester. Des appareils de contention peuvent être utilisés pour empêcher l'ingestion de la substance mais une immobilisation complète n'est pas recommandée. Il est également possible d'utiliser la technique du «collier de protection».

À l'issue de la période d'exposition, il faut, si possible, éliminer la substance résiduelle avec de l'eau ou par tout autre procédé adéquat de nettoyage de la peau.

Tous les animaux doivent être observés quotidiennement et les signes de toxicité ainsi que le moment de leur apparition, leur intensité et leur durée doivent être notés. Les observations doivent concerner les modifications de la peau et des poils, des yeux, des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire ainsi que des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somatomotrice et du comportement. Les animaux doivent être pesés chaque semaine. Il est également recommandé d'effectuer des mesures hebdomadaires sur la consommation alimentaire des animaux. Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux afin de veiller à ce que, dans la mesure du possible, ceux-ci ne soient pas perdus pour l'expérience pour des raisons telles que cannibalisme, autolyse des tissus au cours des remises en cages. A l'issue de l'expérience, tous les animaux survivants appartenant aux lots traités, non satellites, sont autopsiés. Les animaux moribonds et les animaux dans un état de détresse ou de douleur intenses doivent être immédiatement retirés, euthanasiés et autopsiés.

Les examens figurant ci-après seront effectués à l'issue de la période d'essai sur tous les animaux (y compris les témoins):

1. examen hématologique comprenant au moins l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, le dénombre ment des érythrocytes et des leucocytes, la formule leucocytaire ainsi qu'une étude de la coagulation;

2. examen biochimique clinique du sang comprenant au moins un paramètre des fonctions hépatiques et rénales: alanine aminotransférase sérique (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamopyru-vique), aspartate aminotransférase sérique (anciennement connue sous le nom de transaminase glutano-oxaloacétique), urée, albumine, créatinine, bilirubine totale et protéines sériques totales.

D'autres déterminations éventuellement nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate concernent le calcium, le phosphore, les chlorures, le sodium, le potassium, la glycémie à jeun, l'analyse des lipides, les hormones, l'équilibre acido-basique, la méthémoglobine, l'activité cholinestérasique.

▼B

D'autres analyses biochimiques cliniques peuvent, si nécessaire, être effectuées pour approfondir l'étude des effets observés.

1.6.4. **Autopsie**

Tous les animaux soumis à l'essai doivent faire l'objet d'une autopsie macroscopique. Au moins le foie, les reins, les glandes surrénales et les testicules doivent être pesés à l'état humide le plus rapidement possible après la dissection afin d'éviter le dessèchement. Organes et tissus, à savoir, peau normale et traitée, foie, reins, rate, testicules, glandes surrénales, cœur et les organes-cibles (c'est-à-dire ceux qui présentent des lésions importantes ou des modifications de leur volume) doivent être conservés dans un milieu approprié en vue d'éventuels examens histopathologiques ultérieurs.

1.6.5. **Examen histopathologique**

Pour le lot exposé à la dose la plus élevée et le lot témoin, il faut pratiquer un examen histologique systématique de tous les organes et des tissus conservés. Les organes et tissus qui auront présenté des lésions attribuables à la substance à tester à la dose la plus élevée devront être examinés dans tous les lots ayant été exposés à des doses plus faibles. Les animaux de tout lot satellite devront faire l'objet d'un examen histologique particulièrement axé sur les organes et les tissus pour lesquels les lésions ont été constatées dans les lots traités.

2. **DONNÉES**

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, nombre d'animaux au début de l'essai et le nombre d'animaux présentant chaque type de lésion.

Tous les résultats observés doivent être évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. **RÉSULTATS**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

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

— données concernant les animaux (espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.),

— conditions de l'essai, (y compris le type de pansement: occlusif ou non-occlusif),

— doses (avec, le cas échéant, le véhicule) et concentrations,

— dose sans effet, lorsque c'est possible,

— données relatives à la réponse toxique par sexe et par dose,

— indication du moment de la mort en cours d'expérience ou des survies au terme de l'expérience,

— effets toxiques ou autres,

— moment de l'observation de tout symptôme anormal et évolution de celui-ci,

— données relatives à la prise de nourriture et à l'évolution du poids corporel,

— examens hématologiques pratiqués et résultats complets,

▼B

— examens biochimiques cliniques pratiqués et résultats complets,

— résultats d'autopsie,

— description détaillée de tous les résultats histopathologiques,

— traitement statistique des résultats, si possible,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B (point D).

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B (point E).

▼B

B.10. MUTAGÉNICITÉ — ESSAI IN VITRO D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE

1. MÉTHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 473, Essai d'aberration chromosomique in vitro chez les mammifères (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai d'aberration chromosomique in vitro est destiné à détecter les agents qui provoquent des aberrations chromosomiques de structure dans des cellules de mammifère en culture (1) (2) (3). Les aberrations de structure peuvent être de deux types: chromosomiques ou chromatidiennes. La majorité des mutagènes chimiques induisent des aberrations de type chromatidien, mais parfois de type chromosomique. Une augmentation de la fréquence de polyploïdie peut indiquer qu'une substance chimique possède la faculté de provoquer des aberrations du nombre des chromosomes. Cet essai n'est cependant pas conçu pour évaluer les aberrations de nombre et il n'est généralement pas utilisé à cette fin. Les mutations chromosomiques et les événements liés sont à l'origine de beaucoup de maladies génétiques humaines et on a de bonnes raisons de penser que les mutations chromosomiques et événements liés, touchant les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs des cellules somatiques, jouent un rôle dans l'induction de cancers chez l'homme et chez les animaux de laboratoire.

L'essai d'aberration chromosomique in vitro peut être pratiqué sur des cultures de lignées cellulaires établies, des souches cellulaires ou des cultures de cellules primaires. Les cellules utilisées sont choisies en fonction de leur potentiel de croissance en culture, de la stabilité de leur caryotype, du nombre et de la diversité des chromosomes et de la fréquence des aberrations chromosomiques spontanées.

Les essais in vitro requièrent généralement l'utilisation d'une source exogène d'activation métabolique. Ce système d'activation métabolique est incapable de reproduire parfaitement les conditions présentes in vitro chez les mammifères. Il faut éviter absolument d'introduire des conditions qui conduiraient à des résultats positifs ne reflétant pas une mutagénicité intrinsèque et pouvant provenir de modification du pli, de l'osmolalité, ou d'une forte cytotoxicité (4) (5).

Cet essai est utilisé pour le dépistage de substances pouvant être mutagènes et cancérigènes pour les mammifères. Bien que de nombreux composés donnant un résultat positif lors de cet essai soient cancérigènes pour les mammifères, il n'y a pas de corrélation parfaite entre cet essai et la cancérogénicité. La corrélation dépend de la classe chimique mais d'autre part, de plus en plus d'arguments laissent penser qu'il existe des agents cancérigènes que cet essai ne permet pas de détecter parce qu'ils agissent par des mécanismes qui n'impliquent pas des lésions directes de l'ADN.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Aberration de type chromatidien: lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration de type chromosomique: lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur le même site.

▼B

Endoreduplication: processus dans lequel le noyau, après une phase S de implication, n'entre pas en mitose mais commence une autre phase S. Il en résulte des chromosomes avec 4, 8, 16, ... chromatides.

Lacune («**gap**»): lésion achromatique plus petite que la largeur d'une chromatide, avec un défaut d'alignement minimal des chromatides.

Index mitotique: nombre de cellules en métaphase divisé par le nombre total de cellules dans une population une indication de la vitesse de prolifération de cette population.

Aberration de nombre: modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des cellules employées.

Polyploïde: état multiple du nombre de chromosomes haploïdes (*n*), autre que la diploïdie (c'est-à-dire 3*n*, 4*n*, etc.).

Aberration de structure: modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope au stade de la métaphase et se présentant sous la forme de délétions, de cassures, de modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des cultures de cellules sont exposées à la substance d'essai avec et sans activation métabolique. Après avoir été exposées à la substance d'essai, les cultures de cellules sont, à intervalles préétablis, traitées par une substance qui bloque les cellules en métaphase (par exemple de la clochicine ou du Colcemid®), récoltées et teintées. Les cellules en métaphase sont soumises à un examen microscopique afin de déceler les aberrations chromosomiques.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Préparations**

1.4.1.1. *Cellules*

Diverses lignées cellulaires, souches cellulaires ou cultures de cellules primaires, y compris des cellules humaines, peuvent être utilisées (par exemple les fibroblastes de hamster chinois, les lymphocytes du sang périphérique de l'homme ou d'autres mammifères).

1.4.1.2. *Milieu et conditions de culture*

Il convient d'utiliser un milieu de croissance et des conditions d'incubation (récipients de culture, concentration de CO_2, température et degré d'humidité) appropriés pour la croissance cellulaire. La stabilité du nombre modal de chromosomes et l'absence de contamination par des mycoplasmes doivent être vérifiées régulièrement dans les lignées cellulaires établies et les souches cellulaires. En cas de contamination, elles ne doivent pas être utilisées. La durée normale du cycle cellulaire de la lignée cellulaire et les conditions de culture utilisées doivent être connues.

1.4.1.3. *Préparation des cultures*

Lignées et souches cellulaires établies: les cellules sont multipliées à partir de stocks cellulaires, ensemencées dans un milieu de culture à une densité telle que les cultures ne confluent pas avant la récolte, et incubées à 37 °C.

▼B

Lymphocytes: du sang complet traité avec un anticoagulant (héparine, par exemple) ou des lymphocytes isolés issus de donneurs sains sont ajoutés à un milieu de culture contenant un mitogène (par exemple la phytohémagglutinine) et sont incubés à 37 ºC.

1.4.1.4. *Activation métabolique*

Les cellules doivent être exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. Le système le plus couramment utilisé est une fraction postmitochondriale enrichie en cofacteurs (S9), préparée à partir de foie de rongeur traité avec des inducteurs enzymatiques, tels que de l'Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9) ou un mélange de phénobarbitone et de ß-naphthoflavone (10) (11) (12).

La fraction postmitochondriale est généralement utilisée à des concentrations allant de 1 a 10 % v/v dans le milieu de culture final. Le choix du système d'activation métabolique peut dépendre de la classe chimique de la substance d'essai. Dans certains cas il peut être préférable d'utiliser plus d'une concentration de la fraction postmitochondriale.

Plusieurs procédés nouveaux, comme la création par génie génétique de lignées cellulaires exprimant des enzymes activantes spécifiques, sont susceptibles de fournir une activation endogène. Le choix des lignées cellulaires utilisées doit être justifié scientifiquement (par exemple par l'importance de l'isoenzyme du cytochrome P450 pour le métabolisme de la substance d'essai).

1.4.1.5. *Substances d'essai/préparation*

Les substances d'essai solides sont préparées par dissolution ou suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis éventuellement diluées avant le traitement des cellules. Les substances d'essai liquides peuvent être ajoutées directement au système d'essai et/ou diluées avant traitement. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2. **Conditions expérimentales**

1.4.2.1. *Solvant/véhicule*

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas réagir chimiquement avec la substance d'essai ni altérer la survie des cellules et l'activité du mélange S9. L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible. Dans le cas d'essais conduits avec des substances instables dans l'eau, on utilisera des solvants organiques exempts d'eau. L'eau peut être enlevée par addition d'un tamis moléculaire.

1.4.2.2. *Concentrations d'exposition*

La cytotoxicité, la solubilité dans le système d'essai et les modifications de pH et d'osmolalité sont des critères à prendre en considération pour déterminer la dose la plus élevée à utiliser.

La cytotoxicité est mesurée, avec et sans système d'activation métabolique, dans l'expérience principale par un indicateur approprié de l'intégrité et de la croissance cellulaires, tel que le degré de confluence des colonies cellulaires, le nombre de cellules viables ou l'index mitotique. Il peut être utile de déterminer la cytotoxicité et la solubilité lors d'un essai préliminaire.

▼B

Il convient d'utiliser au moins trois concentrations analysables. Dans le cas d'une substance cytotoxique, on utilisera des concentrations qui couvrent un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale, ce qui signifie en général des concentrations séparées par un facteur compris entre 2 et √10 au maximum. La concentration la plus élevée doit entraîner au moment de la récolte, une réduction significative (au moins 50 %) du degré de confluence, du nombre de cellules ou de l'index mitotique. Ce dernier varie dans le temps après le traitement et fournit seulement une mesure indirecte des effets cytotoxiques et cytostatiques. Cependant, l'index mitotique est une mesure acceptable pour des cultures en suspension pour lesquelles d'autres mesures de toxicité peuvent être incommodes ou irréalisables. Des données sur la cinétique du cycle cellulaire, par exemple le temps de génération moyen (TGM), peuvent fournir des compléments d'information. Toutefois, le TGM est une moyenne générale qui ne révèle pas toujours l'existence de «sous-populations en retard»; même de faibles augmentations du temps de génération moyen peuvent conduire à un retard très important du moment où le nombre d'aberrations est optimal.

En ce qui concerne les substances relativement non cytotoxiques, la concentration maximale doit être la plus basse des trois concentrations suivantes: 5 µl/ml, 5 mg/ml ou 0,01 M.

Pour les substances relativement insolubles qui ne sont pas toxiques aux concentrations solubles, la dose la plus élevée à tester doit être une concentration supérieure à la limite de solubilité dans le milieu de culture à la fin de la période de traitement. Dans certains cas (par exemple si la toxicité n'apparaît qu'à des concentrations supérieures à la plus faible concentration insoluble), il est recommandé de tester plusieurs concentrations auxquelles une précipitation est visible. Il peut être utile d'évaluer la solubilité au début et à la fin du traitement, celle-ci pouvant varier au cours de l'exposition dans le système d'essai en raison de la présence de cellules, de S9, de sérum, etc. On conclut à l'insolubilité lorsqu'une précipitation est observée à l'œil nu. Le précipité ne doit pas interférer avec l'évaluation des résultats.

1.4.2.3. *Témoins négatifs et positifs*

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule), avec et sans activation métabolique, doivent être inclus simultanément dans chaque expérience. En présence d'un système d'activation métabolique, la substance utilisée comme témoin positif doit être celle qui exige l'activation pour donner une réponse mutagène.

On utilise comme témoin positif un clastogène connu à des niveaux d'exposition qui conduisent à un accroissement détectable et reproductible par rapport au bruit de fond, démontrant la sensibilité du système d'essai.

Les doses des témoins positifs doivent être choisies de manière que les effets soient nets et que l'identité des lames codées ne soit pas évidente. Quelques exemples de témoins positifs figurent dans le tableau ci-dessous.

Condition d'activation métabolique	Substances	Numéro CAS	Numéro EINECS
En l'absence d'activation métabolique exogène	Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3	200-625-0
	Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7

▼B

Condition d'activation métabolique	Substances	Numéro CAS	Numéro EINECS
	Éthylnitrosourée	759-73-9	212-072-2
	Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
	N-oxyde de 4-nitroquinoléine	56-57-5	200-281-1
En présence d'activation métabolique exogène	Benzo[a]pyrène	50-32-8	200-028-5
	Cyclophosphamide Monohydrate de cyclophosphamidée	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

D'autres témoins positifs appropriés peuvent être utilisés. De plus, l'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique sera envisagé, s'ils sont disponibles.

Le solvant ou le véhicule doit être utilisé seul en tant que témoin négatif dans le même milieu de culture, dans les mêmes conditions que la substance d'essai et pour chaque temps de prélèvement. On utilisera également des témoins non traités, à moins que des essais antérieurs n'aient démontré que le solvant/véhicule choisi n'a pas d'effet délétère ou mutagène.

1.4.3. **Mode opératoire**

1.4.3.1. *Traitement avec la substance d'essai*

Les cellules en prolifération sont traitées avec la substance d'essai en présence et en l'absence de système d'activation métabolique. Le traitement des lymphocytes doit débuter environ 48 heures après la simulation mitogénique.

1.4.3.2. On réalise normalement des cultures dupliquées à chaque niveau de dose. Des cultures dupliquées sont aussi vivement recommandées pour les témoins négatifs (solvant). Si des essais antérieurs ont démontré que la variation entre cultures dupliquées est minime (13) (14), l'utilisation d'une seule culture pour chaque concentration peut être envisagée.

Les substances gazeuses ou volatiles doivent être testées en utilisant des méthodes appropriées, par exemple dans des récipients de culture hermétiquement fermés (15) (16).

1.4.3.3. *Récolte des cultures*

Pour la première expérience, les cellules sont exposées à la substance d'essai pendant 3 à 6 heures, en présence et en l'absence d'activation métabolique. On prélève ensuite des échantillons après un temps correspondant à environ 1,5 fois la durée du cycle cellulaire normal après le début du traitement (12). Si l'essai s'avère négatif, que ce soit avec ou sans activation métabolique, on effectue un essai supplémentaire sans activation. le traitement se poursuivant jusqu'au prélèvement d'échantillons après une période équivalente à environ 1,5 fois la durée du cycle cellulaire normal. Certaines substances peuvent être détectées plus facilement en prolongeant le temps de traitement et de prélèvement au-delà de 1,5 fois la durée du cycle cellulaire. Les résultats négatifs obtenus avec activation métabolique demandent à être confirmés cas par cas. Si la confirmation des résultats négatifs n'est pas jugée nécessaire, une justification doit être fournie.

▼B

1.4.3.4. *Préparation des chromosomes*

Les cultures de cellules sont traitées avec du Colcemid® ou de la colchicine pendant 1 à 3 heures avant la récolte. Chaque culture est récoltée et traitée séparément en vue de la préparation des chromosomes. Celle-ci consiste en un traitement hypotonique, une fixation et une coloration des cellules.

1.4.3.5. *Analyse*

Toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent être codées individuellement avant l'analyse au microscope. Le procédé de fixation provoque souvent la rupture d'une certaine fraction des cellules en métaphase, ce qui entraîne une perte des chromosomes. Pour cette raison, toutes les cellules examinées doivent contenir un nombre de centromères égal au nombre modal ± 2. Pour chaque dose et chaque témoin, il y a lieu d'examiner au moins 200 cellules en métaphase bien étalées et, le cas échéant, réparties de façon égale entre les cultures en double exemplaire. Ce nombre peut être réduit lorsqu'un grand nombre d'aberrations sont observées.

Bien que l'essai soit destiné à détecter les aberrations chromosomiques de structure, il est important de signaler d'éventuels cas de polyploidie et d'endoreduplication.

2. **RÉSULTATS**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

L'unité expérimentale étant la cellule, on détermine le pourcentage de cellules présentant une ou plusieurs aberrations de structure. Une liste des différents types d'aberrations chromosomiques de structure doit être établie avec leur nombre et leur fréquence dans les cultures traitées et les cultures témoins. Les lacunes sont enregistrées séparément et rapportées mais ne sont généralement pas incluses dans la fréquence totale des aberrations.

On indiquera aussi les résultats des mesures concomitantes de cytoxicité pour toutes les cultures traitées et les témoins négatifs dans les principaux essais d'aberration chromosomique.

Les données seront présentées séparément pour chaque culture. En outre, toutes les données doivent être résumées sous tonne de tableaux.

Il n'est pas obligatoire de vérifier une réponse nettement positive. Par contre, les résultats équivoques doivent être clarifiés par un ou des essais supplémentaires, de préférence dans des conditions expérimentales modifiées. La nécessité de confirmer les résultats négatifs est discutée au point 1.4.3.3. Lors des expériences complémentaires, il faut envisager la modification des paramètres de l'étude afin d'élargir l'éventail des conditions évaluées. Les paramètres susceptibles d'être modifiés comprennent l'intervalle entre les niveaux de dose et les conditions d'activation métabolique.

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement lié à la dose ou un accroissement reproductible du nombre de cellules présentant des aberrations. En premier lieu, il s'agir de prendre en considération la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (3) (13) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive.

▼B

Une augmentation du nombre de cellules polyploïdes peut signifier que la substance d'essai est capable d'inhiber les processus mitotiques et d'induire des aberrations de nombre. Une augmentation du nombre de cellules ayant des chromosomes endoredupliqués peut indiquer que la substance d'essai est capable d'inhiber la progression du cycle cellulaire (17) (18).

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans de rares cas l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas de conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs à l'essai d'aberration chromosomique in vitro indiquent que la substance d'essai induit des aberrations chromosomiques de structure dans des cellules somatiques de mammifère en culture. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions expérimentales, la substance d'essai n'induit pas d'aberration chromosomique dans des cellules somatiques de mammifère en culture.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule:

— justification du choix du véhicule,

— solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Cellules:

— type et source des cellules,

— données sur le caryotype et raisons du choix du type cellulaire utilisé,

— absence de mycoplasme, le cas échéant,

— données concernant le cycle cellulaire,

— sexe des donneurs de sang, sang complet ou lymphocytes isolés, mitogène utilisé,

— nombre de repiquages, le cas échéant,

— méthodes d'entretien des cultures cellulaires, le cas échéant,

— nombre modal de chromosomes.

Conditions de l'essai:

— identité de l'inhibiteur de 1a métaphase, sa concentration et la durée d'exposition des cellules,

— justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris des données relatives à la cytotoxicité et aux limites de solubilité, si elles sont disponibles,

— composition du milieu et, le cas échéant, la concentration de CO_2,

▼B

— concentration de la substance d'essai,

— volume de véhicule et de substances d'essai ajouté,

— température d'incubation,

— temps d'incubation,

— durée du traitement,

— densité cellulaire au moment de l'ensemencement, si nécessaire,

— type et composition du système d'activation métabolique, y compris les critères d'acceptabilité,

— témoins positifs et négatifs,

— méthodes de préparation des lames,

— critères de dénombrement des aberrations,

— nombre de métaphases analysées,

— méthodes de mesure de la toxicité,

— critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque.

Résultats:

— signes de toxicité (degré de confluence, données sur le cycle cellulaire, comptage des cellules, index mitotique),

— signes de précipitation,

— données sur le pH et l'osmolalité du milieu de traitement, si elles ont été déterminées,

— définition appliquée aux aberrations, y compris les lacunes,

— nombre de cellules présentant des aberrations chromosomiques et type d'aberration, séparément pour chaque culture traitée et culture témoin,

— changements de la ploïdie, le cas échéant,

— relation dose-réponse, si possible.

— analyses statistiques, le cas échéant,

— données concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs concomitants,

— données historiques concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs (étendues, moyennes, écarts-types).

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: *Chemical mutagens. Princi-ples and Methods for their Detection*. Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London. pp. 1-29.

(2) Ishidate. M. jr. and Sofuni, T. (1985), The In Vitro Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hams ter Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in: *Progress in Mutation Research*, Vol. 5. Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 427-432.

▼B

(3) Galloway, S. M.. Armstrong, M. J., Reuben, C, Colman, S., Brown, 13., Cannon, C, Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Kimpo, j., iviargolin, c. H., Resnick, M. A., Andersen. G. and Zeiger, E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environs. Molec. Mulogen 10* (suppl. 10), pp. 1-175.

(4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from 1CPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147-204.

(5) Monta, T., Nagaki, T., Fukuda. I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Res.*, 268. pp. 297-305

(6) Ames. B. N., McCann. J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.

(7) Maron. D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113. pp. 17 3-215.

(8) Natarajan, A. T., Tates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System In Vitro, J. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res.*, 37, pp. 83-90.

(9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix In Vitro, *Mutation Res.*, 66, pp. 277-290.

(10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclar 1254-induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.

(11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F. J., Fonts, J. R., Berid, J. R. and Philpot, R. M. (eds), In Vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(12) Galloway, S. M., Aardema. M. J., Ishidate, M. Jr., Iven, J. L., Kirkland, D. J., Morita, T., Mosesso. P., Sofuni, T. (1994), Report from Working Group on in In Vitro Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.*, 312. pp. 241-261.

(13) Richardson, C, Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989). Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for In Vitro Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. *Mutation Res.*, 312, pp. 139-149.

(15) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L, Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.

▼B

(16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.

(17) Locke-Huhlc, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119. pp. 403-413

(18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364.

▼B

B.11. MUTAGÉNICITÉ — ESSAI IN VIVO D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR MOELLE OSSEUSE DE MAMMIFÈRE

1. MÉTHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 475, Essai d'aberration chromosomique sur moelle osseuse de mammifères (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai in vivo d'aberration chromosomique est destiné à identifier les agents qui provoquent des aberrations chromosomiques de structure dans des cellules de moelle osseuse d'animaux, généralement des rongeurs (1, 2, 3, 4). Les aberrations de structure peuvent être de deux types: chromosomiques ou chromatidiennes. Une augmentation de la fréquence de polyploïdie peut indiquer qu'une substance chimique possède la faculté de provoquer des aberrations du nombre des chromosomes. La majorité des mutagènes chimiques induisent des aberrations de type chromatidien, mais parfois de type chromosomique. Les mutations chromosomiques et les événements connexes sont à l'origine de beaucoup de maladies génétiques humaines et on a de bonnes raisons de penser que les mutations chromosomiques et événements connexes, touchant les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs des cellules somatiques, jouent un rôle dans l'induction de cancers chez l'homme et chez les animaux de laboratoire.

Les rongeurs sont couramment utilisés dans cet essai. Cet essai se pratique sur la moelle osseuse parce que c'est un tissu très vascularisé, formé d'une population de cellules au cycle rapide et faciles à prélever et traiter. D'autres espèces et tissus cibles ne font pas l'objet de cette méthode.

Cet essai d'aberration chromosomique se prête particulièrement bien à l'évaluation du risque mutagène, en ce sens qu'il permet de prendre en compte des facteurs de métabolisme in vivo, de pharmacocinétique et de processus de réparation de l'ADN. Ces facteurs peuvent cependant varier d'un animal à un autre et d'un tissu à un autre. Un essai in vivo est aussi utile pour vérifier un effet mutagène détecté par un essai in vitro.

On n'aura pas recours à cet essai s'il est manifeste que la substance d'essai ou un métabolite réactif n'atteindra pas le tissu cible.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Aberration de type chromatinien: lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration de type chromosomique: lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur le même site.

Endoreduplication: processus dans lequel le noyau, après une phase S de réplication, n'entre pas en mitose mais commence une autre phase S. Il en résulte des chromosomes avec 4, 8, 16, ... chromatides.

Lacune: lésion achromatique inférieur à la largeur d'une chromatide avec un défaut d'alignement minimal des chromatides.

Aberration de nombre: modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des cellules employées.

▼B

Polyploïdie: état multiple du nombre de chromosomes haploïdes (*n*), autre que la diploïdie (c'est-à-dire 3*n*, 4*n*, etc.).

Aberration de structure: modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope au stade de la métastase et se présentant sous la forma de délétions, de cassure, de modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Les animaux sont exposés à la substance d'essai par une voie d'exposition appropriée et sont sacrifiés à des moments appropriés après le traitement. Avant le sacrifice, les animaux sont traités avec une substance qui bloque les cellules en métaphase (par exemple de la colchicine ou du Colcemid®). Ensuite, les préparations chromosomiques réalisées à partir des cellules de moelle osseuse sont colorées, et les cellules en métaphase sont examinées en vue de la mise en évidence d'aberrations chromosomiques.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Préparations**

1.4.1.1. *Sélection des espèces, animales*

Bien que le rat, la souris et le hamster chinois soient habituellement utilisés, n'importe quelle espèce de mammifère appropriée peut être utilisée. Il convient d'utiliser des animaux adultes, jeunes et sains issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Au début de l'étude, la différence pondérale entre les animaux doit être minimale et ne pas dépasser ± 20 % du poids moyen de chaque sexe.

1.4.1.2. *Conditions d'encagement et régime alimentaire*

Les conditions générales décrites dans l'introduction générale de la partie B sont appliquées mais le taux d'humidité devrait se situer aux environs de 50-60 %.

1.4.1.3. *Préparation des animaux*

Les animaux sont répartis par randomisation entre les groupes témoins et les groupes traités. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effet dû à leur emplacement. Les animaux sont identifiés individuellement. Ils sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours.

1.4.1.4. *Préparation des doses*

Les substances d'essai solides sont dissoutes ou mises en suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis si nécessaire diluées avant d'être administrées aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2. **Conditions expérimentales**

1.4.2.1. *Solvant/véhicule*

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas avoir d'effet toxique aux doses utilisées ni présenter de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données sur leur compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible.

▼B

1.4.2.2. *Témoins*

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule) doivent être inclus pour chaque sexe et dans chaque essai. Les animaux des groupes témoins doivent être manipulés exactement comme ceux des groupes traités, mise à part l'administration de la substance d'essai.

Les témoins positifs doivent produire des aberrations chromosomiques de structure in vivo à des niveaux d'exposition supposés provoquer un accroissement détectable par rapport au bruit de fond. Les doses de témoin positif doivent être choisies afin que les effets soient évidents mais que l'identité des lames codées ne soit pas révélée immédiatement à l'examinateur. Le témoin positif peut être administré par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai et un seul prélèvement d'échantillon peut suffire. L'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, s'ils sont disponibles. Les substances indiquées dans le tableau ci-dessous sont des exemples de témoins positifs.

Substance	Numéro CAS	Numéro Einecs
Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
Éthylnitrosourée	759-73-9	212-072-2
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamide Monohydrate de cyclophosphamide	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Triéthylènemélamine	51-18-3	200-083-5

Lors de chaque prélèvement, il faut inclure un lot d'animaux témoins négatifs traités seulement avec le solvant ou le véhicule et par ailleurs manipulés de la même façon que les groupes traités. Ceci peut être évité si l'on dispose de données acceptables sur la variabilité interindividuelle et la fréquence spontanée de cellules comportant des aberrations chromosomiques provenant de témoins historiques. Dans le cas où un seul prélèvement est effectué pour les témoins négatifs, le premier temps de prélèvement est le plus approprié. En outre, des témoins non traités doivent aussi être inclus, à moins que des données historiques ne démontrent que le solvant/véhicule choisi n'induit aucun effet délétère ou mutagène.

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Nombre et sexe des animaux**

Chaque groupe traité et groupe témoin doit comprendre au moins cinq animaux analysables par sexe. Si, au moment de l'étude, on dispose de données historiques sur la même espèce et avec la même voie d'administration démontrant l'absence de différence notable de toxicité entre les sexes, la réalisation de l'essai sur un seul sexe est acceptable. Si l'exposition humaine est spécifique du sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, des animaux du sexe approprié doivent être utilisés pour l'essai.

1.5.2. **Modalité de traitement**

Il est préférable d'administrer la substance d'essai en une seule fois. Elle peut aussi être administrée en doses fractionnées (deux doses le même jour avec un intervalle de quelques heures au maximum) afin que l'administration d'un grand volume soit plus aisée. D'autres modalités de traitement sont acceptables s'ils sont scientifiquement justifiés.

▼B

Les échantillons sont prélevés après le traitement à deux moments différents de la même journée. Pour les rongeurs, le premier prélèvement après le traitement est effectué après une période de 1,5 fois la durée normale du cycle cellulaire (généralement de 12 à 18 heures). Étant donné que le temps requis par l'absorption et le métabolisme de la substance d'essai ainsi que l'effet de celle-ci sur la cinétique du cycle cellulaire peuvent influer sur le moment optimal de détection des aberrations, on recommande d'effectuer un autre prélèvement 24 heures après le premier. Si le traitement s'étend sur plus d'une journée, le prélèvement doit avoir lieu après une période de 1,5 fois la durée normale du cycle cellulaire après la dernière administration.

Avant d'être sacrifiés, les animaux reçoivent une dose appropriée d'une substance qui bloque les cellules en métaphase (par exemple du Colcemid® ou de la colchicine) par injection intrapéritonéale. Les prélèvements sont effectués après une période appropriée, qui est de 3 à 5 heures pour la souris et de 4 à 5 heures pour le hamster chinois. Les cellules sont prélevées de la moelle osseuse et analysées en vue de la détection d'aberrations chromosomiques.

1.5.3. **Niveaux de dose**

Si une étude préliminaire est réalisée afin d'évaluer les niveaux de dose requis, cette étude doit être effectuée dans le même laboratoire en utilisant la même espèce, la même souche, des animaux du même sexe et la même modalité de traitement que ceux de l'étude principale (5). En cas de toxicité, on utilise trois niveaux de dose pour le premier prélèvement. Ces niveaux de dose doivent couvrir un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale. Pour les prélèvements suivants, seule la dose la plus élevée est utilisée. Celle-ci est définie comme la dose qui produit des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes, administrées selon les mêmes modalités, seraient létales. Les substances possédant une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les mitogènes) peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évaluées cas par cas. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans la moelle osseuse (par exemple une diminution de plus de 50 % de l'index mitotique).

1.5.4. **Test limite**

Si un essai réalisé avec au moins 2 000 mg/kg de poids corporel, en une seule dose ou en deux doses administrées le même jour, n'engendre aucun effet toxique observable et si une génotoxicité est improbable d'après les données relatives à des substances de structure voisine, on peut considérer qu'une étude complète avec trois niveaux de doses n'est pas nécessaire. Pour les études de plus longue durée, la dose limite est de 2 000 mg/kg de poids corporel par jour dans le cas d'un traitement d'une durée allant jusqu'à 14 jours et de 1 000 mg/kg de poids corporel par jour pour les études plus longues. Suivant l'importance de l'exposition humaine probable, on peut envisager d'utiliser des doses plus fortes dans l'essai de dose limite.

1.5.5. **Voies d'administration**

La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation adaptée, ou par injection intrapéritonéale. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles peuvent être justifiées. Le volume maximal de liquide administré en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 2 ml/100g de poids corporel. Une justification doit être fournie si des volumes plus importants sont administrés. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

▼B

1.5.6. **Préparation des chromosomes**

La moelle osseuse est extraite immédiatement après le sacrifice, exposée à une solution hypotonique et fixée. Les cellules sont alors étalées sur des lames et colorées.

1.5.7. **Analyse**

L'index mitotique sert de mesure de la cytotoxicité et doit être déterminé sur un minimum de 1 000 cellules pour chaque animal traité (y compris les témoins positifs) et pour chaque témoin négatif non traité.

L'analyse des aberrations chromosomiques doit porter sur au moins 100 cellules de chaque animal. Ce nombre peut être réduit lorsque les aberrations observées sont nombreuses. Toutes les lames, y compris celles des témoins négatifs et positifs, doivent être codées indépendamment avant l'analyse au microscope. Comme le procédé de fixation provoque souvent la rupture d'une certaine fraction des cellules en métaphase, entraînant une perte de chromosomes, toutes les cellules examinées doivent contenir un nombre de centromères égal à $2n \pm 2$.

2. **RÉSULTATS**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. L'unité expérimentale est l'animal. Pour chaque animal, on indiquera le nombre de cellules examinées et on évaluera le nombre d'aberrations par cellule ainsi que le pourcentage de cellules présentant une ou plusieurs aberrations de structure. Les différents types d'aberrations chromosomiques de structure doivent être consignés avec leur nombre et leur fréquence pour les groupes traités et les groupes témoins. Les lacunes sont enregistrées séparément et rapportées mais ne sont généralement pas incluses dans la fréquence totale des aberrations. S'il n'y a pas de différence de réponse entre sexes, les données des deux sexes peuvent être combinées dans l'analyse statistique.

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement dose-dépendant du nombre relatif de cellules présentant des aberrations ou une augmentation nette du nombre de cellules présentant des aberrations dans un seul groupe traité à un seul temps de prélèvement. En premier lieu, il s'agit de déterminer la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (6) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées.

Une augmentation du nombre de cellules polyploïdes peut signifier que la substance d'essai est capable d'induire des aberrations de nombre. Une augmentation du nombre de cellules présentant des chromosomes endoreduplicués peut indiquer que la substance d'essai est capable d'inhiber la progression du cycle cellulaire (7) (8).

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

▼B

Bien que la plupart des essais donneront des résultats manifestement positifs ou négatifs, dans de rares cas l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas de conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs obtenus dans cet essai in vivo d'aberration chromosomique indiquent qu'une substance induit des aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse de l'espèce testée. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, la substance testée n'induit pas d'aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse de l'espèce testée.

Le fait que la substance d'essai ou ses métabolites atteignent la circulation générale ou spécifiquement le tissu cible (toxicité systémique) doit être discuté.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule:

— justification du choix du véhicule,

— solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience:

— espèce/souche utilisée,

— nombre, âge et sexe des animaux,

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids individuel des animaux au début de l'essai, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart-type dans chaque groupe.

Conditions expérimentales:

— données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule),

— résultats de l'étude de détermination des doses utiles, si elle a été réalisée,

— justification du choix des doses employées,

— détails concernant la préparation de la substance d'essai,

— détails concernant l'administration de la substance d'essai,

— justification du choix de la voie d'administration,

— méthodes pour vérifier que la substance a atteint la grande circulation ou le tissu cible, le cas échéant,

— conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai dans l'eau de boisson ou la nourriture en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu,

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau,

— description détaillée des modalités de traitement et de prélèvement,

— méthodes de mesure de la toxicité,

▼B

— nature et concentration de l'inhibiteur du fuseau mitotique et durée du traitement,

— méthodes de préparation des lames,

— critères de dénombrement des aberrations,

— nombre de cellules analysées par animal,

— critères de décision concernant les résultats positifs, négatifs et équivoques.

Résultats:

— signes de toxicité,

— index mitotique,

— type et nombre d'aberrations, séparément pour chaque animal,

— nombre total d'aberrations par groupe, moyennes et écarts-types,

— nombre de cellules présentant des aberrations par groupe, moyennes et écarts-types,

— changements de la ploïdie, le cas échéant,

— relation dose-réponse, si possible,

— analyses statistiques, le cas échéant,

— données concernant les témoins négatifs concomitants,

— données concernant les témoins négatifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types),

— données concernant les témoins positifs concomitants.

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Adler, J. D. (1984), Cytogenctic Tests in Mammals, in: *Mutagenidty Testing: a Practical Approach.* S. Vcnitt and J. M. Parry (eds.). IRL Press, Oxford, Washington D. C, pp. 275-306.

(2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian In Vivo Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.*, 189, 157-165.

(3) Richold, M.. Chandly, A., Ashby, J., Gatehouse D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(4) Tice, R. R. Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirch-Volders, M, Oleson Jr., F. B., Paccierotti, F., Preston R. J., Romagna F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the In Vivo Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation Res.*, 312, pp. 305-312.

(5) Fielder, R. J., Alleen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A.. Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson- Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK, Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.

▼B

(6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Pap- worth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D. J. Kirkland, (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.

(8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1363-1364.

▼B

B.12. MUTAGÉNICITÉ — ESSAI IN VIVO DU MICRONOYAU SUR ÉRYTHROCYTES DE MAMMIFÈRE

1. MÉTHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 474, Test du micronoyau sur les érythrocytes de mammifère (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai du micronoyau in vivo sur des cellules de mammifère est pratiqué en vue de détecter des lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique d'érythroblastes résultant de l'action d'une substance d'essai. Il repose sur l'analyse d'érythrocytes prélevés dans la moelle osseuse et/ou dans le sang périphérique d'animaux, généralement des rongeurs.

L'essai du micronoyau est destiné à identifier les substances qui provoquent les lésions cytogénétiques se traduisant par la formation de micronoyaux contenant des fragments de chromosomes ou des chromosomes entiers.

Lorsqu'un érythroblaste de moelle osseuse se transforme en érythrocyte polychromatique, le noyau principal est expulsé et chaque micronoyau qui s'est formé peut subsister dans le cytoplasme anucléé. La visualisation des micronoyaux est facilitée par l'absence du noyau principal. Un accroissement de la fréquence des micronoyaux dans les érythrocytes polychromatiques des animaux traités est le signe d'une lésion chromosomique induite.

La moelle osseuse des rongeurs est couramment utilisée dans cet essai, les érythrocytes polychromatiques étant produits dans ce tissu. Le comptage des érythrocytes (polychromatiques) immatures micronucléés dans le sang périphérique est également acceptable chez toute espèce où l'on a démontré l'incapacité de la rate à éliminer les érythrocytes micronucléés ou qui présente une sensibilité suffisante pour permettre la détection des agents provoquant des aberrations chromosomiques de structure ou de nombre. Plusieurs critères permettent de distinguer les micronoyaux. Un de ces critères est la détection de la présence ou de l'absence dans les micronoyaux d'un centromère ou d'ADN centromérique. La fréquence des érythrocytes immatures (polychromatiques) micronucléés est le principal critère. Quand les animaux sont traités en continu pendant quatre semaines ou plus, on peut également rechercher dans le sang périphérique la proportion des érythrocytes matures (normochromatiques) contenant des micronoyaux par rapport à un nombre donné d'érythrocytes matures.

Cet essai in vivo du micronoyau pratiqué sur des érythrocytes de mammifère se prête particulièrement bien à l'évaluation des risques mutagènes, en ce sens qu'il permet de prendre en compte des facteurs du métabolisme in vivo, de pharmacocinétique et des processus de réparation de l'ADN, malgré la variabilité de ces facteurs en fonction de l'espèce, du tissu et de l'effet génétique recherché. Un essai in vivo sert aussi à vérifier un effet mutagène détecté dans un système in vitro.

On n'aura pas recours à cet essai s'il est manifeste que la substance d'essai ou un métabolite réactif n'atteindra pas le tissu cible.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

Centromère: portion d'un chromosome qui au cours de la division cellulaire est lié aux fibres du fuseau mitotique permettant un mouvement ordonné des chromosomes filles vers les pôles des cellules filles.

Micronoyau: petit noyau, présent en plus du noyau principal des cellules et séparé de celui-ci, produit pendant la télophase de la mitose (méiose) par des chromosomes ou des fragments de chromosomes retardataires.

Érythrocyte normochromatique: érythrocyte mature dépourvu de ribosomes et pouvant être distingué des érythrocytes immatures polychromatiques à l'aide de substances colorant sélectivement les ribosomes.

Érythrocyte polychromatique: érythrocyte immature se trouvant à un stade de développement intermédiaire, qui renferme encore des ribosomes et peut ainsi être distingué des érythrocytes matures normochromatiques à l'aide de substances colorant sélectivement les ribosomes.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Les animaux sont exposés à la substance d'essai par une voie d'exposition appropriée. Si on utilise la moelle osseuse, les animaux sont sacrifiés à des moments appropriés après le traitement, la moelle est extraite, préparée sur des lames et colorée (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Lorsqu'on utilise le sang périphérique, ce dernier est prélevé à des moments appropriés après le traitement, les cellules sanguines sont étalées sur des lames et colorées (4) (8) (9) (10). En cas d'essai sur cellules du sang périphérique, il faut recueillir les cellules aussi rapidement que possible après la dernière exposition. Les lames préparées sont soumises à une analyse en vue de la détection de micronoyaux.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Préparations**

1.4.1.1. *Sélection des espèces animales*

L'utilisation de souris ou de rats est recommandée en cas d'essai sur moelle osseuse, bien que n'importe quelle espèce de mammifère appropriée puisse être employée. Si l'essai porte sur le sang périphérique, on recommande d'utiliser des souris. Il est toutefois possible d'utiliser n'importe quelle espèce de mammifère appropriée, à condition que sa rate n'élimine pas les érythrocytes micronucléés ou que sa sensibilité soit suffisante pour permettre la détection d'agents qui provoquent des aberrations chromosomiques de structure ou de nombre. Il convient d'utiliser des animaux adultes, jeunes et sains issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Au début de l'étude, la différence pondérale entre les animaux ne doit pas dépasser ± 20 % du poids moyen de chaque sexe.

1.4.1.2. *Conditions d'encagement et régime alimentaire*

Les conditions générales décrites dans l'introduction générale de la partie B sont appliquées mais le taux d'humidité devrait se situer aux environs de 50-60 %.

▼B

1.4.1.3. *Préparations des animaux*

Les animaux sont répartis par randomisation entre les groupes témoins et les groupes traités. Les animaux sont identifiés individuellement. Ils sont gardés dans leur cage pendant au moins cinq jours avant le début de l'étude, de façon à les acclimater aux conditions du laboratoire. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effet dû à leur emplacement.

1.4.1.4. *Préparation des doses*

Les substances d'essai solides sont dissoutes ou mises en suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis éventuellement diluées avant d'être administrées aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2. **Conditions expérimentales**

1.4.2.1. *Solvant/véhicule*

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas avoir d'effet toxique aux doses utilisées ni présenter de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données faisant état de leur compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible.

1.4.2.2. *Témoins*

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule) doivent être inclus pour chaque sexe et chaque essai. Les animaux des groupes témoins sont manipulés exactement comme ceux des groupes traités, mise à part l'administration de la substance d'essai.

Les témoins positifs doivent produire des micronoyaux in vivo à des niveaux d'exposition supposés conduire à un accroissement détectable par rapport au bruit de fond. Les doses de témoin positif doivent être choisies de façon que les effets soient nets et que l'identité des lames codées ne soit pas révélée immédiatement à l'examinateur. Le témoin positif peut être administré par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai et un seul prélèvement d'échantillon peut suffire. En outre, l'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, s'ils sont disponibles. Les substances indiquées dans le tableau ci-dessous sont des exemples de témoins positifs.

Substance	Numéro CAS	Numéro Einecs
Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
N-éthyl N-nitrosourée	759-73-9	212-072-2
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamide Monohydrate de cyclophosphamide	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Triéthylènemélamine	51-18-3	200-083-5

▼B

Lors de chaque prélèvement, il faut inclure un lot d'animaux témoins négatifs traités seulement avec le solvant ou le véhicule et par ailleurs manipulés de la même façon que les groupes traités. Ceci peut être évité si l'on dispose de données acceptables sur la variabilité interindividuelle et la fréquence spontanée de cellules comportant des micronoyaux provenant de témoins historiques. Dans le cas où un seul prélèvement est effectué pour les témoins négatifs, le premier temps de prélèvement est le plus approprié. En outre, des témoins non traités doivent aussi être inclus, à moins que des données historiques ne démontrent que le solvant/véhicule choisi n'induit aucun effet délétère ou mutagène.

Si le sang périphérique est utilisé, un échantillon prélevé avant le traitement peut aussi tenir lieu de témoin négatif, mais uniquement dans les études de courte durée sur sang périphérique (par exemple 1 à 3 traitements) lorsque les résultats se situent dans l'intervalle auquel on peut s'attendre sur la base de données historiques.

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Nombre et sexe des animaux**

Chaque groupe traité et groupe témoin doit comprendre au moins cinq animaux analysables par sexe (11). Si, au moment de l'étude, on dispose de données d'études antérieures effectuées avec la même espèce et ayant utilisé la même voie d'administration, qui démontrent l'absence de différence importante de toxicité entre les sexes, il suffit d'effectuer l'essai avec des animaux d'un seul sexe. Si l'exposition humaine est spécifique du sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, des animaux du sexe approprié doivent être utilisés pour l'essai.

1.5.2. **Modalité de traitement**

Aucune modalité particulière de traitement (un, deux ou davantage de traitements à intervalles de 24 heures) ne peut être recommandée. Les prélèvements qui proviennent d'une étude avec des procédures d'administration prolongées sont acceptables si l'essai est positif ou, pour les essais négatifs, si un effet toxique est observé ou que la dose limite a été employée et que la substance a été administrée jusqu'au moment du prélèvement. La substance d'essai peut aussi être administrée en doses fractionnées (deux doses le même jour avec un intervalle de quelques heures au maximum) afin que l'administration d'un grand volume soit plus aisée.

L'essai peut être effectué de deux façons:

a) La substance d'essai est administrée en une seule fois aux animaux. Des échantillons de moelle osseuse sont prélevés au moins deux fois, jamais avant 24 heures et pas au-delà de 48 heures après le traitement et à un intervalle approprié. Des prélèvements effectués moins de 24 heures après le traitement doivent avoir une justification. Les échantillons de sang périphérique sont prélevés au moins deux fois jamais avant 36 heures et pas au-delà de 72 heures après le traitement et à un intervalle approprié. Si une réponse positive est observée lors d'un prélèvement, il n'est pas nécessaire de procéder à un autre prélèvement.

▼B

b) Dans le cas où deux doses ou plus sont administrées (par exemple deux doses ou plus à intervalle de 24 heures), les échantillons de moelle osseuse doivent être prélevés une seule fois entre 18 et 24 heures après le dernier traitement, et ceux de sang périphérique une seule fois entre 36 et 48 heures après le dernier traitement (12).

Des temps de prélèvements supplémentaires peuvent être envisagés si nécessaire.

1.3.3. **Niveaux de dose**

Si une étude préliminaire est réalisée afin d'évaluer les niveaux de dose requis, cette étude doit être effectuée dans le même laboratoire en utilisant la même espèce, la même souche, des animaux du même sexe et la même modalité de traitement que ceux de l'étude principale (13). En cas de toxicité, on utilise trois niveaux de dose pour le premier prélèvement. Ces niveaux de doses doivent couvrir un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale. Pour les prélèvements suivants, seule la dose la plus élevée est utilisée. Celle-ci est définie comme la dose qui produit des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes, administrées selon les mêmes modalités, seraient létales. Les substances possédant une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les mitogènes) peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évaluées cas par cas. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans la moelle osseuse (par exemple une diminution de la proportion d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes dans la moelle osseuse ou le sang périphérique).

1.5.4. **Test limite**

Si un essai réalisé avec au moins 2 000 mg/kg de poids corporel, en une seule dose ou en deux doses administrées le même jour, n'engendre aucun effet toxique observable et si une génotoxicité est improbable d'après les données relatives à des substances de structure voisine, on peut considérer qu'une étude complète avec trois niveaux de doses n'est pas nécessaire. Pour les études de plus longue durée, la dose limite est de 2 000 mg/kg de poids corporel par jour dans le cas d'un traitement d'une durée allant jusqu'à 14 jours et de 1 000 mg/kg de poids corporel par jour pour les études plus longues. Suivant l'importance de l'exposition humaine probable, on peut envisager d'utiliser des doses plus fortes dans l'essai de dose limite.

1.5.5. **Voie d'administration**

La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide dune sonde gastrique ou d'une canule d'intubation adaptée, ou par injection intrapéritonéale. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles peuvent être justifiées. Le volume maximal de liquide administré en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 2 ml/100 g de poids corporel. Une justification doit être fournie si des volumes plus importants sont administrés. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

▼B

1.5.6. **Préparation de la moelle osseuse et du sang**

Les cellules de moelle osseuse sont généralement prélevées dans le fémur ou le tibia immédiatement après le sacrifice. Les cellules sont extraites, préparées et colorées suivant des méthodes bien établies. Le sang périphérique est prélevé dans la veine caudale ou un autre vaisseau sanguin approprié. On effectue immédiatement une coloration supravitale des cellules sanguines (8) (9) (10) ou des frottis qui sont ensuite colorés. L'emploi d'un colorant spécifique de l'ADN [par exemple, l'organe d'acridine (14) ou Hoechst 33258 plus pyronine-Y (15)] peut éliminer une partie des artefacts dus à l'utilisation d'un colorant non spécifique de l'ADN. Cet avantage n'exclut pas l'emploi de colorants classiques (Giemsa, par exemple). D'autres méthodes, telles que celle basée sur l'emploi de colonnes de cellulose pour enlever les cellules nucléées (16), peuvent être utilisées à condition que leur efficacité pour la préparation de micronoyaux dans le laboratoire ait été prouvée.

1.5.7. **Analyse**

Le pourcentage d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes (immatures + matures) est déterminé pour chaque animal en comptant au moins 200 érythrocytes dans le cas de la moelle osseuse et 1 000 érythrocytes dans le cas du sang périphérique (17). Toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent êtres codées indépendamment avant l'analyse au microscope. L'incidence des érythrocytes immatures micronucléés est déterminée sur la base de l'examen d'au moins 2 000 érythrocytes immatures par animal. On peut obtenir des informations supplémentaires en recherchant la présence de micronoyaux dans les érythrocytes matures. A l'examen des lames, le pourcentage d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes ne doit pas être inférieur à 20 % de la valeur des témoins. Lorsque les animaux sont traités en continu pendant 4 semaines ou davantage, on peut aussi examiner au moins 2 000 érythrocytes matures par animal pour déterminer l'incidence des érythrocytes matures micronucléés. Des systèmes d'analyse automatisée (analyse d'images et cytométrie de flux pour cellules en suspension) peuvent remplacer des techniques manuelles s'ils sont justifiés et validés.

2. **RÉSULTATS**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. L'unité expérimentale est l'animal. Le nombre d'érythrocytes immatures examinés, le nombre d'érythrocytes immatures micronucléés et le nombre d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes doivent être présentés séparément pour chaque animal analysé. Lorsque les animaux sont traités en continu pendant quatre semaines ou davantage, il convient de fournir également les données relatives aux érythrocytes matures, si elles ont été recueillies. Le pourcentage d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes et, si cela est jugé pertinent, le pourcentage d'érythrocytes micronucléés seront indiqués pour chaque animal. S'il n'y a pas de différence de réponse entre sexes, les données des deux sexes peuvent être combinées dans l'analyse statistique.

▼B

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment une augmentation, dose-dépendante, du nombre de cellules micronucléées ou une augmentation nette du nombre de cellules micronucléées dans un seul groupe traité à un seul temps de prélèvement. En premier lieu, il s'agit de déterminer la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (18) (19) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées.

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas un jugement catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs obtenus dans cet essai in vivo du micronoyau indiquent que la substance induit la formation de micronoyaux qui résultent de lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique dans les érythroblastes de l'espèce testée. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai la substance testée n'induit pas la formation de micronoyaux dans les érythrocytes immatures de l'espèce testée.

Le fait que la substance d'essai ou ses métabolites atteignent la circulation générale ou spécifiquement le tissu cible (toxicité systématique) doit être discute.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule:

— justification du choix du véhicule,

— solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience:

— espèce/souche utilisée,

— nombre, âge et sexe des animaux,

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids individuel des animaux au début de l'essai, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart-type dans chaque groupe.

Conditions expérimentales:

— données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule),

— résultats de l'étude de détermination des doses utiles, si elle a été réalisée,

▼B

— justification du choix des doses employées,

— détails concernant la préparation de la substance d'essai,

— détails concernant l'administration de la substance d'essai,

— justification du choix de la voie d'administration,

— méthodes pour vérifier que la substance a atteint la circulation générale ou le tissu cible, le cas échéant,

— conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai dans l'eau de boisson ou la nourriture en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu,

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau,

— description détaillée des modalités de traitement et de prélèvement,

— méthodes de préparation des lames,

— méthodes de mesure de la toxicité,

— critères de dénombrement des érythrocytes immatures micronuclées,

— nombre de cellules analysées par animal,

— critères de décision concernant les résultats positifs, négatifs et équivoques.

Résultats:

— signes de toxicité,

— proportion d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes,

— nombre d'érythrocytes immatures micronuclées, donné séparément pour chaque animal,

— moyenne ± écart-type des érythrocytes micronuclées immatures par groupe,

— relation dose-réponse, si possible,

— analyses et méthodes statistiques appliquées,

— données concernant les témoins négatifs concomitants et antérieurs,

— données concernant les témoins positifs concomitants.

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid In Vivo Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, pp. 187-190.

(2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 9-15.

(3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin. K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.*, 123, pp. 61-118.

(4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C, Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The In Vivo Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, pp. 29-80.

▼B

(5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N., and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytcs: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp. , 555-558.

(6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C, Salamone, M. F., Tice, R. R. and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, pp. 103-112.

(7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., and Shelby, M. E. (1990), The in vivo Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 14, pp. 513-522.

(8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, pp. 245-249.

(9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/ JEMMS, MMS, *Mutation Res.*, 278, pp. 83-98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 153-159.

(11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), in vivo, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, pp. 293-304.

(12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 16 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*. 10, pp. 313-319.

(13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in in vivo Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.

(14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, pp. 241-247.

(15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 3 3258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, pp. 269-275.

(16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 211, pp. 91-104.

(17) Gollapudi. B. and McFadden. L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 347, pp. 97-99.

▼B

(18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), In vivo Cytogenetics Assay, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity tests. L/KEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report, Part 1. revised*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(19) Lovell. D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of In vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

▼B

B.13/14. **MUTAGÉNICITÉ — ESSAI DE MUTATION RÉVERSE SUR BACTÉRIES**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 471, Essai de mutation réverse sur des bactéries (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai bactérien de mutation réverse est pratiqué sur des souches de *Salmonella typhimurium* et d'*Escherichia coït* auxotrophes à l'égard d'un acide aminé. Il sert à détecter des mutations ponctuelles résultant de la substitution, de l'addition ou de la délétion d'une ou de plusieurs paires de base de l'ADN (1) (2) (3). Le principe de cet essai repose sur la détection de mutations qui inversent des mutations présentes dans la souche d'essai et rétablissent ainsi la capacité fonctionnelle des bactéries de synthétiser un acide aminé essentiel. Les bactéries révertantes sont détectées d'après leur capacité de se développer en l'absence de l'acide aminé requis par la souche d'essai parentale.

Les mutations ponctuelles sont à l'origine de beaucoup de maladies génétiques humaines et de nombreuses données tendent à démontrer que des mutations ponctuelles frappant les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs dans des cellules somatiques jouent un rôle dans le développement de tumeurs tant chez l'homme que chez les animaux de laboratoire. L'essai bactérien de mutation réverse est rapide, peu coûteux et relativement facile à effectuer. Beaucoup de souches utilisées possèdent entre autres particularités, celles de les rendre plus sensibles aux mutations: séquences d'ADN plus sensibles aux mutations au niveau des sites de réversion, augmentation de perméabilité cellulaire pour les grosses molécules, élimination des systèmes de réparation de l'ADN ou favorisation (augmentation) des processus induisant des erreurs lors de la réparation de l'ADN. La spécificité des souches d'essai peut fournir des informations utiles sur les types de mutations induites par les agents génotoxiques. On dispose pour les essais bactériens de mutation réverse de très nombreux résultats pour une grande variété de structures et d'une méthodologie d'essai qui est bien au point et qui peut être appliquée à des substances ayant des propriétés physico-chimiques très diverses, y compris les composés volatils.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Un **essai de mutation réverse** chez *Salmonella typhimurium* ou *Escherichia coli* détecte, chez une souche dont la croissance requiert la présence d'un acide aminé (respectivement histidine ou tryptophane), des mutations qui transforment cette souche en une souche dont la croissance s'effectue indépendamment d'un rapport extérieur de cet acide aminé.

Les **mutagènes provoquant la substitution de paires de base** sont des agents qui entraînent le remplacement d'une base de l'ADN. Lors d'un essai de réversion, cette modification peut avoir lieu sur le site de la mutation initiale ou sur un autre site du génome bactérien.

Les **mutagènes décalant le cadre de lecture** sont des agents qui provoquent l'addition ou la délétion d'une ou de plusieurs paires de base dans l'ADN, modifiant ainsi le cadre de lecture dans l'ARN.

▼B

1.3. CONSIDÉRATIONS PRÉLIMINAIRES

L'essai bactérien de mutation réverse porte sur des cellules procaryotes qui diffèrent des cellules de mammifère notamment du point de vue de l'absorption, du métabolisme, de la structure des chromosomes et des processus de répartition de l'ADN. Les essais in vitro nécessitent généralement une activation métabolique exogène. Comme les systèmes d'activation métabolique in vitro ne peuvent pas reproduire parfaitement le métabolisme de cellules de mammifère in vivo, les essais ne fournissent pas directement des informations sur le pouvoir mutagène et carcinogène d'une substance chez les mammifères.

L'essai de mutation réverse sur bactéries est couramment employé comme première étape pour la détection de l'activité génotoxique en général et des mutations ponctuelles en particulier. De nombreuses données démontrent que beaucoup de substances chimiques qui se révèlent positives dans cet essai présentent aussi une activité mutagène dans d'autres essais. Certains agents mutagènes ne sont pas décelés par ces systèmes d'essai. Ces défaillances peuvent tenir à la nature particulière de l'effet détecté, à des différences sur le plan de l'activation métabolique ou à des différences de biodisponibilité. D'autre part, les facteurs qui amplifient la sensibilité de l'essai de mutation réverse sur bactéries peuvent conduire à une surestimation de l'activité mutagène.

L'essai de mutation réverse sur bactéries peut ne pas convenir pour l'évaluation de certaines classes de substances chimiques, par exemple les composés fortement bactéricides (certains antibiotiques, par exemple) et ceux dont on soupçonne (ou on sait) qu'ils interfèrent spécifiquement avec le système de réplication des cellules de mammifère (par exemple les inhibiteurs de la topoisomérase ou certains analogues de nucléosides). Dans de tels cas, des essais de mutation sur des cellules de mammifère peuvent s'avérer plus appropriés.

Bien que de nombreux composés qui donnent un résultat positif à cet essai soient cancérogènes pour les mammifères, la corrélation n'est pas parfaite. Celle-ci dépend de la classe chimique et il existe des substances cancérogènes qui ne sont pas détectées par cet essai parce qu'elles agissent par des mécanismes non génotoxiques ou par des mécanismes qui sont absents des cellules bactériennes.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des bactéries en suspension sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène. Dans le cas de la méthode d'incorporation directe (méthode par étalement), ces suspensions sont mélangées avec la gélose de surface et déposées immédiatement sur le milieu minimal. Dans le cas de la méthode avec préincubation, le mélange de bactéries en suspension-substance testée est incubé et ensuite mélangé avec un couche de gélose de surface avant d'être étalé sur le milieu minimal. Dans les deux techniques, après deux ou trois jours d'incubation, les colonies révertantes sont comptées et leur nombre est comparé à celui des revenants spontanés dans les boîtes témoins traitées avec le solvant.

Plusieurs méthodes permettant de réaliser l'essai de mutation réverse sur bactéries ont été décrites. Parmi celles qui sont communément utilisées figure la méthode par incorporation directe (1) (2) (3) (4), la méthode de la préincubation (2) (3) (5) (6) (7) (8), la méthode de la fluctuation (9) (10) et la méthode par suspension (11). Des méthodes modifiées pour les essais avec des gaz ou des vapeurs ont été décrites (12).

▼B

Les modes opératoires décrits se réfèrent principalement aux méthodes d'incorporation directe et de préincubation. Chacune de ces méthodes peut être utilisée avec et sans activation métabolique. L'utilisation de la méthode avec préincubation permet de détecter plus efficacement l'effet mutagène de certaines substances. Ces substances appartiennent à des classes chimiques qui comprennent les nitrosamines aliphatiques à chaînes courtes, les métaux bivalents, les aldéhydes, les colorants azoïques et les composés diazoïques, les alcaloïdes pyrollizidiniques, les composés allyliques et nitrés (3). Il est également admis que certaines classes de mutagènes ne sont pas toujours détectées par les méthodes conventionnelles telles que l'incorporation directe ou la préincubation. Ces substances doivent être considérées comme des cas particuliers et il est fortement recommandé d'utiliser d'autres méthodes de détection. On a pu mettre en évidence les cas particuliers suivants (ainsi que des exemples de méthodes qui pourraient servir à leur détection): colorants azoïques et composés diazoïques (3) (5) (6) (13), gaz et substances chimiques volatiles (12) (14) (15) (16), glycosides (17) (18). Tout écart par rapport au mode opératoire standard demande à être scientifiquement justifié.

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.5.1. **Préparations**

1.5.1.1. *Bactéries*

On laisse des cultures fraîches de bactéries se développer jusqu'à la fin de la phase exponentielle ou jusqu'au début de la phase stationnaire de croissance (environ 10^9 cellules par ml). Des cultures en fin de phase stationnaire ne doivent pas être utilisées. Il est essentiel que les cultures utilisées pour cet essai présentent une concentration élevée de bactéries viables. La concentration peut être déterminée à partir des données historiques sur les courbes de croissance des souches bactériennes utilisées ou, lors de chaque essai, par la détermination du nombre de cellules viables à l'aide de la méthode par étalement.

La température d'incubation recommandée est de 37 °C.

Au moins cinq souches de bactéries doivent être employées. Celles-ci doivent comprendre quatre souches de *S. typhimurium* (TA1535, TA1537 ou TA97a ou TA97, TA98 et TA100) pour lesquelles des comparaisons entres laboratoires ont démontré la fiabilité et la reproductibilité de la réponse. Ces souches, qui comportent des paires de bases GC sur les sites primaires de réversion, risquent toutefois de ne pas déceler certains mutagènes oxydants, des agents de réticulation et des hydrazines. Ces substances mutagènes peuvent être détectées à l'aide de souches d'*E. coli* WP2 ou de *S. typhimurium* TA102 (19) qui ont une paire de base AT sur le site primaire de réversion. Par conséquent, il est recommandé de mettre en œuvre la combinaison de souches suivante:

— *S. typhimurium* TA1535, et

— *S. typhimurium* TA1537 ou TA97 ou TA97a, et

— *S. typhimurium* TA98, et

— *S. typhimurium* TA100, et

— *E. coli* WP2 uvrA ou *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) ou *S. typhimurium* TA102.

Pour les mutagènes à pouvoir réticulant, il peut être préférable d'inclure la souche TA102 ou d'ajouter une souche d'*E. coli* pourvue d'un mécanisme de réparation de l'ADN [*E. coli* WP2 ou *E. coli* WP2 (pKM101), par exemple].

▼B

La préparation des cultures souches, la vérification des marqueurs et le stockage doivent s'effectuer suivant des méthodes reconnues. Pour chaque culture souche congelée, il faut démontrer que la croissance exige la présence d'un acide aminé (histidine pour *S. typhimurium* et tryptophane pour *E. coli*). D'autres caractéristiques phénotypiques demandent également à être vérifiées, à savoir la présence ou l'absence de plasmides de résistance, s'il y a lieu [résistance à l'ampicilline des souches TA98, TA100 et TA97a ou TA97, WP2 uvrA et WP2 uvrA (pKM101), et résistance à l'association ampicilline/tétracycline de la souche TA102], ainsi que la présence de mutations caractéristiques (à savoir la mutation rfa chez *S. typhimurium* d'après la sensibilité au cristal violet et la mutation uvrA chez *E. coli* ou uvrB chez *S. typhimurium* d'après la sensibilité aux UV) (2) (3). D'autre part, les souches doivent produire un nombre de colonies de révertants spontanés par boîte qui se situe dans la gamme de fréquence prévue sur la base des données historiques du laboratoire et de préférence être comparable aux valeurs citées dans la littérature.

1.5.1.2. *Milieu*

On utilise une gélose minimale appropriée (composée, par exemple, de milieu minimal E de Vogel-Bonner et de glucose) et une gélose de recouvrement contenant de l'histidine et de la biotine ou du tryptophane pour permettre quelques divisions cellulaires (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Activation métabolique*

Les bactéries sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. Le système le plus communément utilisé est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foie de rongeur traité avec des indicateurs enzymatiques comme Aroclor 1254 (1) (2) ou une combinaison de phénobarbital et de β-naphthoflavone (18) (20) (21). La fraction post-mitochondriale est généralement utilisée à une concentration comprise entre 5 et 30 % v/v dans le mélange S9. Le choix et la composition du système d'activation métabolique peuvent varier suivant la classe chimique de la substance d'essai. Dans certains cas, il peut être intéressant d'utiliser plusieurs concentrations de la fraction post-mitochondriale. Dans le cas de composés azoïques et diazoïques, un système d'activation métabolique réducteur peut s'avérer plus approprié (6) (13).

1.5.1.4. *Substance d'essai/préparation*

Les substances d'essai solides sont préparées par dissolution ou suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, plus éventuellement diluées avant le traitement des bactéries. Les substances d'essai liquides peuvent être ajoutées au système d'essai directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas réagir chimiquement avec la substance d'essai ni altérer la survie des bactéries et l'activité du mélange S9 (22). L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible. Dans les essais de substances qui sont instables dans l'eau, on utilisera des solvants organiques exempts d'eau.

▼B

1.5.2. **Conditions expérimentales**

1.5.2.1. *Souches utilisées (voir point 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Concentration d'exposition*

La cytotoxicité et la solubilité dans le mélange d'essai final sont des critères à prendre en considération pour déterminer la dose la plus élevée à mettre en œuvre.

Un essai préliminaire destiné à déterminer la toxicité et les caractéristiques de solubilité peut être utile. La cytotoxicité peut être détectée par une réduction du nombre de révertants, un éclaircissement ou une diminution du tapis bactérien ou une diminution du taux de survie des cultures traitées. Les systèmes d'activation métabolique peuvent avoir une influence sur la cytotoxicité d'une substance. On conclut à l'insolubilité lorsqu'une précipitation dans le mélange final est observée à l'œil nu dans les conditions réelles de l'essai.

Pour les substances d'essai solubles et non cytotoxiques, on recommande une concentration maximale de 5 mg ou 5 µl par boîte. Pour les substances d'essai non cytotoxiques qui sont insolubles à 5 mg ou 5 µl par boîte, l'essai doit comprendre une ou plusieurs concentrations auxquelles on observe une insolubilité. Pour les substances qui sont déjà cytotoxiques à une concentration inférieure à 5 mg ou 5µl/boîte, l'essai doit être effectué jusqu'à une concentration cytotoxique. Le précipité ne doit pas interférer avec l'évaluation des résultats.

Pour un premier essai, il convient de tester au moins cinq concentrations analysables différentes de la substance d'essai, avec des intervalles d'environ une demi-unité logarithmique, c'est-à-dire $\sqrt{10}$. Pour établir une relation dose-réponse, il peut s'avérer nécessaire de réduire ces intervalles. Dans le cas de substances d'essai contenant des quantités substantielles d'impuretés potentiellement mutagènes, il peut être utile d'effectuer des essais avec des concentrations supérieures à 5 mg ou 5 µl/boîte.

1.5.2.3. *Témoins négatifs et positifs*

Des témoins positifs spécifiques de la souche, et des témoins négatifs (solvant ou véhicule), doivent être inclus dans chaque essai, avec ou sans activation métabolique. Dans le cas des témoins positifs, on utilisera une concentration permettant de démontrer l'efficacité de chaque essai.

Pour les essais avec système d'activation métabolique, le ou les témoins positifs de référence doivent être choisis en fonction du type de souche bactérienne utilisé.

Les substances suivantes sont des exemples de témoins positifs pour les essais avec activation métabolique:

Substance	Numéro CAS	Numéro Einecs
Diméthyl-9,10 anthracène	781-43-1	212-308-4
Diméthyl-7,12 benz[a]anthracène	57-97-6	200-359-5
3enzo[a]pyrène	50-32-8	200-028-5
Amino-2 anthracène	613-13-8	210-330-9

▼B

Substance	Numéro CAS	Numéro Einecs
Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
Monohydrate de cyclophosphamide	6055-19-2	

La substance suivante convient comme témoin positif pour la méthode d'activation métabolique réductrice:

Substance	Numéro CAS	Numéro Einecs
Rouge Congo	573-58-0	209-358-4

L'amino-2 anthracène ne peut être utilisé comme indicateur unique de l'efficacité du mélange S9. S'il est utilisé, il faut également caractériser chaque lot de S9 avec un mutagène qui requiert une activation métabolique par des enzymes microsomalcs, benzo[a]pyrène et diméthylbenzanthracène par exemple.

Les substances suivantes sont des exemples de témoins positifs spécifiques de souches pour les essais sans activation métabolique exogène:

Substance	Numéro CAS	Numéro Ëinecs	Souche
Azoture de sodium	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 et TA 100
Nitro-2 fluorène	607-57-8	210-138-5	TA 98
Amino-9 acridine	90-45-9	201-995-6	TA 15 37, TA 97 et TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 et TA 97a
Hydropéroxyde de cumène	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA et TA 102
N-éthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2 uvrA et WP2 uvrA (pKM101)
1-oxyde de 4-nitroquinoléine	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2 uvrA et WP2 uvrA (pKM101)
Furylfuramide (AF2)	3688-53-7		Souches contenant des plasmides

D'autres témoins positifs appropriés peuvent être utilisés comme référence. L'utilisation de témoins positifs appartenant à la même classe chimique doit être envisagée, s'ils sont disponibles.

L'essai doit comprendre des témoins négatifs constitués de solvant ou véhicule sans substances d'essai, auxquels sont appliquées les mêmes conditions expérimentales qu'à la substance d'essai. Il faut également inclure des témoins non traités, à moins que des essais antérieurs n'aient démontré que le solvant choisi n'a pas d'effet délétère ou mutagène.

▼B

1.5.3. **Mode opératoire**

Pour la méthode par étalement (1) (2) (3) (4) sans activation métabolique, on ajoute généralement 0,05 ml ou 0,1 ml de la solution à tester, 0,1 ml de culture bactérienne fraîche (contenant environ 10^8 cellules viables) et 0,5 ml de tampon stérile à 2,0 ml de gélose de recouvrement. Pour l'essai avec activation métabolique, on mélange habituellement 0,5 ml du mélange d'activation métabolique contenant une quantité adéquate de fraction post-mitochondriaie (entre 5 et 30 % v/v), les bactéries et la substance d'essai, ou une solution de celle-ci, avec 2,0 ml de gélose de recouvrement. Le contenu de chaque tube est mélangé et versé sur la surface d'un milieu minimal gélosé. On laisse la gélose de recouvrement se solidifier avant incubation.

Dans la méthode de la préincubation (2) (3) (5) (6), la substance d'essai, ou une solution de celle-ci, est préincubée avec la souche d'essai (environ 10^8 cellules viables) et un tampon stérile ou 0,5 ml du système d'activation métabolique généralement pendant 20 minutes ou plus à 30-37 ºC. On ajoute ensuite la gélose de recouvrement et on verse le tout sur la surface d'un milieu minimal gélosé. On mélange généralement 0,05 ou 0,1 ml de la substance d'essai, ou d'une solution de celle-ci, 0,1 ml de bactéries et 0,5 ml de mélange S9 ou de tampon stérile avec 2,0 ml de gélose de recouvrement. Pendant la préincubation, les tubes doivent être aérés par agitation.

Pour une bonne estimation de la variation, chaque concentration doit être testée dans trois boîtes de Petri. Le nombre de boîtes peut être limité à deux si cela se justifie scientifiquement. La perte accidentelle d'une boîte n'invalide pas nécessairement l'essai.

Les substances gazeuses ou volatiles doivent être testées en utilisant des méthodes appropriées, par exemple dans des récipients hermétiquement fermés (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Incubation**

Toutes les boîtes d'un essai donné doivent être incubées à 37 ºC pendant 48-72 heures. À la fin de la période d'incubation, on compte dans chaque boîte le nombre de colonies révertantes.

2. **RÉSULTATS**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Les données doivent être présentées sous la forme du nombre de colonies révertantes par boîte. Le nombre de colonies révertantes dans les boîtes de témoins négatifs (témoins traités avec le solvant et, le cas échéant, témoins non traités) et positifs doit également être mentionné. Le dénombrement par boîte, le nombre moyen de colonies révertantes par boîte et l'écart-type doivent être indiqués pour la substance d'essai ainsi que pour les témoins positifs et négatifs (non traités et/ou traités au solvant).

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse nettement positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées. Les résultats négatifs demandent à être confirmés cas par cas. Si la confirmation de résultats négatifs n'est pas jugée nécessaire, une justification doit être fournie. Pour les essais de confirmation, il convient d'envisager une modification des conditions expérimentales, afin d'élargir la gamme des conditions évaluées. Les paramètres susceptibles d'être modifiés comprennent l'écart entre les doses, la méthode de traitement (étalement ou préincubation en milieu liquide) et les conditions d'activation métabolique.

▼B

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement, dose-dépendant, du nombre de révertants ou une augmentation reproductible du nombre de colonies de revenants par boîte à une ou plusieurs concentrations pour au moins une souche, avec ou sans activation métabolique (23). En premier lieu, il s'agit de prendre en considération la signification biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (24) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive.

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats manifestement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas de conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs obtenus à l'essai de mutation réverse sur bactéries indiquent que la substance induit des mutations ponctuelles par substitution de bases ou décalage du cadre de lecture dans le génome de *Salmonella typhimurium* et/ou *Escherichia coli*. Un résultat négatif signifie que, dans les conditions de l'essai, la substance n'est pas mutagène pour l'espèce utilisée dans l'essai.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule:

— justification du choix du solvant/véhicule,

— solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Souches:

— souches utilisées,

— nombre de cellules par culture,

— caractéristiques des souches.

Conditions expérimentales:

— quantité de substance d'essai par boite (mg/boîte ou µl/boîte) et justification du choix des doses et du nombre de boîtes par concentration,

— milieux utilisés,

— type et composition du système d'activation métabolique, y compris les critères d'acceptabilité,

— procédés de traitement.

Résultats:

— signes de toxicité,

— signes de précipitation,

— dénombrement par boîte,

▼B

— nombre moyen de colonies révertantes par boîte et écart-type,

— relation dose-réponse, si possible,

— analyses statistiques, le cas échéant,

— données concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs concomitants (étendues, moyennes et écarts-types),

— données concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types).

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C, Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217-233.

(4) Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Genelox Program, *Mutation Res.*, 168, pp. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura. T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives. *Cancer Letters*, 1, pp. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*. ed. Nor- poth K. H. and Garner, R. C, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.

(7) Gatehouse. D. G.. Rowland, I. R.. Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenecity Tests*: UKEMS Part 1 Revised, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

(8) Aeschacher. H. U.. Wolleb, U. and Porchet. L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. Food Safety*, 8, pp. 167-177.

(9) Green, M. H. L, Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations Res.*, 38, pp. 33-42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L, Gatehouse, D. and J. W. Bridges (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicitv Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

▼B

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*. *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, pp. 335-344.

(13) Privai, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.*, 136, pp. 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, *in Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, 1. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, pp. 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Nail. Acad. Sri, USA*, 77, pp. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: In Vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

(21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogcn, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, pp. 343-350.

(23) Claxton, L. D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomc Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, pp. 83-91.

▼B

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

▼B

B.15. **TESTS DE MUTAGENÈSE ET DE DÉPISTAGE DE CANCÉROGENÈSE MUTATION GÉNIQUE — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITION

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Diverses souches haploïdes et diploïdes de la levure *Saccharomyces cerevisiae* peuvent être utilisées pour mesurer la production de mutations géniques induites par des agents chimiques en présence et en l'absence d'activation métabolique.

La mesure de mutation en avant dans les souches haploïdes peut être réalisée notamment par la mesure du passage des mutants rouges exigeant l'adénine (*ade*-1, *ade*-2) à une forme blanche doublement exigeante pour l'adénine ainsi que des systèmes sélectifs tels que l'induction de la résistance à la canavanine et la cydoheximide.

La méthode de mutation reverse la plus largement utilisée implique l'utilisation de la souche haploïde XV 185-14C qui porte les mutations non-sens ochre *ade* 2-1, *arg* 4-17, *lys* 1-1 et *trp* 5-48, lesquelles sont réversibles par des mutagènes provoquant des substitutions de bases qui induisent des mutations à un site spécifique ou des mutations suppressives ochre. La souche XV 185-14C porte également le marqueur *his* 1-7, une mutation contresens principalement révertée par des mutations de second site et le marqueur *hom* 3-10 qui est réverté par des mutagènes conduisant au décalage du cadre de lecture du code génétique (*frameshift mutagens*).

La seule souche diploïde de *S. cerevisiae* largement validée est la souche D_7, homozygote pour *ilv* 1-92.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Les solutions des substances d'essai ainsi que celles des substances témoins seront préparées, immédiatement avant l'essai, à l'aide d'un véhicule approprié. Lorsqu'il s'agit de substances organiques non solubles dans l'eau, les solvants organiques tels que l'éthanol, l'acétone ou le diméthylsulfoxyde (DMSO) devraient être utilisés à une concentration ne dépassant pas 2 % v/v. La concentration finale du véhicule ne doit pas affecter de manière significative la viabilité des cellules ni les caractéristiques de croissance.

▼B

Activation métabolique

Les cellules devraient être exposées aux substances d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène approprié.

La méthode la plus fréquemment utilisée consiste à ajouter la fraction post-mitochondriale préparée à partir de foies de rongeurs prétraités par des inducteurs enzymatiques additionnée de co-facteurs. L'usage d'autres espèces, tissus, fractions post-mitochondriales, ou méthodes peut aussi convenir pour l'activation métabolique.

Conditions d'essai

Souches d'expérience

La souche haploïde XV 185-14C et la souche diploïde D_7 sont les plus fréquemment utilisées dans les études de mutation génique. D'autres souches peuvent également convenir.

Milieux

Des milieux de culture appropriés sont utilisés pour déterminer la survie cellulaire et le nombre de mutants.

Utilisation de témoins négatifs et positifs

Des témoins positifs, des témoins non traités et des témoins en présence de solvant devraient être simultanément réalisés. Des substances chimiques témoins positives appropriées devraient être utilisées pour concrétiser chaque effet mutagène spécifique.

Concentration d'exposition

Au moins 55 concentrations convenablement espacées devraient être utilisées. Dans le cas de substances toxiques, la concentration maximale testée ne fera pas descendre le taux de survie en dessous de 5 à 10 %. Les substances relativement insolubles dans l'eau seront testées jusqu'à leur limite de solubilité par des méthodes appropriées. En ce qui concerne les substances non toxiques très solubles dans l'eau, la concentration la plus élevée sera déterminée cas par cas.

Conditions d'incubation

Les boîtes sont incubées dans l'obscurité à une température de 28 à 30 °C pendant 4 à 7 jours.

Fréquences de mutation spontanée

On utilisera des subcultures dont les fréquences de mutations spontanées se situent dans les limites normales admises.

▼B

Nombre de répétitions

Trois boîtes au moins seront utilisées par concentration, en vue de déterminer les prototrophes produits par mutation génique et d'observer la viabilité des cellules. Dans le cas d'expériences utilisant des marqueurs tels que *hom* 3-10 à faible taux de mutation, le nombre des boîtes utilisées peut être augmenté afin de fournir des données statistiquement pertinentes.

Conduite de l'essai

Les souches de *S. cerevisiae* sont habituellement traitées au cours d'un essai en milieu liquide impliquant l'utilisation de cellules en phase stationnaire ou de croissance. Les expériences initiales devraient être faites sur des cellules en croissance. $1 — 5 \times 10^7$ cellules/ml sont exposées à la substance d'essai pendant une période allant jusqu'à 18 heures, à une température de 28 à 37 °C, le mélange étant agité; une quantité adéquate d'un système d'activation métabolique est ajoutée pendant le traitement. Si la première expérience fournit des résultats négatifs, une deuxième expérience devrait être réalisée en utilisant des cellules en phase stationnaire. Si la première expérience fournit des résultats positifs, ceux-ci sont confirmés par une expérience indépendante. À l'issue du traitement, les cellules sont centrifugées, lavées et ensemencées sur un milieu de culture approprié. Après incubation, les boîtes sont examinées afin de déterminer le taux de survie et l'induction de mutations géniques.

2. RÉSULTATS

Les résultats devraient être présentés sous forme de tableaux indiquant le nombre de colonies comptées, le nombre de mutants, le taux de survie et la fréquence de mutants. Tous les résultats devraient être confirmés au cours d'une expérience indépendante. Les résultats devraient être évalués par des méthodes statistiques adéquates.

3. RAPPORT

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

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

— souche utilisée,

— conditions d'essai: cellules en phases stationnaire ou de croissance; composition des milieux; température d'incubation et durée de celle-ci; système d'activation métabolique,

— conditions de traitement: concentration d'exposition; méthode et durée de traitement; température de traitement; témoins positifs et négatifs,

— nombre de colonies comptées; nombre de mutants; taux de survie et fréquence de mutants; relation dose-réponse, si possible; évaluation statistique des résultats,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B.

▼B

B.16. **RECOMBINAISON MITOTIQUE — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITION

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, on peut déceler la recombinaison mitotique intergénique (ou plus généralement, entre un gène et son centromère) et intragénique. Dans le premier cas, on parle de *croissing-over* mitotique lequel donne naissance à des échanges réciproques, tandis que, dans le second cas, les échanges sont le plus souvent non réciproques et l'on parle de conversion génique. *Le crossing-over* est généralement déterminé par la production de colonies ou de secteurs récessifs homozygotes à partir d'une souche hétérozygote, tandis que la conversion génique est déterminée par la production de revertants prototrophes dans une souche auxotrophe hétéroallélique portant deux allèles défectueux différents du même gène. Les souches les plus couramment utilisées pour déceler une conversion génique mitotique sont D_4 (hétéroallélique pour *ade* 2 et *trp* 5), D_7 (hétéroallélique pour *trp* 5), BZ_{34} (hétéroallélique pour *arg* 4) et JD1 (hétéroallélique pour *his* 4 et *trp* S). *croissing-over* mitotique produisant des secteurs homozygotes de couleur rouge et rose peut être déterminé dans D_5 ou dans D_7 (qui mesure aussi la conversion génique mitotique et la mutation reverse pour *ilv* 1-92), ces deux souches étant hétéroalléliques complémentaires pour les allèles *ade* 2.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Les solutions des substances d'essai ainsi que celles des substances témoins ou de référence devraient être préparées, immédiatement avant l'essai, à l'aide d'un véhicule approprié. Dans le cas de substances organiques insolubles dans l'eau, on utilisera des solvants organiques, tels que l'éthanol, l'acétone et le Diméthylsulfoxyde (DMSO), a une concentration ne dépassant pas 2 % v/v. La concentration finale du véhicule ne devrait pas affecter de manière significative la viabilité des cellules ni les caractéristiques de croissance.

Activation métabolique

Les cellules seront exposées aux substances d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène. La méthode la plus fréquemment utilisée consiste à ajouter la fraction post-mitochondriale préparée à partir de foies de rongeurs prétraités par des inducteurs enzymatiques additionnée de co-facteurs. L'usage d'autres espèces, tissus, fractions post-mitochondriales, ou méthodes peut aussi convenir pour l'activation métabolique.

▼B

Conditions d'essai

Souches d'expérience

Les souches les plus fréquemment utilisées sont les diploïdes D_4, D_5, D_7 et JD1. D'autres souches peuvent convenir.

Milieux

Des milieux de culture adéquats sont utilisés en vue de déterminer le taux de survie et la fréquence de recombinaisons mitotiques.

Utilisation de témoins négatifs et positifs

Des témoins positifs, des témoins non traités et des témoins en présence de solvant seront simultanément réalisés. Des substances chimiques témoins positives appropriées seront utilisées pour chaque type spécifique de recombinaison.

Concentration d'exposition

Au moins cinq concentrations convenablement espacées de substance d'essai seront utilisées. La cytotoxicité et la solubilité sont au nombre des facteurs à prendre en considération. La concentration la plus faible ne doit avoir aucun effet sur la viabilité des cellules. Dans le cas de produits chimiques toxiques, la concentration maximale testée ne diminuera pas le taux de survie en dessous de 5 à 10 %. Les produits chimiques relativement insolubles dans l'eau seront testés jusqu'à leur limite de solubilité par des méthodes appropriées. Dans le cas de produits chimiques non toxiques franchement solubles dans l'eau, la concentration d'essai maximale sera déterminée cas par cas.

Les cellules peuvent être exposées aux substances d'essai en phase stationnaire ou en phase de croissance pendant des périodes allant jusqu'à 18 heures. Toutefois, dans le cas d'un traitement de longue durée, les cultures seront examinées au microscope afin de déceler la formation de spores; la présence de celles-ci rendant l'essai nul.

Conditions d'incubation

Les boîtes sont incubées, dans l'obscurité, à une température de 28 à 30 °C, pendant 4 à 7 jours. Les boîtes utilisées pour la détermination des secteurs homozygotes rouge et rose produits par *croissing-over* mitotique seront conservées dans un réfrigérateur à ± 4 °C pendant 1 à 2 jours encore avant le dénombrement de manière à ce que la pigmentation des colonies concernées puisse s'intensifier.

Fréquences de recombinaisons mitotiques spontanées

On utilisera des subcultures dont les fréquences de recombinaisons mitotiques spontanées se situeront dans la gamme normalement admise.

▼B

Nombre de répétitions

Trois boîtes au moins seront ensemencées par concentration afin de déterminer la viabilité ainsi que le nombre de prototrophes produits par conversion génique mitotique. Dans le cas de la détermination d'homozygotie récessive produite par *croissing-over* mitotique, le nombre des boîtes sera augmenté pour obtenir un nombre adéquat de colonies.

Conduite de l'essai

Les souches de *S. cerevisiae* sont habituellement traitées au cours d'un essai en milieu liquide impliquant l'utilisation de cellules en phase stationnaire ou de croissance. Les expériences initiales devraient être faites sur des cellules en croissance. 1 — 5 × 10^7 cellules/ml sont exposées à la substance d'essai pendant une période allant jusqu'à 18 heures à des températures de 28 à 37 °C, le mélange étant agité; une quantité adéquate d'un système d'activation métabolique est ajoutée pendant le traitement. Si la première expérience fournit des résultats négatifs, une deuxième expérience devrait être réalisée en utilisant des cellules en phase stationnaire. Si la première expérience fournit des résultats positifs, ceux-ci sont confirmés par une expérience indépendante appropriée. À l'issue du traitement, les cellules sont centrifugées, lavées et ensemencées sur un milieu de culture adéquat. Après incubation, les boîtes sont examinées afin de déterminer le taux de survie et l'induction de recombinaison mitotique.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats devraient être présentés sous forme de tableaux indiquant le nombre de colonies comptées, le nombre de recombinants, le taux de survie et la fréquence de recombinants.

Tous les résultats devraient être confirmés au cours d'une expérience indépendante.

Les résultats devraient être évalués par des méthodes statistiques adéquates.

3. **RAPPORT**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

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

— souche utilisée,

— conditions d'essai: cellules en phase stationnaire ou en phase de croissance; composition des milieux; température d'incubation et durée d'incubation; système d'activation métabolique,

— conditions de traitement: concentration d'exposition; méthode et durée de traitement; température de traitement; témoins positifs et négatifs,

— nombre de colonies comptées; nombre de recombinants; taux de survie et fréquence de recombinaison: relation dose-réponse, si possible; évaluation statistique des résultats,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

▼B

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼B

B. 17. **MUTAGÉNICITÉ — ESSAI IN VITRO DE MUTATION GÉNIQUE SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 476, Essai in vitro de mutation génique sur cellules de mammifères (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai in vitro de mutation génique sur cellules de mammifères permet de détecter des mutations géniques induites par des substances chimiques. Les lignées cellulaires appropriées comprennent des cellules de lymphome de souris L5178Y, les lignées CHO-AS52 et V79 de cellules de hamster chinois et les cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 (1). Dans ces lignées cellulaires, les critères génétiques les plus couramment utilisés sont une mutation sur les loci de la thymidine kinase (TK) et de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HPRT), ainsi qu'un transgène de la xanthine-guanine phosphoribosyl transférasc (XPRT). Les essais de mutation TK, HPRT et XPRT détectent des gammes différentes d'effet génétiques. L'emplacement autosomique de TK et XPRT peut permettre de détecter des effets génétiques (par exemple des délétions importantes) qui ne sont pas détectés sur le locus HPRT de chromosomes X (2, 3, 4, 5, 6).

L'essai in vitro de mutation génique sur cellules de mammifère peut être pratiqué sur des cultures de lignées cellulaires établies ou de souches cellulaires. Les cellules employées sont choisies en fonction de leur potentiel de croissance en culture et de la stabilité de la fréquence de mutation spontanée.

Les essais in vitro requièrent généralement une source exogène d'activation métabolique qui ne peut pas reproduire parfaitement les conditions présentes in vivo chez les mammifères. Il faut éviter absolument d'introduire des conditions qui conduiraient à des résultats positifs ne reflétant pas une mutagénicité intrinsèque et pouvant provenir de modifications du pH ou de l'osmolalité ou d'une forte cytotoxicité (7).

Cet essai est utilisé pour le dépistage de substances pouvant être mutagènes et cancérigènes pour les mammifères. Bien que de nombreux composés donnant un résultat positif à cet essai soient cancérigènes pour les mammifères, il n'y a pas de corrélation parfaite entre cet essai et la cancérogénicité. La corrélation dépend de la classe chimique et de plus en plus d'éléments laissent penser qu'il existe des agents cancérigènes que cet essai ne permet pas de détecter parce qu'ils agissent par des mécanismes non génotoxiques ou par des mécanismes qui sont absents des cellules de mammifères (6).

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Mutation directe: mutation génique de la forme parentale en une forme mutante, qui engendre une modification ou une perte de l'activité enzymatique de la fonction de la protéine codée.

Mutagènes provoquant la substitution de paires de bases: substances qui entraînent le remplacement d'une ou de plusieurs bases de l'ADN.

Mutagènes décalant le cadre de lecture: substances qui entraînent l'addition ou la délétion d'une ou de plusieurs paires de bases dans la molécule d'ADN.

▼B

Temps d'expression du phénotype: période pendant laquelle des produits géniques non modifiés disparaissent des cellules qui viennent de subir une mutation.

Fréquence de mutants: rapport cellules mutantes observées/cellules viables.

Croissance totale relative: augmentation du nombre de cellules dans le temps par rapport à une population témoin; elle est calculée comme le produit de la croissance en suspension par rapport au témoin négatif et de l'efficacité de clonage par rapport au témoin négatif.

Croissance relative en suspension: augmentation du nombre de cellules pendant la période d'expression par rapport au témoin négatif.

Viabilité: efficacité de clonage des cellules traitées au moment de l'étalement dans des conditions sélectives après la période d'expression.

Taux de survie: efficacité de clonage des cellules traitées au moment de l'étalement à la fin de la période de traitement; le taux de survie est généralement exprimé par rapport au taux de survie de la population cellulaire témoin.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Les cellules déficientes en thymidine kinase (TK) par suite de la mutation directe $TK^{-/-}$ —> TK-/- sont résistantes aux effets cytotoxiques de la trifluorothymidinc (TFT), un analogue de la pyrimidine. Les cellules non déficientes en TK sont sensibles à la TFT, ce qui entraîne une inhibition du métabolisme cellulaire et l'arrêt de la division cellulaire. Ainsi, les cellules mutantes peuvent proliférer en présence de TFT, tandis que les cellules normales, qui contiennent de la TK, ne le peuvent pas. De la même façon, des cellules déficientes en HPRT ou XPRT sont sélectionnées par leur résistance à la thio-6 guanine (TG) ou à l'aza-8 guanine (AG). Lorsqu'un analogue d'une base ou une substance apparentée à l'agent sélectif est soumis à un essai de mutation génique sur des cellules de mammifère, il convient d'en étudier soigneusement les propriétés. Il faut, par exemple, examiner toute toxicité sélective soupçonnée de la substance d'essai vis-à-vis de cellules mutantes et non mutantes. Par conséquent, la performance du système ou de l'agent de sélection doit être confirmée lors de l'essai de substances ayant une similitude de structure avec l'agent de sélection (8).

Des cellules en suspension ou en culture monocouche sont exposées à la substance d'essai, avec et sans activation métabolique, pendant une période appropriée. Les cellules sont repiquées afin de déterminer la cytotoxicité et de laisser le phénotype s'exprimer avant la sélection des mutants (9, 10, 11, 12, 13). On détermine la cytotoxicitc en mesurant l'efficacité de clonage relative (taux de survie) ou la croissance totale relative des cultures après la période de traitement. Les cultures traitées sont maintenues dans un milieu de croissance pendant une période de temps suffisante, caractéristique de chaque locus et du type de cellule choisi, afin de permettre une expression phénotypique presque optimale des mutations induites. On détermine la proportion de mutants en mettant en culture un nombre connu de cellules dans un milieu contenant l'agent sélectif pour détecter les cellules mutantes et dans un milieu exempt d'agent sélectif pour déterminer l'efficacité de clonage (viabilité). Les colonies sont comptées après une durée d'incubation appropriée. On compare le nombre de colonies mutantes en milieu sélectif au nombre de colonies en milieu non sélectif pour obtenir la proportion de mutants.

▼B

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Préparations**

1.4.1.1. *Cellules*

Divers types de cellules conviennent pour ce test, entre autres: sous-clones de L5178Y, CHO, AS52, V79 ou TK6. Les cellules utilisées doivent avoir une sensibilité prouvée aux mutagènes chimiques, une efficacité de clonage élevée et une fréquence de mutation spontanée stable. On doit veiller à ce que les cellules ne soient pas contaminées par des mycoplasmes. Des cellules contaminées ne doivent pas être utilisées.

L'essai doit être conçu de façon à avoir une sensibilité et une puissance prédéterminées. Le nombre de cellules, de cultures et de concentrations de la substance d'essai utilisées doit refléter ces paramètres définis à l'avance (14). À chaque stade de l'essai, le nombre minimal de cellules viables survivant au traitement doit être basé sur la fréquence de mutation spontanée. Une règle générale consiste à utiliser un nombre de cellules au moins égal à dix fois l'inverse de cette fréquence. Cependant, il est recommandé d'utiliser au moins 10^6 cellules. Pour s'assurer de la performance constante de l'essai, il faut disposer de données antérieures adéquates relatives au système cellulaire utilisé.

1.4.1.2. *Milieux et conditions de culture*

On doit utiliser des milieux de culture et des conditions d'incubation appropriés (récipients de culture, température, concentration de CO_2 et humidité). Les milieux doivent être choisis en fonction des systèmes sélectifs et du type de cellules utilisés dans l'essai. Il est particulièrement important de choisir des conditions de culture qui assurent une croissance optimale des cellules pendant la période d'expression, ainsi que la capacité des cellules, tant mutantes que non mutantes, à former des colonies.

1.4.1.3. *Préparation des cultures*

Les cellules sont multipliées à partir de cultures souches, ensemencées dans le milieu de culture et incubées à 37 °C. Avant l'emploi des cultures pour l'essai, il peut être nécessaire de les débarrasser des cellules mutantes qu'elles contiennent.

1.4.1.4. *Activation métabolique*

Les cellules doivent être exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. Le système le plus couramment utilisé est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foie de rongeur traité avec des inducteurs enzymatiques, par exemple Aroclor 1254 (15, 16, 17, 18) ou un mélange de phénobarbital et de β-naphthoflavone (19, 20).

La fraction post-mitochondriale est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 10 % v/v dans le milieu final. Le choix du système d'activation métabolique peut dépendre de la classe chimique de la substance d'essai. Dans certains cas il peut y avoir avantage à utiliser plus d'une concentration de la fraction post-mitochondriale.

▼B

Plusieurs procédés nouveaux, comme la création de lignées cellulaires génétiquement modifiées exprimant des enzymes activantes spécifiques, sont susceptibles de fournir une activation endogène. Le choix des lignées cellulaires utilisées doit être justifié scientifiquement (par exemple par la pertinence de l'isoenzyme du cytochrome P4 50 pour le métabolisme de la substance d'essai).

1.4.1.5. *Substance d'essai/préparation*

Les substances d'essai solides sont dissoutes ou mises en suspension dans un solvant ou un véhicule approprié, puis éventuellement diluées avant le traitement des cellules. Les substances d'essai liquides peuvent être ajoutées directement ou après dilution au système d'essai. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2. **Conditions expérimentales**

1.4.2.1. *Solvant/véhicule*

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas réagir chimiquement avec la substance d'essai ni altérer la survie des cellules et l'activité du mélange S9. L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible. Dans les essais de substances qui sont instables dans l'eau, on utilisera des solvants organiques exempts d'eau. L'eau peut être enlevée à l'aide d'un tamis moléculaire.

1.4.2.2. *Concentration d'exposition*

La cytotoxicité, la solubilité dans le mélange d'essai final et les modifications de pH et d'osmolalité sont des critères à prendre en considération pour déterminer la dose la plus élevée à mettre en œuvre.

La cytotoxicité doit être mesurée, avec et sans système d'activation métabolique, dans l'expérience principale par un indicateur pertinent de l'intégrité et de la croissance cellulaire, tel que l'efficacité de clonage relative (taux de survie) ou la croissance totale relative. Il peut être utile de déterminer la cytotoxicité et la solubilité dans un essai préliminaire.

Il convient d'utiliser au moins quatre concentrations analysables. Dans le cas d'une substance cytotoxique, ces concentrations doivent couvrir un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale, ce qui signifie généralement des concentrations séparées par un facteur compris entre 2 et $\sqrt{10}$ au maximum. Si la concentration la plus forte est basée sur la cytotoxicité, elle devrait donner un taux de survie relatif (efficacité de clonage relative) ou une croissance totale relative d'environ 10 à 20 % (mais non inférieure à 10 %). En ce qui concerne les substances relativement non cytotoxiques, la concentration maximale doit être la plus basse des trois concentrations suivantes: 5 µl/ml, 5 mg/ml ou 0,01 M.

▼B

Les substances relativement insolubles doivent être testées jusqu'à des concentrations égales ou supérieures à la limite de solubilité dans les conditions de culture. L'insolubilité doit être mise en évidence dans le milieu de traitement final auquel les cellules sont exposées. Il peut être utile d'évaluer la solubilité au début et à la fin du traitement, celle-ci pouvant varier au cours de l'exposition dans le système d'essai en raison de la présence de cellules, de S9, de sérum, etc. On conclut à l'insolubilité lorsqu'une précipitation est observée à l'exil nu. Le précipité ne doit pas interférer avec l'évaluation des résultats.

1.4.2.3. *Témoins*

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule) doivent être inclus dans chaque expérience avec et sans activation métabolique. Quand l'essai est effectué avec activation métabolique, la substance utilisée comme témoin doit être celle qui exige l'activation pour donner une réponse mutagène.

Des exemples de substances pouvant servir comme témoins positifs figurent dans le tableau ci-dessous.

Condition d'activation métabolique	Locus	Substance	N° CAS	N° Einecs
Absence d'activation métabolique exogène	HPRT	Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
		Éthylnitrosourée	759-73-9	212-072-2
	TK (petites et grandes colonies)	Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
		Éthylnitrosourée	759-73-9	212-072-2
Présence d'activation métabolique exogène	HPRT	Méthyl-3 cholanthrène	56-49-5	200-276-4
		N-Nitrosodiméthylaminc	62-75-9	200-549-8
		Diméthyl-7,12 benzanthracène	57-97-6	200-359-5
	TK (petites et grandes colonies)	Cvclophosphamide	50-18-0	200-015-4
		Monohydrate de cyclophosphamide	6055-19-2	
		Benzo[a]pyrène	50-32-8	200-028-5
		Méthyl-3 cholanthrène	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-Nitrosodiméthylamine (pour des niveaux élevés de S9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pyrène	50-32-8	200-028-5

D'autres substances de référence appropriées peuvent être utilisées comme témoins positifs, par exemple la 5-bromo 2'-désoxyuridine (n° CAS 59-14-3, n° Einecs 200-415-9) si le laboratoire possède des contrôles historiques relatifs à cette substance. L'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique doit être envisagé, s'ils sont disponibles.

▼B

Des témoins négatifs, constitués uniquement du solvant ou du véhicule dans le milieu de traitement et traités de la même façon que la substance d'essai, doivent être inclus. Il faut également inclure des témoins non traités, à moins que des essais antérieurs n'aient démontré que le solvant choisi n'a pas d'action délétère ou mutagène.

1.4.3. **Mode opératoire**

1.4.3.1. *Traitement avec la substance d'essai*

Les cellules en prolifération sont traitées avec la substance d'essai en présence et en l'absence d'activation métabolique. La durée d'exposition doit être suffisante (une durée de trois à six heures est généralement efficace) et peut s'étendre sur un ou plusieurs cycles cellulaires.

On peut réaliser les cultures en un seul ou en double exemplaire pour chaque concentration testée. Dans le cas des cultures en un seul exemplaire, il faut augmenter le nombre des concentrations afin d'assurer un nombre adéquat de cultures à analyser (par exemple, au moins huit concentrations analysables). Les cultures servant de témoins négatifs (solvant) sont faites en double.

Les substances gazeuses ou volatiles doivent être testées en utilisant des méthodes appropriées, par exemple dans des récipients de culture hermétiquement fermés (21, 22).

1.4.3.2. *Détermination du taux de survie, de la viabilité et de la proportion de mutants*

À la fin de la période d'exposition, les cellules sont lavées et mises en culture en vue de la détermination de leur taux de survie et de l'expression du phénotype mutant. La détermination de la cytotoxicité commence généralement après la période de traitement par la mesure de l'efficacité de clonage relative (taux de survie) ou de la croissance totale relative des cultures.

À chaque locus correspond un temps bien défini qui est nécessaire à l'expression presque optimale du phénotype des mutants nouvellement induits (HPRT et XPRT ont besoin d'au moins 6 à 8 jours et TK d'au moins 2 jours). Pour déterminer le nombre de mutants et l'efficacité de clonage, les cellules sont placées dans un milieu en présence et en l'absence d'agent(s) sélectif(s). On commence à mesurer la viabilité, qui permet de calculer la proportion de mutants, à la fin de la période d'expression en déposant les cultures dans un milieu non sélectif.

Si la substance d'essai est positive à l'essai sur L5178Y $TK^{-/-}$, la taille des colonies doit être déterminée dans au moins une des cultures traitées (à la concentration positive la plus élevée) et dans les témoins négatifs et positifs. Si la substance d'essai est négative à l'essai sur L5178Y $TK^{+/-}$, la taille des colonies doit être déterminée dans les témoins négatifs et positifs. Dans le cas des essais sur TK6$TK^{+/-}$, on peut également déterminer la taille des colonies.

▼B

2. **RÉSULTATS**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Les données doivent comprendre la détermination de la cytotoxicité et de la viabilité, le nombre de colonies et la proportion de mutants dans les cultures traitées et les cultures témoins. Dans le cas d'une réponse positive à l'essai sur L5178Y $TK^{+/-}$, on dénombre les colonies en distinguant les petites des grandes colonies pour au moins une concentration de la substance d'essai (concentration positive la plus élevée) et pour les témoins négatifs et positifs. La nature moléculaire et cytogénétique des deux sortes de colonies de mutants (petites et grandes) a été étudiée en détail (23, 24). Dans l'essai $TK^{+/-}$, les colonies sont recensées sur la base du critère de croissance normale (grandes colonies) et de croissance faible (petites colonies) (25). Les cellules mutantes qui ont subi les altérations génétiques les plus importantes ont un temps de duplication plus long et forment donc de petites colonies. Ces altérations vont de la perte du gène entier à des aberrations chromosomiques se manifestant dans le caryotype. L'induction de petites colonies de mutants a été mise en rapport avec des substances chimiques qui engendrent des aberrations chromosomiques importantes (26). Les cellules mutantes moins affectées croissent à des vitesses semblables à celles des cellules parentales et forment de grandes colonies.

Il convient d'indiquer le taux de survie (efficacité de clonage relative) ou la croissance totale relative. La proportion de mutants doit être exprimée comme le nombre de cellules mutantes divisé par le nombre de cellules survivantes.

Les données individuelles concernant chaque culture doivent être indiquées. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux.

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse manifestement positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées. Les résultats négatifs demandent à être confirmés cas par cas. Si la confirmation de résultats négatifs n'est pas jugée nécessaire, une justification doit être fournie. Pour les essais de confirmation effectués en cas de résultats négatifs ou équivoques, il convient d'envisager une modification des paramètres de l'étude, afin d'élargir la gamme des conditions évaluées. Les paramètres susceptibles d'être modifiés comprennent l'écart entre les doses et les conditions d'activation métabolique.

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement dose-dépendant ou un accroissement reproductible de la proportion de mutants. En premier lieu, il s'agit de prendre en considération la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive.

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

▼B

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas une conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs d'un essai in vitro de mutation génique sur cellules de mammifère indiquent que la substance d'essai induit des mutations géniques dans les cellules de mammifère des cultures utilisées. Une relation dose-réponse positive, si elle est reproductible, est des plus significatives. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, la substance testée n'induit pas de mutation génique dans les cellules de mammifère des cultures utilisées.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule:

— justification du choix du véhicule/solvant,

— solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Cellules:

— type et source des cellules,

— nombre de cultures,

— données concernant le cycle cellulaire,

— nombre de repiquages, le cas échéant,

— méthodes d'entretien des cultures cellulaires, le cas échéant,

— absence de mycoplasme, le cas échéant.

Conditions de l'essai:

— justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris des données relatives à la cytotoxicité et aux limites de solubilité, si elles sont disponibles,

— composition du milieu, concentration de CO_2,

— concentration de la substance d'essai,

— volume de véhicule et de substance d'essai ajouté,

— température d'incubation,

— temps d'incubation,

— durée du traitement,

— densité cellulaire pendant le traitement,

— type et composition du système d'activation métabolique, y compris les critères d'acceptabilité,

— témoins positifs et négatifs,

▼B

— durée de la période d'expression,

— agents sélectifs,

— critères pour conclure que les résultats des essais sont positifs, négatifs ou équivoques,

— méthodes utilisées pour compter le nombre de cellules viables et de cellules mutantes,

— définition de colonies qui sont prises en compte pour le type et pour la taille, y compris les critères pour les «petites» et «grandes» colonies.

Résultats:

— signes de toxicité,

— signes de précipitation,

— données sur le pH et l'osmolalité pendant l'exposition à la substance d'essai, si elles ont été déterminées,

— taille des colonies si elle a été déterminée pour au moins les témoins négatifs et positifs,

— aptitude du laboratoire à déceler des mutants en petites colonies avec le système L5178Y $TK^{+/-}$, le cas échéant,

— relation dose-réponse, si possible,

— analyses statistiques, le cas échéant,

— données concernant les témoins négatifs (solvant ou véhicule) et positifs concomitants,

— données concernant les témoins négatifs (solvant ou véhicule) et positifs antérieurs (étendues, moyennes, écarts-types).

— proportion de mutants.

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Moore, M.M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindall, K. R. (eds.) (1987), *Ranbury Report 28: Mammalian Cell Mutaginesis*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(2) Chu, E. H. Y. and Mailing, H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells in Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 61, pp. 1306-1312.

(3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymiuine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res*., 94, pp. 467-48 5.

(4) Moore, M. M., Harington-Brock. K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, Mutagenesis. 4, pp. 394-403.

▼B

(5) Aaron, C. S. and Stankowski, Jr. L. F. (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res*, 223, pp. 121-128.

(6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res*, 312, pp. 235-239.

(7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., lshidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Gcnotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res*, 257, pp. 147-204.

(8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res*, US, pp. 225-251.

(9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson. J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/ Hvpoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U. S. Environment Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res*, 196, pp. 17-36.

(10) Li, A. P., Carver. J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C, Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Cuanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res*, 189, pp. 135-141.

(11) Liber, H. L, Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res*, 216, pp. 9-17.

(12) Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R. and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-Induced Mutation in AS 52 Cells, *Munition Res*, 160, pp. 133-147.

(13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/TK-/- — $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.

(14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L, Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith, J. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland D. J., ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.

(15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res*, 46, pp. 365-373.

(16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res*, 31, pp. 347-364.

▼B

(17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y$^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutation Res*, 59, pp. 61-108.

(18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res*, 113, pp. 173-215.

(19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcomc, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-lnduced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays, Mutagenesis. 7, pp. 175-177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinatcd Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres. F. J.. Fonts, I. R.. Bend, J. R. and Philpot. R. M. (eds.) Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(21) Krahn, D. F., Barsky. F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds.), *Genoloxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.

(22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis.* 5, pp. 795-801.

(23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burreli, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 51- 55.

(24) Moore. M. M., Clive, D., Hozier, J. C. Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT^{1}) and Mutants of L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.,* 151, pp. 161-174.

(25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.,* 229, pp. 89-102.

(26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small- Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK$^{+/-}$ — 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis* 5, pp. 609-614.

▼B

B.18. **LÉSION ET RÉPARATION D'ADN — SYNTHÈSE NON PROGRAMMÉE DE L'ADN (UDS) — CELLULES DE MAMMIFÈRE — IN VITRO**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITION

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

L'essai de synthèse non programmée de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (UDS) mesure la synthèse de réparation de l'ADN après excision et élimination d'un fragment d'ADN contenant la région lésée par des agents chimiques et physiques. L'essai est basé sur l'incorporation de thymidine tritiée (^{3}H-TdR) dans l'ADN de cellules de mammifère ne se trouvant pas en phase S du cycle cellulaire. On peut déterminer l'incorporation de ^{3}H-TdR en examinant par autoradiographie ou par comptage en scintillation liquide (LSC) l'ADN provenant de cellules traitées. Les cellules de mammifère en culture, à moins que des hépatocytes primaires de rat ne soient utilisés, sont traitées avec la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène. L'UDS peut également être mesurée par des méthodes in vivo.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Les substances d'essai ainsi que les substances témoins ou de référence seront, soit préparées en milieu de culture, soit dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés, puis diluées en milieu de culture avant d'être utilisées dans l'essai. La concentration finale du véhicule ne devrait pas affecter la viabilité cellulaire.

Des cultures primaires d'hépatocytes de rats, de lymphocytes humains ou des lignées cellulaires établies (par exemple fibroblastes humains diploïdes) peuvent être utilisées pour cet essai.

Les cellules seront exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié.

Conditions d'essai

Nombre de cultures

Au moins deux cultures cellulaires pour l'autoradiographie et six cultures cellulaires (ou moins si justifié scientifiquement) pour le comptage en scintillation liquide sont nécessaires pour chaque pont expérimental.

▼B

Utilisation de témoins négatifs et positifs

Des témoins simultanés positifs et négatifs (non traités et/ou véhicule), avec et sans activation métabolique, devraient être inclus dans chaque expérience. Pour l'essai sur hépatocytes de rat, on peut, par exemple, utiliser le 7,12-DMBA (7,12-diméthylbenzanthracène) ou le 2-AAF (2-acétylaminofluorène). Dans le cas de lignées cellulaires établies, on peut, pour les essais par autoradiographie et LSC réalisés sans activation métabolique, utiliser comme témoin positif par exemple le 4-NQO (4-nitroquinoline-N-oxyde); lorsqu'on a recours à des systèmes d'activation métaboliques, la N-diméthylnitrosamine est un des composés témoins positifs utilisables.

Concentration d'exposition

Une gamme de concentrations de la substance d'essai devrait être utilisée afin de permettre de déterminer au mieux la réponse. La concentration maximale devrait produire certains effets cytotoxiques. Les substances relativement insolubles dans l'eau seront testées jusqu'à leur limite de solubilité. En ce qui concerne les substances non toxiques franchement solubles dans l'eau, la concentration maximale à tester devrait être déterminée cas par cas.

Cellules

Pour l'entretien des cultures on aura recours à des milieux de culture, une concentration en CO_2, une température et une humidité appropriées. Les lignées cellulaires établies devraient être périodiquement contrôlées du point de vue de la contamination par *Mycoplasme*.

Activation métabolique

Aucun système d'activation métabolique n'est utilisé pour des cultures primaires d'hépatocytes. Les lignées cellulaires établies et les lymphocytes sont exposés à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié.

Conduite de l'essai

Préparation des cultures

Des lignées cellulaires établies sont obtenues à partir de cultures souches (par exemple par trypsinisation ou par agitation), ensemencées dans des récipients de culture à une densité adéquate et incubées à 37 ºC.

Des cultures à court terme d'hépatocytes de rat sont établies en permettant aux hépatocytes récemment dissociés dans un milieu approprié de s'attacher à la surface de croissance.

Les cultures de lymphocytes humains sont réalisées par des techniques appropriées.

▼B

Traitement des cultures avec la substance d'essai

Hépatocytes primaires de rat:

Des hépatocytes primaires de rat récemment isolés sont traités au moyen de la substance d'essai dans un milieu contenant ^{3}H-TdR, pendant un laps de temps adéquat. À l'issue de la période de traitement, le milieu sera éliminé, les cellules seront rincées, fixées et séchées. Les lames sont plongées dans une émulsion autoradiographique [alternativement une pellicule photographique (*stripping film*) peut être utilisée], exposées, développées, colorées et comptées.

Lignées cellulaires établies et lymphocytes:

Techniques autoradiograpbiques: Les cultures cellulaires sont exposées à la substance d'essai pendant des périodes de temps adéquates, puis traitées à la ^{3}H-TdR. La durée de l'exposition sera fonction de la nature de la substance, de l'activité du système métabolique et du type de cellules. Pour déceler l'acmé de «UDS», la ^{3}H-TdR sera ajoutée soit en même temps que la substance d'essai, soit dans les quelques minutes qui suivent l'exposition à la substance d'essai. Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques sera déterminé par d'éventuelles interactions entre la substance d'essai et la ^{3}H-TdR. Afin de pouvoir faire la distinction entre l'UDS et la réplication semi-conservatrice de l'ADN, on peut inhiber cette dernière en utilisant, par exemple, un milieu déficient en arginine, une faible teneur en sérum ou en ajoutant de l'hydroxyurée dans le milieu de culture.

Mesures l'USC de l'UDS: Avant de procéder au traitement avec la substance d'essai, l'entrée des cellules en phase S sera bloquée de la manière décrite ci-dessus; les cellules sont ensuite exposées à la substance d'essai comme décrit pour l'autoradiographie. À l'issue de la période d'incubation, l'ADN est extrait des cellules et la teneur totale en ADN ainsi que la quantité de ^{3}H-TdR incorporée sont déterminées.

Il faut noter que lorsque des lymphocytes humains sont utilisés, il n'est pas nécessaire de supprimer la réplication semi-conservative de l'ADN dans des cultures non stimulées.

Analyse

Déterminations autoradiographiques

Pour déterminer l'UDS dans des cellules en culture, on ne compte pas les noyaux en phase S. Au moins 50 cellules par concentration seront comptées. Les James seront codées avant comptage. Plusieurs champs choisis au hasard suffisamment éloignés les uns des autres seront comptés sur chaque lame. On déterminera la quantité de ^{3}H-TdR incorporée dans le cytoplasme en comptant trois surfaces de la taille du noyau dans le cytoplasme de chaque cellule comptée.

Détermination LSC

On devrait utiliser un nombre adéquat de cultures pour chaque concentration et pour les témoins lors des déterminations LSC-UDS.

▼B

Tous les résultats sont confirmés au cours d'une expérience indépendante.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats sont présentés sous la forme de tableaux.

2.1. DÉTERMINATIONS AUTORADIOGRAPHIQUES

La quantité de ^{3}H-TdR incorporée dans le cytoplasme ainsi que le nombre de grains comptés par noyau cellulaire seront enregistrés séparément.

La moyenne, la médiane et le mode peuvent être utilisés pour décrire la distribution de la quantité de ^{3}H-TdR incorporée dans le cytoplasme ainsi que le nombre de grains par noyau.

2.2. DÉTERMINATIONS LSC

Pour les déterminations LSC, l'incorporation de ^{3}H-TdR sera indiquée sous la forme de dpm/µg d'ADN. La moyenne des dpm/µg d'ADN moyen avec son écart type peut être utilisé pour décrire la distribution de l'incorporation.

Les données devraient être évaluées par des méthodes statistiques appropriées.

3. **RAPPORT**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

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

— cellules utilisées, densité et nombre de passages au moment du traitement, nombre de cultures cellulaires,

— méthodes utilisées pour l'entretien des cultures cellulaires, y compris milieu, température et concentration en CO_2,

— substance d'essai, véhicule, concentration et justification du choix des concentrations utilisées dans l'essai,

— détails relatifs aux systèmes d'activation métabolique,

— schéma du traitement,

— témoins positifs et négatifs,

— technique autoradiographique utilisée,

— méthodes utilisées pour bloquer l'entrée des cellules en phase S,

— techniques utilisées pour extraire l'ADN et déterminer la quantité totale d'ADN dans les déterminations LSC,

— relation dose-réponse, si possible,

— évaluation statistique,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

▼B

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼B

B.19. **ESSAI IN VITRO D'ÉCHANGE DE CHROMATIDES-SŒURS**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITION

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

L'essai d'échange des chromatides-sœurs (SCE) constitue un test à court terme destiné à déceler les échanges réciproques d'ADN entre deux chromatides-sœurs d'un chromosome se dédoublant. Les SCE-s représentent l'échange réciproque de produits de réplication de l'ADN à des loci apparemment homologues. Le processus d'échange implique probablement une cassure et une réunion de l'ADN, bien que l'on sache peu de choses de sa base moléculaire. Pour déceler des SCE-s, il est nécessaire de pouvoir marquer différemment les chromatides-sœurs; ceci est rendu possible par l'incorporation de bromodésoxyuridine (BrdU) dans l'ADN chromosomique pendant deux cycles cellulaires.

Les cellules de mammifère in vitro sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène de mammifère, le cas échéant, et mises en culture pendant deux cycles de réplication dans un milieu contenant de la BrdU. Après traitement avec un inhibiteur du fuseau (par exemple colchicine) afin d'accumuler les cellules en phase de mitose de type métaphasique (c-métaphase), les cellules sont récoltées et des préparations de chromosomes sont réalisées.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

— Des cultures primaires (lymphocytes humains) ou des lignées cellulaires établies (par exemple cellules ovariennes de hamsters chinois) peuvent être utilisées pour l'essai. Les 'lignées cellulaires seront contrôlées du point de vue de la contamination par des *Mycoplasmes*.

— Des milieux de culture et des conditions d'incubation appropriés (par exemple température, récipients de culture, concentration en CO_2 et humidité) seront utilisés.

— Les substances d'essai peuvent être soit préparées dans des milieux de culture soit dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés avant le traitement des cellules. La concentration finale d'un véhicule dans le milieu de culture ne devrait pas affecter significativement la viabilité des cellules ou le taux de croissance et les effets sur la fréquence de SCE seront contrôlés à l'aide d'un solvant témoin.

▼B

— Les cellules seront exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène de mammifère. Lorsqu'on utilise des types de cellules ayant une activité métabolique intrinsèque, le taux et la nature de l'activité devraient être appropriés à la classe chimique testée.

Conditions d'essai

Nombre de cultures

Deux cultures séparées au moins seront utilisées pour chaque point expérimental.

Utilisation de témoins positifs et négatifs

Des témoins positifs utilisant une substance à action directe et une substance nécessitant une activation métabolique devraient être inclus dans chaque expérience: un témoin devrait être également utilisé pour le véhicule.

Les substances ci-après peuvent par exemple, être utilisées comme témoins positifs:

— substance à action directe:

  — méthanesulfonaté d'éthyle,

— substance à action indirecte:

  — cyclophosphamide.

Le cas échant, un témoin positif supplémentaire appartenant à la même classe chimique que la substance d'essai peut être inclus.

Concentration d'exposition

Au moins trois concentrations de la substance d'essai, convenablement espacées, devraient être utilisées. La concentration maximale produira un effet toxique significatif mais permettra encore une réplication cellulaire adéquate. Des substances relativement insolubles dans l'eau seront testées jusqu'à leur limite de solubilité par des méthodes appropriées. Dans le cas de substances non toxiques franchement solubles dans l'eau, la concentration maximale de la substance d'essai devrait être déterminée cas par cas.

Conduite de l'essai

Préparation des cultures

Des lignées cellulaires établies sont obtenues à partir de cultures souches (par exemple par trypsinisation ou par agitation), ensemencées dans des récipients de culture à une densité adéquate et incubées à 37 ºC. Dans le cas de cultures en couche monocellulaire, le nombre de cellules par récipient de culture devrait être ajusté de manière à ce que les cultures ne soient pas confluentes à plus de 50 % au moment de la récolte. Les cellules peuvent également être utilisées sous une forme de culture en suspension. Les cultures de lymphocytes humains sont préparées à partir de sang hépariné, en utilisant des techniques appropriées, et incubées à 37 ºC.

▼B

Traitement

Des cellules en phase exponentielle de croissance sont exposées à la substance d'essai pendant un laps de temps adéquat, dans la plupart des cas une à deux heures peuvent suffire, mais, dans certains cas, le traitement peut être prolongé pour couvrir jusqu'à deux cycles cellulaires complets. Les cellules n'ayant pas une activité métabolique intrinsèque suffisante devraient être exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. À l'issue de la période d'exposition, les cellules sont lavées de manière à éliminer la substance d'essai et mises en culture, en présence de BrdU pendant deux cycles de réplication. Une autre méthode consiste à exposer simultanément les cellules à la substance d'essai et à la BrdU pendant deux cycles cellulaires complets.

Les cultures de lymphocytes humains sont traitées pendant qu'elles se trouvent dans un état semi-synchrone.

Les cellules sont analysées au cours de leur seconde division après traitement, garantissant ainsi l'exposition des phases les plus sensibles du cycle cellulaire à la substance d'essai. Toutes les cultures additionnées de BrdU seront manipulées dans l'obscurité ou sous un faible éclairage provenant de lampes incandescentes jusqu'au moment de la récolte des cellules, afin de réduire la photolyse de l'ADN contenant de la BrdU.

Récolte des cellules

Les cultures cellulaires sont traitées au moyen d'un inhibiteur du fuseau (par exemple colchicine) une à quatre heures avant leur récolte. Chaque culture est récoltée et traitée séparément pour la préparation des chromosomes.

Préparation des chromosomes et coloration

Les préparations de chromosomes sont effectuées par des méthodes cytogénétiques standard. Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour colorer les lames de manière à faire apparaître les SCE (par exemple la méthode par fluorescence plus Giemsa).

Analyse

Le nombre de cellules analysées sera fonction de la fréquence spontanée témoin de SCE. Habituellement, on analyse au moins 25 métaphases bien étalées par culture afin de compter les SCE. Les lames sont codées avant l'analyse. Pour les lymphocytes humains, seules les métaphases contenant 46 centromères sont analysées. Pour les lignées cellulaires établies, seules les métaphases contenant ± 2 centromères du nombre modal sont analysées. Il sera précisé si une inversion de coloration au niveau de centromère est considérée comme un SCE ou non. Les résultats sont confirmés au cours d'une expérience indépendante.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats devraient être présentés sous la forme de tableaux. Le nombre de SCE par métaphase et le nombre de SCE par chromosome sont donnés séparément pour toutes les cultures traitées et témoins.

Les résultats seront analysés par des méthodes statistiques adéquates.

▼B

3. **RAPPORT**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

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

— cellules utilisées, méthodes d'entretien de la culture cellulaire,

— conditions d'essai: composition des milieux, concentration en CO_2, concentration de la substance d'essai, véhicule utilisé, température d'incubation, temps de traitement, inhibiteur du fuseau utilisé, concentration et durée du traitement avec celui-ci, type de système d'activation de mammifère utilisé, témoins positifs et négatifs,

— nombre de cultures cellulaires par point expérimental,

— détails relatifs à la technique utilisée pour la préparation des lames,

— nombre de métaphases analysées (données indiquées séparément pour chaque culture),

— nombre de SCE par cellule et par chromosome (données indiquées séparément pour chaque culture),

— critère de comptage des SCE,

— justification du choix des doses,

— relation dose-réponse, si possible,

— évaluation statistique,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼B

B.20. **TEST DE LÉTALITÉ RÉCESSIVE LIÉE AU SEXE SUR *DROSOPHILA MELANOGASTER***

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Le test de létalité récessive liée au sexe (*Sex-linked recessive lethal test*: SLRL) utilisant *Drosophila melanogaster* décèle l'apparition de mutations (mutations ponctuelles ainsi que petites délétions), dans la lignée germinale de l'insecte. Cette épreuve constitue un essai de mutation en avant permettant de déceler des mutations à environ 800 loci du chromosome X, soit environ 80 % de tous les loci du chromosome X. Le chromosome X représente approximativement un cinquième du génome haploïde complet.

Les mutations du chromosome X de *Drosophila melanogaster* sont phénotypiquement exprimées chez les mâles porteurs du gène mutant. Lorsque la mutation est létale à l'état hémizygote, sa présence est déduite de l'absence d'un des groupes de descendance mâle sur les deux normalement produits par une femelle hétérozygote. L'épreuve SLRL exploite cette caractéristique en utilisant des chromosomes spécifiquement marqués et possédant des réarrangements de structure.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Stocks

Des mâles d'une lignée de type sauvage bien définie ainsi que des femelles contenant le chromosome Muller-5 peuvent être utilisés. D'autres lignées de femelles adéquatement marquées et porteuses de chromosomes X inversés de façon multiple peuvent également être utilisées.

Substance d'essai

Les substances d'essai sont dissoutes dans l'eau. Les substances insolubles dans l'eau peuvent être dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés (par exemple un mélange d'éthanol et de Tween-60 ou 80), puis être diluées dans de l'eau ou dans une solution saline avant d'être administrées. L'utilisation de diméthylsulfoxyde comme véhicule devrait être évitée.

▼B

Nombre d'animaux

La sensibilité et la signification de l'essai seront prédéterminées. La fréquence de mutants spontanés observée dans le témoin approprié influencera fortement le nombre de chromosomes traités à analyser.

Voie d'administration

L'administration peut être orale, par injection ou par exposition à des gaz ou des vapeurs. L'ingestion de la substance d'essai peut se faire par l'intermédiaire d'une solution sucrée. Si nécessaire, les substances peuvent être dissoutes dans une solution à 0,7 % de NaCl et injectées dans le thorax ou l'abdomen.

Utilisation de témoins négatifs et positifs

Des témoins négatifs (véhicule) et positifs seront inclus. Toutefois, si le laboratoire dispose de données de contrôles historiques adéquats, des témoins simultanés ne sont pas nécessaires.

Niveau d'exposition

Trois niveaux d'exposition seront utilisés. Pour une première évaluation, on peut utiliser un seul niveau d'exposition de la substance d'essai, à savoir, soit la concentration maximale tolérée soit la concentration produisant certains signes de toxicité. Dans le cas de substances non toxiques, on devrait avoir recours à l'exposition à la concentration maximale praticable.

Conduite de l'essai

Des mâles de phénotype sauvage (âgés de 3 à 5 jours) sont traités avec la substance d'essai et individuellement accouplés à plusieurs femelles vierges de la lignée Muller-5 ou d'une autre porteuse d'un marqueur adéquat (à chromosomes X inversés de façon multiple). Tous les deux à trois jours, ces femelles sont remplacées par d'autres femelles vierges afin de couvrir le cycle germinal complet. La descendance de ces femelles est examinée afin de relever les effets létaux correspondant aux effets sur le sperme mature, les spermatides à des stades précoces, moyens ou tardifs, les spermatocytes et les spermatogonies au moment du traitement.

Les femelles F_1 hétérozygotes provenant des croisements susmentionnés sont accouplées individuellement (c'est-à-dire une femelle par flacon) avec leurs frères. À la génération F_2, chaque culture est examinée afin de déceler l'absence de mâles du type sauvage. Si une culture s'avère provenir d'une femelle F_1 porteuse d'un gène létal sur le chromosome X parental (c'est-à-dire qu'aucun mâle porteur du chromosome traité n'est observé), les filles de cette femelle présentant le même génotype seront testées afin de vérifier si la létalité se répète dans la génération suivante.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats devraient être présentés sous forme de tableaux afin de montrer le nombre de chromosomes testés, le nombre de mâles infertiles et le nombre de chromosomes létaux à chaque concentration d'exposition et à chaque période d'accouplement pour chaque mâle traité. Le nombre de groupes de tailles différentes par mâle est indiqué. Les résultats de l'essai seront confirmés au cours d'une expérience séparée.

▼B

Des méthodes statistiques appropriées seront utilisées pour évaluer le test de létalité récessive liée au sexe. Le regroupement de gènes létaux récessifs provenant d'un seul mâle sera pris en considération et évalué par une méthode statistique adéquate.

3. **RAPPORT**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

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

— lignée: lignées ou souches de drosophiles utilisées, âge des insectes, nombre de mâles traités, nombre de mâles stériles, nombre de cultures F_2 établies, nombre de cultures F_2 sans progéniture, nombre de chromosomes porteurs d'un gène létal décelé à chaque stade de la cellule germinale

— critères retenus pour déterminer la taille des groupes traité,

— conditions d'essai: description détaillée du programme de traitement et de prélèvement, niveau d'exposition, données relatives à la toxicité, témoins négatifs (solvant) et positifs, si nécessaire,

— critères de comptage des mutations létales,

— relation exposition/effet, si possible,

— évaluation des données,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼B

B.21. **TESTS DE TRANSFORMATION SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE IN VITRO**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des systèmes de culture de cellules de mammifère peuvent être utilisés pour déceler des modifications phénotypiques *in vitro* induites par des substances chimiques associées à une transformation maligne *in vivo*. Parmi les cellules les plus fréquemment utilisées figurent C3H10T$^{1}/_{2}$, 3T3, SHE, rat Fisher; les tests sont fondés sur des modifications de la morphologie cellulaire, la formation des foyers ou des modifications liées à la croissance ou non dans un agar semi-solide. Il existe des systèmes moins fréquemment utilisés qui décèlent d'autres modifications physiologiques ou morphologiques dans les cellules a l'issue d'une exposition à des cancérogènes chimiques. Aucun des critères analysés dans ces tests *in vitro* n'a de relation mécanistique établie avec le cancer. Certains systèmes de tests sont capables de déceler des promoteurs de tumeur. On peut déterminer la cytotoxicité en mesurant l'effet de la substance d'essai sur les aptitudes à former une colonie (efficacité de clonage) ou sur les taux de croissance des cultures. La mesure de la cytotoxicité a pour but de déterminer si l'exposition à la substance d'essai a été toxicologiquement significative mais ne peut servir à calculer la fréquence des transformations dans toutes les épreuves, étant donné que certaines de celles-ci peuvent nécessiter une incubation prolongée et/ou un réensemencement.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Cellules

Suivant l'épreuve de transformation effectuée, diverses lignées cellulaires ou cellules primaires peuvent être utilisées. L'investigateur veillera à ce que les cellules utilisées pour l'épreuve présentent la modification phénotypique adéquate après exposition à des cancérogènes connus et à ce que la preuve de la validité et de la fiabilité de l'essai effectué dans le laboratoire de l'investigateur soient étayées par des documents.

Milieu

On utilisera des milieux et des conditions d'essai convenant à la méthode de transformation utilisée.

▼B

Substance d'essai

Les substances d'essai peuvent être soit préparées dans des milieux de culture, soit dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés avant le traitement des cellules. La concentration finale du véhicule dans le milieu de culture n'affectera ni la viabilité des cellules, ni le taux de croissance, ni l'incidence de transformation.

Activation métabolique

Les cellules sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système approprié d'activation métabolique de mammifère. Si l'on utilise des types de cellules ayant une activité métabolique intrinsèque, la nature de l'activité sera reconnue comme appropriée à la classe chimique testée.

Conditions d'essai

Utilisation de témoins positifs et négatifs

Des témoins positifs utilisant une substance à action directe et une substance nécessitant une activation métabolique seront inclus dans chaque expérience: un témoin négatif (véhicule) sera également utilisé.

Les substances ci-après peuvent, par exemple, être utilisées comme témoins positifs:

— substances chimiques à action directe:

  — méthanesulfonate d'éthyle,

  — μ-propiolactone,

— substances nécessitant une activation métabolique:

  — 2-acétylaminofluorène,

  — 4-diméthylaminoazobenzène,

  — 7,12-diméthylbenzo(a)anthracène.

Si cela se justifie, un témoin positif supplémentaire appartenant à la même classe chimique que la substance testée devrait être inclus.

Concentrations d'exposition

Plusieurs concentrations de la substance d'essai devraient être utilisées. Ces concentrations devraient produire un effet toxique en rapport avec la concentration, la concentration maximale produira un faible taux de survie, la concentration minimale un taux de survie voisin de celui observé pour le témoin négatif. Les substances relativement insolubles dans l'eau seront testées jusqu'à leur limite de solubilité par des méthodes appropriées. Dans le cas de substances non toxiques très solubles dans l'eau, la concentration maximale devrait être déterminée cas par cas.

▼B

Conduite de l'essai

Les cellules sont exposées pendant un laps de temps adéquat dépendant du système cellulaire utilisé, et ceci peut impliquer un nouveau traitement assorti d'un changement de milieu (et si nécessaire, un nouveau mélange d'activation métabolique) si l'exposition est prolongée. Les cellules n'ayant pas une activité métabolique intrinsèque suffisante devraient être exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. À l'issue de la période d'exposition, les cellules sont lavées de manière à éliminer la substance testée et mises en culture dans des conditions permettant l'apparition du phénotype transformé étudié et l'incidence de cette transformation est déterminée. Tous les résultats sont confirmés au cours d'une expérience indépendante.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats devraient être présentés sous la forme de tableaux et peuvent être combinés différemment suivant la méthode utilisée, par exemple comptage par boîte, boîtes positives ou nombre de cellules transformées. Le cas échéant, le taux de survie sera exprimé en pourcentage des taux témoins; la fréquence de transformation correspondra au nombre de cellules transformées par nombre de survivantes. Les résultats devraient être évalués par des méthodes statistiques appropriées.

3. **RAPPORT**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

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

— type de cellule utilisée, nombre de cultures cellulaires, méthodes d'entretien des cultures cellulaires,

— conditions d'essai: concentration de la substance d'essai, véhicule utilisé, temps d'incubation, durée et fréquence du traitement, densité cellulaire durant le traitement, type de système d'activation métabolique exogène utilisé, témoins positifs et négatifs, spécification du phénotype étudié, système sélectif utilisé (le cas échéant), justification du choix des doses,

— méthode utilisée pouf compter les cellules viables et transformées,

— évaluation statistique,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼B

B.22. **TEST DE LÉTALITÉ DOMINANTE CHEZ LE RONGEUR**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La létalité dominante provoque la mort de l'embryon ou du fœtus. L'induction de létalité dominante par exposition à une substance chimique indique que la substance a altéré le tissu germinal de l'espèce étudiée. Il est généralement admis que la létalité dominante est imputable à une lésion chromosomique (anomalies structurelles et numériques). Si les animaux traités sont des femelles, la mort de l'embryon peut également être due à des effets toxiques.

En général, les mâles sont exposés à la substance d'essai et accouplés avec des femelles vierges non traitées. Les différents stades des cellules germinales peuvent être testés séparément grâce à l'utilisation de périodes d'accouplement séquentielles. L'accroissement du nombre d'implants morts par femelle dans le groupe traité par rapport au nombre d'implants morts par femelle dans le groupe témoin reflète les pertes après implantation. Les pertes avant implantation peuvent être estimées par comptage des corps jaunes ou en comparant le nombre total d'implants par femelle dans le groupe traité et dans le groupe témoin. L'effet total de létalité dominante est égal à la somme des pertes avant et après implantation. Le calcul de l'effet total de la létalité dominante est basé sur la comparaison entre le nombre d'implants vivants par femelle dans le groupe testé et celui enregistré pour le groupe témoin. Une réduction du nombre des implants à certaines périodes peut être due à la destruction de cellules (c'est-à-dire de spermatocytes et/ou de spermatogonies).

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Lorsque c'est possible, les substances d'essai sont dissoutes ou mises en suspension dans une solution saline isotonique. Les substances chimiques insolubles dans l'eau peuvent être dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés. Le véhicule utilisé ne devrait pas interférer avec la substance d'essai et ne devrait pas produire d'effets toxiques. Des préparations fraîchement réalisées de la substance d'essai sont utilisées.

▼B

Conditions d'essai

Voie d'administration

La substance d'essai ne devrait être généralement administrée qu'une seule fois. En fonction des informations toxicologiques disponibles, un programme de traitement répété peut être utilisé. Les voies d'administration habituelles sont l'intubation orale ou l'injection intrapéritonéale. D'autres voies d'administration peuvent être appropriées.

Animaux d'expérience

Il est recommandé d'utiliser des rats ou des souris. De jeunes animaux ayant atteint leur pleine maturité sexuelle sont répartis au hasard entre les groupes traités et témoins.

Nombre et sexe

Un nombre adéquat de mâles traités est utilisé compte tenu de la variabilité spontanée du caractère biologique étudié. Le nombre retenu devrait être fondé sur la sensibilité de détection et le degré de signification qui ont été prédéterminés. Par exemple, dans une expérience type, le nombre de mâles retenus pour chaque groupe de dose devrait être suffisant pour obtenir environ 30 à 50 femelles gravides par période d'accouplement.

Utilisation de témoins négatifs et positifs

Généralement des témoins positifs et négatifs (véhicule) seront inclus simultanément dans chaque expérience. Si des expériences récentes effectuées dans le même laboratoire ont donné des résultats acceptables pour des témoins positifs, ces résultats peuvent être utilisés à la place d'un témoin positif simultané. En ce qui concerne les substances témoins positives, on utilisera une dose faible appropriée (par exemple MMS, i.p., 10 mg/kg), afin de démontrer la sensibilité du test.

Doses

Normalement trois niveaux de dose sont utilisés. La dose élevée produira des signes de toxicité ou réduira la fécondité des animaux traités. Dans certains cas, un seul niveau de dose élevé peut suffire.

Épreuve limite

Les substances non toxiques sont testées à raison de 5 g/kg en cas d'administration unique et de 1 g/kg/jour en cas d'administration multiple.

Conduite de l'essai

Plusieurs schémas de traitement sont possibles. La méthode la plus fréquente est celle de l'administration unique. D'autres schémas de traitement peuvent être utilisés.

Chaque mâle est accouplé séquentiellement à 1 ou 2 femelles vierges non traitées à des intervalles de temps appropriés après le traitement. Les femelles devraient être laissées avec les mâles pendant au moins un cycle œstral complet ou jusqu'à ce que l'accouplement soit constaté par la présence de sperme dans le vagin ou la présence d'un bouchon vaginal.

▼B

Le nombre d'accouplements après traitement est déterminé par le programme de traitement et sera tel que tous les stades des cellules germinates traitées soient impliqués.

Les femelles sont sacrifiées durant la seconde moitié de leur gestation et le contenu de leur utérus est examiné, afin de déterminer le nombre d'implants vivants et morts. Les ovaires peuvent être examinés afin de déterminer le nombre de corps jaunes.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats devraient être présentés sous la forme de tableaux indiquant le nombre de mâles, le nombre de femelles gravides ainsi que le nombre de femelles non gravides. Les résultats de chaque accouplement, y compris l'identité de chaque mâle et de chaque femelle, sont présentés séparément. Pour chaque femelle, la semaine d'accouplement et la dose reçue par les mâles ainsi que les fréquences d'implants vivants et morts sont rapportés.

Le calcul de l'effet total de la létalité dominante est basé sur une comparaison du nombre d'implants vivants par femelle dans le groupe testé avec le nombre d'implants vivants par femelle dans le groupe témoin. Le rapport entre implants vivants et implants morts dans le groupe traité comparé avec le rapport correspondant dans le groupe témoin est analysé en vue d'indiquer la perte après implantation.

Si les résultats sont enregistrés sous la forme de mortalité précoce et de mortalité tardive, les tableaux devraient faire clairement ressortir cette différence. Si la perte avant implantation est évaluée, il y a lieu d'en présenter les résultats. Cette perte peut être exprimée par la différence entre le nombre de corps jaunes et le nombre d'implants ou par la réduction du nombre moyen d'implants par femelle par rapport aux accouplements témoins.

Les résultats sont évalués par des méthodes statistiques appropriées.

3. **RAPPORT**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

— espèces, souche, âge et poids des animaux utilisés, nombre d'animaux de chaque sexe dans les groupes traités et témoins,

— substance d'essai, véhicule, niveaux de dose testés et justification du choix des doses, témoins négatifs et positifs, données relatives à la toxicité,

— voie et programme de traitement,

— programme d'accouplement,

— méthode utilisée pour constater l'accouplement,

— moment du sacrifice,

— critères de comptage des effets de la létalité dominante,

— relation dose-réponse, si possible,

▼B

— évaluation statistique,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼B

B.23. ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR SPERMATOGONIES DE MAMMIFÈRE

1. MÉTHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 483, Essai d'aberration chromosomique sur des spermatogonies de mammifères (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai in vivo d'aberration chromosomique sur spermatogonies de mammifère est destiné à détecter les substances qui causent des aberrations de structure dans les spermatogonies de mammifère (1, 2, 3, 4, 5). Les aberrations de structure peuvent être de deux types: chromosomiques ou chromatidiennes. La majorité des mutagènes chimiques induisent des mutations chromatidiennes, mais des aberrations chromosomiques se produisent également. Cet essai n'est pas conçu pour évaluer les aberrations de nombre et n'est pas utilisé systématiquement dans ce but. Les mutations chromosomiques et les événements liés sont à l'origine de nombreuses maladies génétiques humaines.

Cet essai évalue des atteintes chromosomiques qui surviennent dans tes spermatogonies et devrait par conséquent permettre de prévoir l'introduction de mutations transmissibles à la descendance dans les cellules germinales.

Pour cet essai, on utilise généralement des rongeurs. Cet essai cytogénétique in vivo détecte des aberrations chromosomiques dans les spermatogonies en mitose. D'autres cellules cibles ne font pas l'objet de cette méthode.

Afin de détecter des aberrations chromatidiennes dans les spermatogonies, il faut examiner la première division cellulaire mitotique après le traitement, avant que ces aberrations ne disparaissent lors des divisions cellulaires ultérieures. L'analyse de chromosomes méiotiques peut fournir des informations complémentaires utiles; elle est destinée à mettre en évidence des aberrations de type chromosomique aux stades de la diacinèse-métaphase I, lorsque les cellules traitées se transforment en spermatocytes.

Cet essai in vivo est conçu pour vérifier si les mutagènes actifs sur les cellules somatiques le sont également sur les cellules germinales. L'essai sur spermatogonies se prête particulièrement bien à l'évaluation du risque mutagène, puisqu'il permet de tenir compte de facteurs de métabolisme in vivo, de pharmacocinétique et de processus de réparation de l'ADN.

Les testicules contiennent plusieurs générations de spermatogonies présentant des sensibilités diverses au traitement chimique. De ce fait, les aberrations détectées représentent une réponse globale des populations de spermatogonies traitées, dans lesquelles les cellules différenciées, plus nombreuses, prédominent. En fonction de leur position dans le testicule, les différentes générations de spermatogonies sont ou non exposées aux substances présentes dans la circulation générale en raison de la barrière physique et physiologique des cellules de Sertoli et de la barrière sang-testicule.

L'utilisation de cet essai ne convient pas s'il est manifeste que la substance d'essai ou un métabolite réactif n'atteindra pas le tissu cible.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

Aberration de type chromatidien: lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration de type chromosomique: lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur le même site.

Lacune: une lésion achromatique inférieure à la largeur d'une chromatide, avec un défaut d'alignement minimal des chromatides.

Aberration de nombre: une modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des cellules employées.

Polyploïdie: état multiple du nombre de chromosomes haploïdes (*n*), autre que la diploïdie (c'est-à-dire 3*n*, 4*n*, etc.)

Aberration de structure: modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope au stade de la métaphase et se présentant sous la forme de délétions, de cassures, de modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Les animaux sont exposés à la substance d'essai par une voie d'exposition appropriée et sont sacrifiés à des moments appropriés après le traitement. Avant le sacrifice, les animaux sont traités avec une substance qui bloque les cellules en métaphase (par exemple la colchicine ou Colcemid®). Ensuite, les préparations chromosomiques réalisées à partir des cellules germinales sont colorées et les cellules en métaphase sont examinées pour mettre en évidence les aberrations chromosomiques.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Préparations**

1.4.1.1. *Sélection des espèces animales*

On utilise communément des hamsters chinois et des souris. Des mâles d'autres espèces de mammifères appropriées peuvent cependant être employés. Il convient d'utiliser des animaux adultes jeunes et sains, issus de souches de laboratoire courantes. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne doit pas excéder ± 20 % du poids moyen.

1.4.1.2. *Conditions d'encagement et régime alimentaire*

Les conditions générales décrites dans l'introduction générale de la partie B sont appliquées mais le taux d'humidité devrait se situer aux environs de 50-60 %.

1.4.1.3. *Préparation des animaux*

De jeunes mâles sains sont répartis par randomisation entre les groupes témoins et les groupes traités. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effet dû à leur emplacement. Les animaux sont identifiés individuellement. Ils sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours.

▼B

1.4.1.4. *Préparation des doses*

Les substances d'essai solides sont dissoutes ou mises en suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis éventuellement diluées avant l'administration aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2. **Conditions expérimentales**

1.4.2.1. *Solvant/véhicule*

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas avoir d'effet toxique aux doses utilisées ni présenter de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données sur leur compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela et possible.

1.4.2.2. *Témoins*

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule) doivent accompagner chaque essai. Les animaux des groupes témoins doivent être manipulés exactement comme ceux des groupes traités, mise à part l'administration de la substance d'essai.

Les témoins positifs doivent produire des aberrations chromosomiques de structure in vivo dans les spermatogonies lorsqu'ils sont administrés à des niveaux d'exposition supposés produire un accroissement détectable par rapport au bruit de fond.

Les doses de témoin positif doivent être choisies afin que les effets soient nets mais que l'identité des lames codées ne soit pas révélée immédiatement à l'examinateur. Le témoin positif peut être administré par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai et un seul prélèvement d'échantillon peut suffire. L'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, s'ils sont disponibles. Les substances indiquées dans le tableau ci-dessous sont des exemples de témoins positifs.

Substance	Nº CAS	Nº Einecs
Cyclophosphamide Monohydrate de cyclophosphamide	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Cyclohexylamine	108-91-8	203-629-0
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Acrylamide monomère	79-06-1	201-173-7
Triéthylènemélamine	51-18-3	200-083-5

Lors de chaque prélèvement, il faut inclure un lot d'animaux témoins négatifs traités seulement avec le solvant ou le véhicule et par ailleurs manipulés de la même façon que les groupes traités. Ceci peut être évité si l'on dispose de données acceptables sur la variabilité interindividuelle et la fréquence spontanée de cellules comportant des aberrations chromosomiques provenant de témoins historiques. En outre, des témoins non traités doivent aussi être inclus, à moins que des données historiques ne démontrent que le solvant/véhicule choisi n'induit aucun effet délétère ou mutagène.

▼B

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Nombre d'animaux**

Chaque groupe traité et groupe témoin doit comporter au moins cinq mâles analysables.

1.5.2. **Modalités de traitement**

La substance d'essai est de préférence administrée en une seule fois ou en deux fois (c'est-à-dire en un seul ou deux traitements). Elle peut aussi être administrée en doses fractionnées (deux doses le même jour avec un intervalle de quelques heures au maximum) afin que l'administration d'un grand volume soit plus aisée. D'autres modalités de traitement doivent être scientifiquement justifiées.

Dans le groupe qui reçoit la dose la plus forte, deux prélèvements d'échantillons sont effectués après le traitement. La cinétique cellulaire pouvant être influencée par la substance d'essai, le premier et le deuxième prélèvement ont lieu respectivement environ 24 heures et 48 heures après le traitement. Pour les autres doses, le prélèvement est effectué après 24 heures ou 1,5 cycle cellulaire après le traitement, à moins que l'on sache qu'il existe un autre délai de prélèvement plus propice à la détection des effets (6).

D'autres temps de prélèvement peuvent être employés. Par exemple, dans le cas de substances chimiques qui pourraient induire des chromosomes retardataires ou d'avoir des effets indépendants de la phase S, il peut être judicieux d'effectuer des prélèvements plus précoces (1).

La pertinence d'un traitement répété doit être évaluée au cas par cas. Après un traitement répété, les animaux doivent être sacrifiés 24 heures (1,5 cycle cellulaire) après le dernier traitement. De plus, d'autres temps de prélèvements peuvent être employés si nécessaire.

Avant d'être sacrifiés, les animaux reçoivent une dose appropriée d'un agent bloquant la métaphase (par exemple du Colcemid® ou de la colchicine) par injection intrapéritonéale. Les échantillons sont prélevés après des délais appropriés. Ce délai est d'environ 3-5 heures pour la souris et de 4-5 heures environ pour le hamster chinois.

1.5.3. **Niveaux de dose**

Si une étude préliminaire est réalisée afin d'évaluer les niveaux de dose requis, cette étude doit être effectuée dans le même laboratoire en utilisant la même espèce, la même souche, des animaux du même sexe et les mêmes modalités de traitement que ceux de l'étude principale (7). En cas de toxicité, on utilise trois niveaux de dose pour le premier prélèvement. Ces niveaux de dose doivent couvrir un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale. Pour les prélèvements suivants, seule la dose la plus élevée est utilisée. Celle-ci est définie comme la dose qui produit des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes, administrées suivant la même modalité de traitement, seraient létales.

▼B

Les substances possédant une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les mitogènes) peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évaluées cas par cas. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans les spermatogonies (par exemple une diminution des mitoses des spermatogonies par rapport à la première et la deuxième métaphase méiotique; cette diminution ne devrait pas dépasser 50 %).

1.5.4. **Test limite**

Si un essai réalisé avec au moins 2 000 mg/kg de poids corporel, en une seule dose ou en deux doses administrées le même jour, n'engendre aucun effet toxique observable et si une génotoxicité est improbable d'après les données relatives à des substances de structure voisine, on peut considérer qu'une étude complète avec trois niveaux de doses n'est pas nécessaire. Suivant l'importance de l'exposition humaine probable, on peut envisager d'utiliser des doses plus fortes dans le test limite.

1.5.5. **Voies d'administration**

La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation adaptée, ou par injection intrapéritonéale. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles peuvent être justifiées. Le volume maximal de liquide administré en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 2 ml/100 g de poids corporel. Une justification doit être fournie si des volumes plus importants sont administrés. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

1.5.6. **Préparation des chromosomes**

Des suspensions cellulaires obtenues à partir d'un ou des deux testicules immédiatement après le sacrifice sont exposées à une solution hypotonique et fixées. Les cellules sont ensuite étalées sur des lames et colorées.

1.5.7. **Analyse**

Au moins 100 cellules en métaphase bien étalées sont analysées par animal (soit un minimum de 500 métaphases par groupe d'essai). Ce nombre peut être réduit lorsque les aberrations observées sont nombreuses. Toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent être codées indépendamment avant l'analyse au microscope. Le procédé de fixation provoquant souvent la rupture d'une certaine fraction des cellules en métaphase, ce qui entraîne une perte de chromosomes, les cellules examinées doivent contenir un nombre de centromères égal à $2n \pm 2$.

2. **RÉSULTATS**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. L'unité expérimentale est l'animal. Le nombre de cellules présentant une ou plusieurs aberrations de structure et le nombre d'aberrations par cellule doivent être évalués pour chaque animal. Les différents types d'aberrations chromosomiques de structure doivent être consignés avec leur nombre et leur fréquence pour les groupes traités et témoins. Les lacunes sont enregistrées séparément et rapportées mais ne sont généralement pas incluses dans la fréquence totale des aberrations.

▼B

Pour les cellules en méiose, il conviendra de prendre comme élément de cytotoxicité le rapport du nombre de spermatogonies en métaphase de première mitose/nombre de spermatogonies en métaphase de seconde mitose. Cette analyse sera réalisée à la fois chez les animaux traités et les contrôles négatifs sur un échantillon de 100 cellules en division pour chaque animal. Dans le cas où seules des mitoses sont observées, l'index mitotique doit être déterminé dans au moins 1 000 cellules de chaque animal.

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement, dose-dépendant, du nombre relatif de cellules présentant des aberrations ou une augmentation nette du nombre de cellules présentant des aberrations dans un seul groupe traité à un seul moment de prélèvement. En premier lieu, il s'agit de prendre en considération la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (8) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées.

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas un jugement catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs obtenus dans cet essai in vivo d'aberration chromosomique sur spermatogonies indiquent que la substance induit des aberrations chromosomiques dans les cellules germinales de l'espèce testée. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, la substance testée n'induit pas d'aberrations chromosomiques dans les cellules germinales de l'espèce testée.

Le fait que la substance d'essai ou ses métabolites n'atteignent pas le tissu cible devrait être discuté.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule:

— justification du choix du véhicule,

— solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience:

— espèce/souche utilisée,

— nombre et âge des animaux,

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids individuels des animaux au début de l'essai, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart-type dans chaque groupe.

▼B

Conditions expérimentales:

— résultats de l'étude de détermination des doses utiles, si elle a été réalisée,

— justification du choix des doses employées,

— justification du choix de la voie d'administration,

— détails concernant la préparation de la substance d'essai,

— détails concernant l'administration de la substance d'essai,

— justification du choix des moments de sacrifice,

— conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai dans l'eau de boisson ou la nourriture en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu,

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau,

— description détaillée des modalités de traitement et de prélèvement,

— méthodes de mesure de la toxicité,

— nature et concentration de l'inhibiteur du fuseau mitotique et durée du traitement,

— méthodes de préparation des lames,

— critères de dénombrement des aberrations,

— nombre de cellules analysées par animal,

— critères de décision concernant les résultats positifs, négatifs et équivoques.

Résultats:

— signes de toxicité,

— index mitotique,

— taux de mitoses des spermatogonies par rapport à la première et la deuxième métaphase méiotique,

— type et nombre d'aberrations, séparément pour chaque animal,

— nombre total d'aberrations par groupe,

— nombre de cellules présentant des aberrations par groupe,

— relation dose-réponse, si possible,

— analyses statistiques, le cas échéant,

— données sur les témoins négatifs concomitants,

— données sur les témoins négatifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types),

— données sur les témoins positifs concomitants,

— changements de la ploïdie, le cas échéant.

Discussion des résultats.

Conclusions.

▼B

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals. Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*, Ramel, C, Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York. pp. 477-484.

(2) Adler, I. D. (1984), Cytogenic tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford. C. E. (1964), An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, *Cytogenetics and Cell Genetics*. 3, pp. 289-294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson L. (1990), In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenidty Testing. Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res.*, 52. pp. 207-209.

(6) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman,]., Favor, j., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, *Mutation Res.*, 312, pp. 313-318.

(7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson- Walker, G., Morton, D. B., Kirkland D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.

(8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mulagenicity Testing, report. Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

▼B

B.24. **SPOT TEST CHEZ LA SOURIS**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITION

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Il s'agit d'une épreuve in vivo effectuée sur souris dont les embryons en développement sont exposés à la substance d'essai. Les cellules visées des embryons en développement sont des mélanoblastes et les gènes cibles sont ceux responsables de la pigmentation des poils. Les embryons en développement sont hétérozygotes pour un certain nombre de ces gènes. Une mutation au niveau de l'allèle dominant ou la perte de l'allèle dominant (suite à divers événements génétiques) d'un tel gène dans un mélanoblaste se traduit par l'expression du phénotype récessif dans les cellules qui en sont issues, ce qui entraîne l'apparition d'une tache d'une autre couleur dans le pelage de la souris nouveau-née. Le nombre de descendants porteurs de taches (mutations) est compté et la fréquence de celles-ci est comparée à celle observée pour la descendance issue des embryons traités uniquement avec le solvant. Le *spot test* chez la souris décèle des mutations présumées somatiques au niveau des cellules fœtales.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Lorsque c'est possible, les substances d'essai sont dissoutes ou mises en suspension dans une solution saline isotonique. Les substances insolubles dans l'eau sont dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés. Le véhicule utilisé ne devrait pas interférer avec la substance d'essai et ne devrait pas produire d'effets toxiques. Des préparations de la substance d'essai fraîchement réalisées seront utilisées.

Animaux d'expérience

Des souris de la souche T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d; piebald spotting, s/s) sont accouplées soit avec la souche HT (pallid, nonagouti, brachypodie, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, In fz/ln fz; pearl pe/pe) ou avec C57 BL (nonagouti, a/a). D'autres croisements appropriés tels que NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) et DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute d/d) peuvent être utilisés à condition de donner une descendance nonagouti.

▼B

Nombre et sexe

On traite un nombre suffisant de femelles gravides de manière à obtenir un nombre adéquat de descendants vivants pour chaque dose utilisée. La taille de l'échantillon dépend du nombre de taches observées chez les souris traitées ainsi que l'importance du nombre de données témoins. Un résultat négatif ne peut être accepté que si au moins 300 descendants de femelles traitées avec la dose maximale ont été examinés.

Témoins négatifs et positifs

Simultanément, on devrait disposer de résultats de souris traitées uniquement avec le véhicule (témoins négatifs). Des données témoins historiques provenant du même laboratoire peuvent être rassemblées afin d'améliorer la sensibilité de l'essai, à condition que ces données soient homogènes, à l'issue d'un traitement avec un produit chimique réputé mutagène dans cet essai. Si la substance d'essai ne se révèle pas mutagène, des données obtenues récemment par le même laboratoire pour un contrôle positif connu pour être mutagène dans cette épreuve devraient être disponibles.

Voie d'administration

Les voies d'administration habituelles sont l'intubation orale et l'injection péritonéale des femelles gravides. Le traitement par inhalation ou d'autres voies d'administration est utilisé, le cas échéant.

Doses

On utilise au moins deux doses dont une faisant apparaître des signes de toxicité ou réduisant le taille des portées. Dans le cas de substances non toxiques, on aura recours à un traitement à la dose maximale utilisable.

Conduite de l'épreuve

Un traitement unique est normalement administré aux huitième, neuvième et dixième jours de gestation, le jour 1 étant le jour où l'on observe pour la première fois la présence d'un bouchon vaginal. Ces jours correspondent à 7,25, 8,25 et 9,25 jours après la conception. Des traitements successifs peuvent être effectués pendant ces jours.

Analyse

Trois à quatre semaines après la naissance, la descendance est codée et examinée pour la présence de taches. On distingue trois classes de taches:

a) les taches blanches situées à moins de 5 mm de la ligne médio-ventrale présumées résulter de mort cellulaire (WMVS);

b) les taches jaunes, de type agouti, associées aux mamelles, aux organes sexuels, à la gorge, aux régions axillaire et inguinale ainsi qu'au milieu du front, présumées être dues à un manque de différenciation (MDS)

c) les taches pigmentées et blanches, réparties au hasard sur le pelage, présumées être dues à des mutations somatiques (RS).

▼B

Les trois classes sont comptées mais seule la dernière c'est-à-dire RS, a une signification génétique. Les problèmes que pose la distinction entre les types MDS et RS peuvent être résolus en examinant des échantillons de poils au microscope à fluorescence.

Les anomalies morphologiques macroscopiques évidentes observées sur la descendance seront notées.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats sont présentés en donnant le nombre total de jeunes examinés et le nombre de jeunes présentant une ou plusieurs taches présumées être dues à une mutation somatique. Les résultats sont également présentés en se référant à la portée comme unité. Les résultats relatifs aux animaux traités et aux témoins négatifs sont comparés par des méthodes statistiques appropriées.

3. **RAPPORT**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

— souches utilisées dans le croisement,

— nombre de femelles gravides dans les groupes traités et témoins,

— taille moyenne des portées dans les groupes traités et témoins à la naissance et au sevrage,

— doses de la substance d'essai,

— solvant utilisé,

— jour de la gestation auquel le traitement est administré,

— voie d'administration,

— nombre total de jeunes examinés ainsi que le nombre de ceux présentant une WMVS, MDS et RS dans les groupes traités et témoins,

— anomalies morphologiques macroscopiques,

— relation dose/effet de RS si possible,

— évaluation statistique,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼B

B.25. **TRANSLOCATION HÉRÉDITAIRE CHEZ LA SOURIS**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITION

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPES DE LA MÉTHODE D'ESSAI

L'épreuve de translocation héréditaire chez la souris décèle des changements chromosomiques structurels et numériques dans les cellules germinales de mammifères tels qu'ils sont mis en évidence dans la descendance de première génération. Les types de changements chromosomiques détectés sont des translocations réciproques et, si la descendance femelle est incluse, la perte du chromosome X. Les porteurs de translocations et les femelles XO présentent une fertilité réduite permettant la sélection d'une descendance F_1 en vue d'une analyse cytogénétique. Une stérilité totale est due à certains types de translocations (autosome X et type c-t). Les translocations sont observées cytogénétiquement dans les cellules méiotiques en diacinèse-métaphase I des individus mâles, qu'il s'agisse de mâles F, ou de fils de femelles F_1. Les femelles XO sont identifiées cytogénétiquement par la présence de 39 chromosomes seulement dans des mitoses de la moelle osseuse.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Les substances d'essai sont dissoutes dans une solution saline isotonique. Si elles sont insolubles dans l'eau, elles sont dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés. On utilise des solutions fraîchement préparées de la substance d'essai. Si un véhicule est utilisé pour faciliter le traitement, il ne doit pas interférer avec la substance d'essai et ne pas produire d'effets toxiques.

Voie d'administration

Les voies d'administration sont habituellement l'intubation orale ou l'injection intrapéritonéale. D'autres voies d'administration peuvent être appropriées.

Animaux d'expérience

Pour faciliter l'élevage et la vérification cytologique, ces expériences sont effectuées avec des souris. Aucune souche spécifique de souris n'est requise. Toutefois, la taille moyenne d'une portée de la souche utilisée devra être supérieure à 8 et être relativement constante.

Des animaux sains ayant atteint leur maturité sexuelle seront utilisés.

▼B

Nombre d'animaux

Le nombre d'animaux nécessaires dépend de la fréquence de translocations spontanées ainsi que du taux minimal d'induction requis pour un résultat positif.

L'essai consiste habituellement en une analyse de la descendance mâle F_1. Au moins 500 descendants mâles F_1 sont testés par groupe de dose. Si la descendance femelle F_1 est incluse, 300 mâles et 300 femelles sont nécessaires.

Contrôles

Des résultats de contrôles adéquats provenant d'épreuves réalisées simultanément et de contrôles historiques doivent exister. S'il existe des résultats acceptables de contrôles positifs provenant d'expériences récemment effectuées dans le même laboratoire, ces résultats peuvent être utilisés à la place de contrôles positifs simultanés.

Doses

Une dose est testée, il s'agit habituellement de la dose maximale associée à la production d'effets toxiques minimaux mais n'affectant pas le comportement reproducteur ou la survie. Pour établir une relation dose/réponse, deux autres doses plus faibles sont nécessaires. Dans le cas de substances non toxiques, on devrait avoir recours à une exposition à la dose maximale possible.

Conduite de l'essai

Traitement et accouplement

Deux programmes de traitement existent. L'administration unique de la substance d'essai est la méthode la plus fréquente. La substance d'essai peut également être administrée 7 jours sur 7 pendant 35 jours. Le nombre d'accouplements après traitement est déterminé par le programme de traitement et sera tel que tous les stades des cellules germinales traitées soient impliqués. À l'issue de la période d'accouplement, les femelles sont placées dans des cages individuelles. Lorsqu'elles ont mis bas, la date, la taille de la portée et le sexe des jeunes sont enregistrés. Toute la descendance mâle est sevrée et toute la descendance femelle est écartée à moins d'être incluse dans l'expérience.

Recherche des hétérozygotes de translocation

On utilise une des deux méthodes disponibles:

— analyse de la fécondité de la descendance F_1 et vérification ultérieure d'éventuels porteurs de translocations par analyse cytogénétique,

— analyse cytogénétique de tous les mâles F_1 sans sélection préalable par vérification de la fécondité.

a) Analyse de la fécondité:

La fécondité réduite d'un individu F_1 peut être déterminée en observant la taille de la portée et/ou en analysant le contenu utérin des partenaires femelles.

Il y a lieu de fixer les critères de détermination de la fécondité normale et réduite de la souche de souris utilisée.

▼B

Observation de la taille de la portée: Les mâles F_1 à tester sont placés dans des cages individuelles avec des femelles provenant soit de la même expérience soit de la colonie. Les cages sont inspectées quotidiennement à partir du dix-huitième jour qui suit l'accouplement. La taille de la portée et te sexe de la descendance F_2 sont enregistrés au moment de la naissance et les jeunes sont ensuite éliminés. Si la descendance femelle F_1 est testée, les descendants F_2 provenant de petites portées sont conservés en vue d'une analyse plus approfondie. Les femelles porteuses de translocation font l'objet d'une vérification par analyse cytogénétique d'une translocation dans n'importe lequel de leurs descendants mâles. Les femelles XO sont identifiées par la modification du rapport des sexes dans leur descendance, rapport qui passe de 1:1 à 1:2 mâles/femelles. Dans une méthode séquentielle, les animaux F_1 normaux ne font pas l'objet d'une autre vérification si la première portée F_2 atteint ou dépasse une valeur normale prédéterminée, sinon une deuxième ou une troisième portée F_2 sont observées. Les animaux F_1 qui ne peuvent pas être classés comme normaux après observation de jusqu'à trois portées F_2 maximum sont soit soumis à un nouveau contrôle par le biais d'une analyse du contenu utérin de leurs partenaires femelles soit directement soumis à une analyse cytogénétique.

Analyse du contenu utérin: La réduction de la taille des portées chez les porteurs de translocation est due à la mort des embryons, de sorte qu'un grand nombre d'implants morts indique la présence d'une translocation chez l'animal soumis au test. Chaque mâle F_1 à tester est accouplé à 2 ou 3 femelles. On constate la conception en examinant les femelles tous les matins afin de déceler la présence de bouchons vaginaux. Les femelles sont sacrifiées 14 à 16 jours plus tard et le nombre d'implants vivants et morts présents dans leur utérus est enregistré.

b) Analyse cytogénétique:

Les préparations de testicules sont effectuées par la méthode de séchage à l'air. Les porteurs de translocations sont identifiés par la présence de configurations multivalentes en diacinèse métaphase I dans les spermatocytes primaires. L'observation d'au moins 2 cellules présentant une association multivalente constitue la preuve nécessaire que l'animal testé est porteur d'une translocation.

Si aucune sélection par analyse de fécondité n'a été effectuée, tous les mâles F_1 sont soumis à un examen cytogénétique. Un minimum de 25 diacinèses métaphases I par mâle doivent être analysées au microscope. L'examen des métaphases mitotiques, des spermatogonies ou de la moelle osseuse est requise pour les mâles F_1 ayant de petits testicules et présentant un arrêt méiotique avant diacinèse ou pour les femelles F_1 suspectées d'être XO. La présence inhabituelle d'un chromosome long et/ou court dans 10 cellules est la preuve d'une translocation particulière entraînant la stérilité du mâle (type c-t). Quelques translocations X autosomes provoquant la stérilité du mâle peuvent uniquement être identifiées par une analyse des bandes de chromosomes mitotiques. La présence de 39 chromosomes dans 10 mitoses sur 10 est la preuve d'un état XO chez une femelle.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats sont présentés sous forme de tableaux.

La taille moyenne des portées et le rapport entre les sexes sont enregistrés à la naissance et au sevrage pour chaque période d'accouplement.

▼B

Lors de l'évaluation de la fécondité des animaux de F_1, la taille moyenne des portées issues de tous les accouplements normaux ainsi que la taille individuelle des portées issues d'animaux F_1 porteurs de translocation sont présentées. En ce qui concerne l'analyse du contenu utérin, le nombre moyen d'implants vivants et morts issus d'accouplements normaux et le nombre d'implants vivants et morts pour chaque accouplement de porteurs de translocation F_1 sont notés.

Lors de l'analyse cytogénétique de la diacinèse-métaphase I, le nombre des différents types de configurations multivalentes et le nombre total de cellules sont relevés pour chaque porteur de translocation.

Pour les individus stériles F_1, le nombre total d'accouplements et la durée de la période d'accouplement sont indiqués. Le poids des testicules et les détails de l'analyse cytogénétique sont indiqués.

Pour les femelles XO, on indique la taille moyenne de la portée, le rapport entre les sexes dans la descendance F_2 ainsi que les résultats de l'analyse cytogénétique.

Si d'éventuels porteurs de translocation F_1 sont présélectionnés par des tests de fécondité, les tableaux mentionneront combien parmi eux ont été confirmés comme étant des hétérozygotes de translocation.

Les données relatives aux témoins négatifs ainsi que les expériences témoins positives sont présentées.

3. **RAPPORT**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

— souche de souris, âge des animaux, poids des animaux traités,

— nombre d'animaux parents de chaque sexe dans les groupes traités et témoins,

— conditions d'essai, description détaillée du traitement, doses, solvants, programme d'accouplement,

— nombre et sexe des jeunes par femelle, nombre et sexe des jeunes élevés en vue d'une analyse de translocation,

— moment et critères de l'analyse de translocation,

— nombre et description détaillée des porteurs de translocation, y compris données relatives à l'élevage et au contenu utérin, si possible,

— méthodes cytogénétiques et détails de l'analyse microscopique, de préférence avec clichés,

— évaluation statistique,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

▼B

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼B

B.26. **ESSAI DE TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR VOIE ORALE TOXICITÉ ORALE À DOSES RÉPÉTÉES — RONGEURS: 90 JOURS**

1. **MÉTHODE**

La méthode décrite pour cet essai de toxicité orale subchronique reprend la ligne directrice nº 408 de l'OCDE (1998).

1.1. INTRODUCTION

Lors de l'appréciation et de l'évaluation des caractéristiques toxiques d'un produit chimique, la détermination de la toxicité subchronique par voie orale à doses répétées peut s'effectuer après avoir obtenu des informations préliminaires sur la toxicité à partir d'essais de toxicité aigué ou à doses répétées sur 28 jours. L'étude sur 90 jours fournit des informations sur les dangers que peut entraîner pour la santé une exposition réitérée durant une période prolongée, période qui s'étend du sevrage jusqu'à l'état adulte. L'étude fournira des informations sur les principaux effets toxiques, indiquera les organes cibles et les possibilités d'accumulation et pourra donner une estimation de la dose sans effet toxique (NOAEL) qui pourra être utilisée pour sélectionner des doses en vue d'études chroniques et pour établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine.

La méthode accorde davantage d'importance aux effets neurologiques et donne des indications relatives aux effets sur le système immunitaire et sur la reproduction. Elle insiste également sur la nécessité d'observer très attentivement les animaux sur le plan clinique, en vue d'obtenir le plus d'informations possible. Cette étude devrait permettre de repérer les produits chimiques susceptibles d'avoir une action neurotoxique ou des effets sur le système immunitaire ou les organes reproducteurs, pouvant justifier des études plus approfondies.

Voir également introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Dose: quantité de substance d'essai administrée. La dose est exprimée en poids (g, mg), en poids de substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (par exemple, mg/kg) ou en concentration constante dans la nourriture (ppm).

Dosage: terme général recouvrant la dose, sa fréquence et la durée de l'administration.

DSET: abréviation de dose sans effet toxique (NOAEL: No Observable Adverse Effect Level}, c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif lié au traitement n'est observé.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Différentes doses de la substance d'essai sont administrées quotidiennement par voie orale à plusieurs groupes d'animaux de laboratoire, à raison d'un niveau de dose par groupe et ce pendant une période de 90 jours. Les animaux sont observés attentivement pendant la période d'administration afin de déceler d'éventuels signes de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés au cours de l'essai sont autopsiés: au terme de l'essai, les animaux suivants sont également sacrifiés et autopsiés.

▼B

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.4.1. **Préparation des animaux**

Il convient d'utiliser des animaux en bonne santé, ayant été acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours et qui n'ont pas encore été sujets d'expériences. L'espèce, la race, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience doivent être précisés. Les animaux seront répartis au hasard entre les groupes traités et les groupes témoins. Les cages doivent être placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats de l'étude soit réduite au minimum. Un numéro d'identification unique est attribué à chaque animal.

1.4.2. **Préparation des doses**

La substance d'essai est administrée par gavage ou dans les aliments ou dans l'eau de boisson. Le mode d'administration par voie orale dépend de l'objectif de l'étude et des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai.

S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. On recommande, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager d'abord l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, ensuite une solution ou une émulsion dans une huile (par exemple l'huile de maïs) et en dernier lieu une solution dans d'autres véhicules. La toxicité des véhicules autres que l'eau doit être connue. La stabilité de la substance d'essai dans les conditions d'administration doit être déterminée.

1.4.3. **Conditions d'essai**

1.4.3.1. *Animaux d'expérience*

L'espèce préférée est le rat, bien que d'autres espèces de rongeurs, notamment la souris, puissent être utilisées. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes, sains, issus de souches de laboratoire courantes. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. L'administration doit commencer dès que possible après le sevrage et en aucun cas au-delà de l'âge de 9 semaines. Au début de l'étude, les différences de poids entre les animaux utilisés doivent être minimales et ne pas excéder ± 20 % de la moyenne du poids de chaque sexe. Lorsque l'essai est conduit à titre d'étude préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, il faut utiliser des animaux issus de la même souche et de la même source dans les deux études.

1.4.3.2. *Nombre et sexe*

Au moins 20 animaux (10 femelles et 10 mâles) doivent être utilisés pour chaque dose. Si on a prévu de sacrifier des animaux en cours d'essai, il convient d'accroître ce nombre du nombre d'animaux qui doivent être sacrifiés en cours d'essai. En fonction des connaissances dont on dispose au préalable sur le produit chimique ou sur un produit de structure très proche, on pourra envisager d'inclure un groupe satellite supplémentaire de 10 animaux (5 par sexe) dans le groupe témoin et dans le groupe traité à la plus forte dose, afin d'observer, une fois la période de traitement terminée, la persistance ou la réversibilité de tout effet toxique. La durée de cette période post-traitement devrait être fixée en fonction des effets observés.

▼B

1.4.3.3. *Niveaux de dose*

Il faut utiliser au minimum trois doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 1.4.3.4). Les niveaux de dose peuvent être établis en fonction des résultats obtenus lors d'études à doses répétées ou d'études préliminaires et doivent tenir compte de toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques disponibles sur la substance d'essai ou de substances apparentées. Sauf contraintes dues aux propriétés physico-chimiques de la substance ou à ses effets biologiques, la dose la plus élevée doit être choisie en vue de provoquer un effet toxique, mais ni la mort ni d'intenses souffrances. Une série de doses décroissantes doit être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une dose sans effet toxique (DSET) à la dose la plus faible. Des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (par exemple séparés par un facteur supérieur à 6-10) entre les doses.

Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et qu'elle entraîne une diminution de la prise de nourriture, il peut être utile d'utiliser un groupe témoin nourri en parallèle afin de déterminer si la diminution est due aux caractéristiques organoleptiques ou à des altérations toxicologiques du modèle d'essai.

Il convient également d'être attentif aux caractéristiques suivantes du véhicule ou d'autres additifs, selon le cas: effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la consommation alimentaire et hydrique ou sur l'état nutritionnel des animaux.

1.4.3.4. *Essai limite*

Si un essai pratiqué avec une seule dose équivalant à au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, en suivant le mode opératoire décrit pour cette étude, ne produit aucun effet nocif observé et s'il n'y a pas de raison de penser que la substance soit toxique compte tenu des données dont on dispose au sujet de substances ayant une structure analogue, on peut considérer qu'il n'est pas nécessaire de réaliser une étude complète avec trois niveaux de dose. L'essai limite est valable sauf dans le cas où l'exposition humaine puisse advenir à des doses plus élevées.

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Administration des doses**

Les animaux reçoivent une administration quotidienne de la substance d'essai, sept jours sur sept, durant 90 jours. Tout autre régime d'administration, par exemple cinq jours par semaine, doit être justifié. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, une dose unique devrait être dispensée aux animaux par une sonde gastrique ou une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide administrable en une fois dépend de la taille de l'animal. Le volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où il peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Sauf pour les substances irritantes ou corrosives, qui provoqueront normalement des effets exacerbés aux concentrations plus élevées, il convient de réduire au minimum la variabilité du volume d'essai en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à toutes les doses.

▼B

Si la substance d'essai est administrée dans les aliments ou l'eau de boisson, il importe de s'assurer que sa quantité n'interfère pas avec la nutrition normale ni avec l'équilibre hydrique. Lorsque la substance d'essai est incorporée aux aliments, on peut soit appliquer une concentration constante dans les aliments (ppm), soit une dose constante par rapport au poids corporel de l'animal; il y a lieu de spécifier la méthode utilisée. Si la substance est administrée par gavage, la dose doit être administrée à la même heure chaque jour et ajustée si nécessaire pour rester constante par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'une étude sur 90 jours sert de préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, un régime alimentaire semblable doit être utilisé dans les deux études.

1.5.2. **Observations**

La période d'observation doit durer au moins 90 jours. Les animaux d'un groupe satellite destinés à des observations ultérieures ne doivent recevoir aucun traitement pendant une période appropriée pour que l'on puisse constater la persistance ou la disparition des effets toxiques.

Il faudra effectuer un examen clinique général au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en tenant compte de la période après l'administration pour laquelle des effets observables les plus marqués sont prévisibles. L'état clinique des animaux doit être noté. Deux fois par jour au minimum, généralement au début et à la fin de chaque journée, tous les animaux doivent être examinés afin de déceler des symptômes de morbidité et de mortalité.

Un examen clinique détaillé doit être pratiqué sur tous les animaux au moins une fois avant la première exposition (pour pouvoir effectuer des comparaisons sur un même individu), et ensuite une fois par semaine. Ces examens doivent être effectués hors de la cage, de préférence dans une enceinte normalisée, et à heure fixe. Ils doivent être soigneusement consignés, de préférence en utilisant un système de notation explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Les conditions d'observation doivent demeurer aussi constantes que possible. Les symptômes relevés devraient inclure, de façon non limitative, les changements affectant la peau, la fourrure, les yeux, les muqueuses, la fréquence des sécrétions et des excrétions ainsi que l'activité autonome (sécrétion de larmes, horripilation, diamètre de la pupille, respiration anormale). Il convient également de noter les changements dans la démarche, le maintien et les réactions à la manipulation ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, de stéréotypes (par exemple, soins corporels excessifs, animaux tournant en rond de façon répétitive) et de comportements bizarres (par exemple, automutilation, marche à reculons) (1).

À l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareillage approprié équivalent, il y a lieu d'effectuer, avant l'administration de la substance à tester et au terme de l'étude, un examen ophtalmologique, de préférence sur tous les animaux mais au minimum sur le groupe d'animaux exposés à la dose la plus élevée et sur le groupe témoin. Si on décèle des changements dans les yeux de ces animaux, tous les autres animaux doivent être examinés.

Vers la fin de la période d'exposition, mais en aucun cas avant la onzième semaine, il faut vérifier la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (1) (auditifs, visuels et proprioceptifs, par exemple) (2) (3) (4), et évaluer la force de préhension (5) et l'activité motrice (6). Des détails supplémentaires sur les méthodes utilisables figurent dans les références respectives. Des méthodes non décrites dans les références peuvent aussi être appliquées.

Les observations fonctionnelles préconisées vers la fin de l'étude ne sont pas indispensables si on dispose d'observations fonctionnelles provenant d'autres études et que les examens cliniques quotidiens n'ont pas révélé de troubles fonctionnels.

▼B

Exceptionnellement, les observations fonctionnelles peuvent aussi être omises pour des groupes qui par ailleurs présentent des symptômes de toxicité à un degré tel qu'ils interféreraient sensiblement avec le déroulement de l'essai fonctionnel.

1.5.2.1. *Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau*

Tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. On mesurera la consommation de nourriture au moins une fois par semaine. Si la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la consommations d'eau doit aussi être mesurée au moins une fois par semaine. Il est également recommandé de mesurer la consommation d'eau, dans le cas d'étude où la substance d'essai est administrée dans les aliments ou par gavage, si celle-ci risque d'être modifiée.

1.5.2.2. *Hématologie et biochimie clinique*

Des prélèvements de sang doivent être pratiqués à des sites déterminés et les échantillons, stockés, s'il y a lieu, dans des conditions appropriées. À la fin de la période d'essai, des prélèvements sont réalisés juste avant le sacrifice des animaux ou au cours de celui-ci.

On procédera aux examens hématologiques suivants au terme de la période d'essai et sur les prises de sang effectuées en cours d'essai, le cas échéant: hématocrite, concentration d'hémoglobine, numération des érythrocytes et des leucocytes, formule leucocytaire, numération des plaquettes et mesure du temps de coagulation.

Les analyses de biochimie clinique destinées à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur les reins et le foie, devraient être pratiquées sur des échantillons de sang prélevés sur chaque animal juste avant son sacrifice ou au cours de celui-ci (à l'exception des animaux trouvés moribonds et/ou sacrifiés avant la fin de l'essai). A l'instar des examens hématologiques, les analyses de biochimie clinique peuvent être conduites sur des échantillons de sang prélevés en cours d'essai. Il est recommandé de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang ([1]). Les analyses effectuées sur le plasma ou le sérum devraient comprendre le sodium, le potassium, le glucose, le cholestérol total, l'urée, l'azote uréique du sang, la créatinine, les concentrations totales de protéines et d'albumine et plus de deux enzymes indicatrices des effets hépatocellulaires (telles que l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatage alcaline, la gamma glutarmyle transpeptidase et la sorbitol déshydrogenase). Des mesures d'activités enzymatiques supplémentaires (d'origine hépatique ou autre) et des acides biliaires, susceptibles de fournir des informations utiles dans certaines circonstances, peuvent également être incluses.

Les analyses d'urine suivantes peuvent être réalisées, à titre facultatif, au cours de la dernière semaine de l'étude sur des échantillons d'urine prélevés à des moments déterminés: apparence, volume, osmolalité ou densité, pH, protéines, glucose, sang et cellules sanguines.

Il faut envisager par ailleurs de rechercher les indicateurs sériques de lésions générales des tissus. Si les propriétés connues de la substance d'essai risquent ou sont soupçonnées d'affecter des courbes métaboliques connexes, d'autres analyses devraient être pratiquées, notamment celles du calcium, du phosphore, des triglycérides à jeun, d'hormones spécifiques, de la méthémoglobine et de la cholinestérase. Ces analyses doivent être définies pour certaines classes de produits chimiques ou au cas par cas.

([1]) Pour un certain nombre de paramètres mesurés dans le sérum ou le plasma, et particulièrement pour le glucose, il est préférable de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang, et ce essentiellement afin d'éviter l'accroissement de variabilité qui découlerait inévitablement de la prise de nourriture et qui aurait tendance à masquer des effets plus subtils, rendant de ce fait l'interprétation difficile. Cependant, le jeûne des animaux durant une nuit entière peut influer sur leur métabolisme général et risque, notamment dans les études où la substance d'essai est administrée dans la nourriture, de perturber l'exposition quotidienne à la substance d'essai. Si on a choisi de faire jeûner les animaux toute la nuit, les analyses de biochimie clinique doivent être réalisées après les observations fonctionnelles de l'étude.

▼B

Il convient d'une façon générale de suivre une démarche souple, adaptée à l'espèce et aux effets observés et/ou escomptés d'une substance donnée.

Si les données historiques sont insuffisantes, il y a lieu d'envisager la détermination de paramètres d'hématologie et de biochimie clinique avant de commencer l'étude; il est généralement déconseillé d'obtenir ces données avant le traitement (7).

1.5.2.3. *Autopsie*

Tous les animaux de l'étude feront l'objet d'une autopsie complète et détaillée, comportant l'examen attentif de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie, les reins, les glandes surrénales, les testicules, les épididymes, l'utérus, les ovaires, le thymus, la rate, le cerveau et le cœur de tous les animaux (à l'exception des animaux moribonds et/ou sacrifiés avant la fin de l'essai) doivent être disséqués et pesés à l'état frais dès que possible afin d'éviter leur dessiccation.

Les tissus suivants doivent être conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu: tous les organes présentant des lésions macroscopiques, l'encéphale (les régions représentatives du cerveau, du cervelet, de la moelle et du pont), la moelle épinière (à trois niveaux: cervical, médio-thoracique et lombaire), l'hypophyse, la thyroïde, les glandes parathyroïdes, le thymus, l'œsophage, les glandes salivaires, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, le pancréas, les reins, les glandes surrénales, la rate, le cœur, la trachée et les poumons (traités par gonflement avec un fixateur, puis immergés), l'aorte, les gonades, l'utérus, les organes génitaux auxiliaires, les glandes mammaires des femelles, la prostate, la vessie, la vésicule biliaire (souris), les ganglions lymphatiques (de préférence un ganglion lymphatique faisant partie du territoire de drainage dont dépend la voie d'administration et un autre faisant partie d'un autre territoire de drainage afin de détecter les éventuels effets systémiques), les nerfs périphériques (sciatique ou poplité interne) de préférence proche du muscle, un prélèvement de moelle osseuse (et/ou ponction de moelle osseuse examinée directement), la peau et les yeux (si des changements ont été relevés au cours des examens ophtalmologiques). Les observations cliniques et les observations macroscopiques peuvent conduire à l'examen de tissus supplémentaires. Tous les organes considérés comme des cibles vraisemblables de la substance d'essai, compte tenu de ses propriétés, devraient également être conservés.

1.5.2.4. *Histopathologie*

Un examen histopathologique complet doit être pratiqué sur les tissus et organes conservés de tous les animaux appartenant au groupe témoin et au groupe traité à la dose la plus élevée. Si des changements liés au traitement sont constatés dans le groupe traité à la dose la plus élevée, il faudra étendre cet examen aux animaux de tous les groupes traités.

Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées.

Si un groupe satellite est inclus, les tissus et organes sur lesquels des effets ont été observés dans les groupes traités doivent faire l'objet d'un examen histopathologique.

▼B

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1. RÉSULTATS

Les résultats correspondant à chaque animal doivent être fournis. En outre, tous les résultats doivent être résumés sous forme de tableaux faisant apparaître, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité et une description des symptômes de toxicité observés, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux affecté par chaque type de lésion.

S'il y a lieu, les résultats numériques doivent être évalués par une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Le choix des méthodes statistiques et des résultats à analyser doit intervenir au stade de rédaction du protocole d'étude.

2.2. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

2.2.1. **Substance d'essai**

— État physique, pureté et propriétés physico-chimiques,

— données permettant l'identification chimique,

— véhicule (le cas échéant) justification du choix du véhicule, s'il est autre que l'eau.

2.2.2. **Animaux d'expérience**

— Espèce et souche utilisée,

— nombre, âge et sexe des animaux.

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai.

2.2.3. **Conditions d'essai**

— Justification du choix des doses,

— détails concernant la préparation contenant la substance d'essai, son incorporation dans la nourriture, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,

— détails relatifs à l'administration de la substance d'essai,

— doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et facteur de conversion de la concentration de la substance d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (en ppm) en dose réelle, s'il y a lieu,

— détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau.

2.2.4. **Résultats**

— Poids corporel et variation de poids corporel,

— consommation de nourriture et d'eau, le cas échéant,

— données sur la réponse toxique par sexe et par dose et description des signes de toxicité,

▼B

— nature, gravité et durée des observations cliniques (réversibles ou non),

— résultats de l'examen ophtalmologique,

— évaluations de l'activité sensorielle, la force de préhension et l'activité motrice (le cas échéant),

— paramètres hématologiques et valeurs normales de référence,

— paramètres de biochimie clinique et valeurs normales de référence,

— poids du corps et des organes des animaux à leur mort et rapports poids de l'organe/poids corporel,

— résultats d'autopsie,

— description détaillée de tous les résultats histopathologiques,

— données relatives à l'absorption, le cas échéant,

— traitement statistique des résultats, s'il y a lieu.

Discussion des résultats.

Conclusions.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

(2) Tupper, D. E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, pp. 999-1003.

(3) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use m Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, pp. 691-704.

(4) Moser, V. C, Mc Daniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol, 10S, pp. 267-283.

(5) Meyer O. A, Tilson H. A., Byrd W. C, Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hindlimb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, pp. 233-236.

(6) Crofton K. M., Howard J. L, Moser V. C, Gill M. W., Reiter L. W., Tilson H. A., MacPhail R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, pp. 599-609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). «Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies», Fundam. & Appl. Toxicol, 29, pp. 198-201.

▼B

B.27. **ESSAI DE TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR VOIE ORALE TOXICITÉ ORALE À DOSES RÉPÉTÉES NON-RONGEURS: 90 JOURS**

1. **MÉTHODE**

La méthode décrite pour cet essai de toxicité orale subchronique reprend la ligne directrice nº 409 de l'OCDE (1998).

1.1. INTRODUCTION

Lors de l'appréciation et de l'évaluation des caractéristiques toxiques d'un produit chimique, la détermination de la toxicité subchronique par voie orale à doses répétées peut s'effectuer après avoir obtenu des informations préliminaires sur la toxicité à partir d'essais de toxicité aiguë ou à doses répétées sur 28 jours. L'étude sur 90 jours fournit des informations sur les dangers que peut entraîner pour la santé une exposition réitérée durant une période de croissance rapide jusqu'au début de l'âge adulte. L'étude fournira des informations sur les principaux effets toxiques, indiquera les organes cibles et les possibilités d'accumulation et pourra donner une estimation de la dose sans effet toxique (NOAEL) qui pourra être utilisée pour sélectionner des doses en vue d'études chroniques et pour établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine.

La méthode d'essai permet de mettre en évidence les effets nocifs de l'exposition aux produits chimiques chez des non-rongeurs; elle ne doit être utilisée que dans les cas suivants:

— lorsque les effets observés dans d'autres études font ressortir la nécessité d'éclaircir et de préciser certains points chez une deuxième espèce non-rongeurs, ou

— lorsque les études toxicocinétiques montrent que l'utilisation d'une espèce particulière de non-rongeur constitue le choix le plus pertinent en tant qu'animal d'expérience, ou

— lorsque d'autres raisons précises justifient l'utilisation d'une espèce de non-rongeur.

Voir également introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Dose: quantité de substance d'essai administrée. La dose est exprimée en poids (g, mg), en poids de substance d'essai par unité de poids corporel de l'animal d'expérience (par exemple, mg/kg) ou en concentration constante dans la nourriture (ppm).

Dosage: terme général recouvrant la dose, sa fréquence et la durée de l'administration.

DSET: abréviation de dose sans effet toxique (NOAEL: No Observable Adverse Effect Level), c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif lié au traitement n'est observé.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Différentes doses de la substance d'essai sont administrées quotidiennement par voie orale à plusieurs groupes d'animaux de laboratoire, à raison d'une valeur de dose par groupe et ce pendant une période de 90 jours. Pendant la période d'administration, les animaux sont observés attentivement afin de déceler d'éventuels symptômes de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont également sacrifiés et autopsiés.

▼B

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.4.1. **Sélection de l'espèce animale**

L'espèce non-rongeur couramment utilisée est le chien, dont la race doit être définie; on se sert fréquemment du beagle. D'autres espèces, par exemple le porc ou le porc nain (mini porc), peuvent aussi être utilisées. Les primates ne sont pas recommandés et leur utilisation doit être justifiée. Il convient d'employer de jeunes animaux en bonne santé et, dans le cas du chien, l'administration de la substance à tester devrait commencer de préférence à l'âge de 4-6 mois, et jamais au delà de 9 mois. Lorsque l'étude est préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, il faut utiliser la même espèce et la même race dans les deux études.

1.4.2. **Préparation des animaux**

Il convient d'utiliser de jeunes animaux, en bonne santé, acclimatés aux conditions du laboratoire et n'ayant pas encore été sujets d'expérience. La durée de l'acclimatation dépendra de l'espèce d'essai sélectionnée et de sa provenance. Il est recommandé de compter au moins 5 jours pour les chiens ou les porcs élevés à cette fin dans une animalerie résidente et au moins deux semaines pour ces mêmes animaux s'ils proviennent de sources extérieures. L'espèce, la race, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience doivent être précisés. Les animaux seront répartis au hasard entre les groupes traités et le groupe témoin. Les cages doivent être placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats soit réduite au minimum. Un numéro d'identification distinct doit être attribué à chaque animal.

1.4.3. **Préparation des doses**

La substance à tester peut être administrée dans la nourriture ou dans l'eau de boisson, par gavage ou dans des capsules. Le mode d'administration par voie orale dépend de l'objectif de l'étude et des propriétés physicochimiques de la substance d'essai.

S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. On recommande, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager d'abord l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, ensuite une solution ou une émulsion dans une huile (par exemple l'huile de maïs) et en dernier lieu une solution dans d'autres véhicules. La toxicité des véhicules autres que l'eau doit être connue. La stabilité de la substance d'essai dans les conditions d'administration doit être déterminée.

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Nombre et sexe des animaux**

Il faut employer au moins 8 animaux (4 femelles et 4 mâles) à chaque dose. Si on a prévu de sacrifier des animaux en cours d'essai, il convient d'accroître ce nombre du nombre d'animaux qui doivent être sacrifiés en cours d'essai. Le nombre d'animaux survivants au terme de l'étude doit être suffisant pour permettre une évaluation significative des effets toxiques. En fonction des connaissances dont on dispose au préalable sur le produit chimique ou sur une substance de structure très proche, on envisagera d'inclure un groupe satellite supplémentaire de 8 animaux (4 par sexe) dans le groupe témoin et dans le groupe traité à la concentration la plus élevée, en vue d'observer, une fois la période de traitement écoulée, la réversibilité ou la persistance de tout effet toxique. La durée de cette période post-traitement doit être fixée en fonction des effets observés.

▼B

1.5.2. **Dosage**

Il faut utiliser au minimum 3 doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 1.5.3). Les niveaux de dose peuvent être établis en fonction des résultats obtenus lors d'études à doses répétées d'études préliminaires et doivent tenir compte de toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques disponibles sur la substance d'essai ou de substances apparentées. Sauf contraintes dues aux propriétés physico-chimiques de la substance d'essai ou par ses effets biologiques, la dose la plus élevée doit être choisie en vue de provoquer un effet toxique, mais ni la mort ni d'intenses souffrances. Une série de doses décroissantes doit être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une dose sans effet toxique (DSET) à la dose la plus faible. Des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (par exemple séparés par un facteur supérieur à 6-10) entre les doses.

Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et qu'elle entraîne une diminution de la prise de nourriture, il peut être utile d'utiliser un groupe témoin nourri en parallèle afin de déterminer si la diminution est duc aux caractéristiques organoleptiques ou à des altérations lexicologiques du modèle d'essai.

Il convient également d'être attentif aux caractéristiques suivantes du véhicule ou d'autres additifs, selon le cas effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai, effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité, et effets sur la consommation alimentaire et hydrique ou sur l'état nutritionnel des animaux.

1.5.3. **Essai limite**

Si un essai pratiqué avec une seule dose équivalant à au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, en suivant le mode opératoire décrit pour cette étude, ne produit aucun effet nocif observé et s'il n'y a pas de raison de penser que la substance soit toxique compte tenu des données dont on dispose au sujet de substances ayant une structure analogue, on peut considérer qu'il n'est pas nécessaire de réaliser une étude complète avec trois niveaux de dose. L'essai limite est valable sauf dans le cas où l'exposition humaine puisse advenir à des doses plus élevées.

1.5.4. **Administration des doses**

Les animaux reçoivent une administration quotidienne de la substance d'essai, sept jours sur sept, durant 90 jours. Tout autre régime d'administration, par exemple 5 jours par semaine, doit être justifié. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, une dose unique devrait être dispensée aux animaux par une sonde gastrique ou une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide administrable en une fois dépend de la taille de l'animal. Le volume devrait normalement être le plus petit possible. Sauf pour les substances irritantes ou corrosives, qui provoqueront normalement des effets exacerbés aux concentrations plus élevées, il convient de réduire au minimum la variabilité du volume d'essai en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à toutes les doses.

▼B

Si la substance d'essai est administrée dans les aliments ou l'eau de boisson, il importe de s'assurer que sa quantité n'interfère pas avec la nutrition normale ni avec l'équilibre hydrique. Lorsque la substance d'essai est incorporée aux aliments, on peut soit appliquer une concentration constante dans les aliments (ppm), soit une dose constante par rapport au poids corporel de l'animal; il y a lieu de spécifier la méthode utilisée. Si la substance est administrée par gavage ou dans une capsule, la dose doit être administrée aux mêmes heures chaque jour et ajustée si nécessaire pour rester constante par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'une étude sur 90 jours sert de préliminaire à une étude de toxicité chronique à long terme, un régime alimentaire semblable doit être utilisé dans les deux études.

1.5.5. **Observations**

La période d'observation doit durer au moins 90 jours. Les animaux d'un groupe satellite destinés à des observations ultérieures ne doivent recevoir aucun traitement pendant une période appropriée pour que l'on puisse constater la persistance ou la disparition des effets toxiques.

Il faudra effectuer un examen clinique général au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en tenant compte de la période après l'administration pour laquelle des effets observables les plus marqués sont prévisibles. L'état clinique des animaux doit être noté. Au moins deux fois par jour, généralement au début et à la fin de chaque journée, tous les animaux doivent être examinés afin de déceler des symptômes de morbidité et de mortalité.

Un examen clinique détaillé doit être pratiqué sur tous les animaux au moins une fois avant la première exposition (pour pouvoir effectuer des comparaisons sur un même individu), et ensuite une fois par semaine. Ces examens doivent être effectués, si possible, hors de la cage, de préférence dans une enceinte normalisée, et à heure fixe. Les conditions d'observation doivent demeurer aussi constantes que possible. Les symptômes de toxicité doivent être soigneusement notés, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité. Les observations devraient inclure, de façon non limitative, les changements affectant la peau, la fourrure, les yeux, les muqueuses, la fréquence des sécrétions et des excrétions ainsi que l'activité autonome (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, diamètre de la pupille, respiration anormale). Il convient également de noter les changements dans la démarche, le maintien et les réactions à la manipulation ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, de stéréotypes (par exemple, soins corporels excessifs, animaux tournant en rond de façon répétitive) et de comportements bizarres.

À l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareillage approprié équivalent, il y a lieu d'effectuer, avant l'administration de la substance à tester et au terme de l'étude, un examen ophtalmologique, de préférence sur tous les animaux mais au minimum sur le groupe d'animaux exposés à la dose la plus élevée et sur le groupe témoin. Si on décèle des changements liés au traitement dans les yeux de ces animaux, tous les autres animaux doivent être examinés.

1.5.5.1. *Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau*

Tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. On mesurera la consommation de nourriture au moins une fois par semaine. Si la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la consommation d'eau doit aussi être mesurée au moins une fois par semaine. Il est également recommandé de mesurer la consommation d'eau, dans le cas d'étude où la substance d'essai est administrée dans les aliments ou par gavage, si celle-ci risque d'être modifiée.

▼B

1.5.5.2. *Hématologie et biochimie clinique*

Des prélèvements de sang doivent être pratiqués à des sites déterminés et les échantillons, stockés, s'il y a lieu, dans des conditions appropriées. À la fin de la période d'essai, des échantillons sont prélevés juste avant le sacrifice des animaux ou au cours de celui-ci.

Au début de l'essai et, par la suite, soit tous les mois, soit à partir du milieu de la période d'essai et à la fin de celle-ci, il y a lieu d'effectuer un examen hématologique en mesurant l'hématocrite, la concentration d'hémoglobine, la numération des érythrocytes et des leucocytes, la formule leucocytaire, la numération des plaquettes et l'étude de paramètres de la coagulation tels que le temps de coagulation, le temps de prothrombine ou le temps de thromboplastine.

Des analyses de biochimie clinique destinées à l'étude des principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur les reins et le foie, devraient être pratiquées sur des échantillons de sang prélevés sur tous les animaux, au début de l'essai et ensuite soit tous les mois, soit au milieu et à la fin de l'essai. Les paramètres qui doivent être analysés comprennent l'équilibre électrolytique, le métabolisme des glucides et les fonctions hépatiques et rénales. Le choix de certaines analyses dépendra des observations sur le mode d'action de la substance d'essai. Les animaux doivent être mis à jeun durant une période dépendant de l'espèce la prise de sang. Les analyses proposées comprennent le calcium, le phosphore, le chlore, le sodium, le potassium, le glucose à jeun, l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, l'ornithine décarboxylase, la gamma glutamyle transpeptidase, l'azote uréique, l'albumine, la créatinine sanguine et les concentrations totales de bilirubine et de protéines sériques.

Les analyses d'urine doivent être pratiquées au moins au début, au milieu et en fin d'essai, sur des échantillons d'urine prélevés à des moments déterminés. Les paramètres à relever sont l'apparence, le volume, l'osmolalité ou la densité, le pH, les protéines, le glucose, le sang et les cellules sanguines. Des paramètres supplémentaires peuvent être étudiés, s'il y a lieu, afin d'élargir le champ des effets observés.

Il faudrait envisager par ailleurs de rechercher des indicateurs de lésions générales des tissus. D'autres déterminations pourraient être nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate: l'analyse des lipides, des hormones, de l'équilibre acido-basique, de la méthémoglobine et de l'inhibition de la cholinestérase. Des analyses de biochimie clinique supplémentaires peuvent être pratiquées, s'il y a lieu, afin d'élargir le champ des effets observés. Celles-ci doivent être définies pour certaines classes de produits chimiques ou cas par cas.

Il convient d'une façon générale de suivre une démarche souple, adaptée à l'espèce et aux effets observés et/ou escomptés d'une substance donnée.

1.5.5.3. *Autopsie*

Tous les animaux de l'étude feront l'objet d'une autopsie complète et détaillée, comportant l'examen attentif de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie et la vésicule biliaire, les reins, les glandes surrénales, les testicules, les épididymes, les ovaires, l'utérus, la thyroïde (et les glandes parathyroïdes) le thymus, la rate, le cerveau et le cœur de tous les animaux (à l'exception des animaux moribonds et/ou sacrifiés avant la fin de l'essai) doivent être disséqués et pesés à l'état frais dès que possible afin d'éviter leur dessiccation.

▼B

Les tissus suivants doivent être conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu: tous les organes présentant des lésions macroscopiques l'encéphale (les régions représentatives du cerveau, du cervelet, de la moelle et du pont), la moelle épinière (à trois niveaux: cervical, médiothoracique et lombaire), l'hypophyse, les yeux, la thyroïde, les glandes parathyroïdes, le thymus, l'œsophage, les glandes salivaires, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, la vésicule biliaire, le pancréas, les reins, les glandes surrénales, la rate, le cœur, la trachée et les poumons, l'aorte, les gonades, l'utérus, les organes génitaux auxiliaires, les glandes mammaires des femelles, la prostate, la vessie, les ganglions lymphatiques (de préférence un ganglion lymphatique faisant partie du territoire de drainage dont dépend la voie d'administration et un autre faisant partie d'un autre territoire de drainage afin de détecter les éventuels effets systémiques), les nerfs périphériques (sciatiques ou tibiaux), de préférence proches du muscle, un prélèvement de moelle osseuse (et/ou une ponction de moelle osseuse examinée directement) et la peau. Les observations cliniques et les observations macroscopiques peuvent conduire à l'examen de tissus supplémentaires. Tous les organes considérés comme des organes cibles vraisemblables de la substance d'essai, compte tenu de ses propriétés, devraient également être conservés.

1.5.5.4. *Histopathologie*

Un examen histopathologique complet doit être pratiqué sur les tissus et organes conservés de tous les animaux appartenant au moins au groupe témoin et au groupe traité à la dose la plus élevée. Si des changements liés au traitement sont constatés dans le groupe traité à la dose la plus élevée, il faudra étendre cet examen aux animaux de tous les groupes traités.

Toutes les lésions macroscopiques doivent être examinées.

Si un groupe satellite est inclus, les tissus et organes sur lesquels des effets ont été observés dans les groupes traités doivent faire l'objet d'un examen histopathologique.

2. RÉSULTATS ET RAPPORT

2.1. RÉSULTATS

Les résultats correspondant à chaque animal doivent être fournis. En outre, tous les résultats doivent être résumés sous forme de tableaux faisant apparaître pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des symptômes de toxicité et une description des signes de toxicité observés, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux affectés par chaque type de lésion.

S'il y a lieu, les résultats numériques devraient être évalues par une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Le choix des méthodes statistiques et des résultats à analyser devrait intervenir au stade de la rédaction du protocole d'étude.

2.2. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

▼B

2.2.1. **Substance d'essai**

— État physique, pureté et propriétés physico-chimiques,

— données permettant l'identification chimique,

— véhicule (le cas échéant), justification du choix si autre que l'eau.

2.2.2. **Animaux d'expérience**

— Espèce et souche utilisée,

— nombre, âge et sexe des animaux,

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai.

2.2.3. **Conditions d'essai**

— Justification du choix des doses,

— détails concernant la préparation contenant la substance d'essai, son incorporation dans la nourriture, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation.

— détails relatifs à l'administration de la substance d'essai,

— doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et facteur de conversion de la concentration de la substance d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (en ppm) en dose réelle, s'il y a lieu,

— détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau.

2.2.4. **Résultats**

— Poids corporel et variation de poids corporel,

— consommation de nourriture et d'eau, le cas échéant,

— données sur la réponse toxique par sexe et par dose et description des signes de toxicité,

— nature, gravité et durée des observations cliniques (réversibles ou non),

— résultats de l'examen ophtalmologique,

— paramètres hématologiques et valeurs normales de référence,

— paramètres de biochimie clinique et valeurs normales de référence,

— poids du corps et des organes des animaux à leur mort et rapports poids de l'organe/poids corporel,

— résultats d'autopsie,

— description détaillée de tous les résultats histopathologiques,

— données relatives à l'absorption, le cas échéant,

— traitement statistique des résultats, s'il y a lieu.

Discussion des résultats.

Conclusions.

▼B

B.28. **TOXICITÉ DERMIQUE SUBCHRONIQUE ÉPREUVE DE 90 JOURS SUR DES RONGEURS**

1. **MÉTHODE**

1.1 INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Les doses croissantes de la substance d'essai sont appliquées quotidiennement, sur la peau des animaux de plusieurs lots d'expérience, à raison d'une dose par lot durant une période de 90 jours. Durant la période d'application, les animaux sont observés quotidiennement afin de déceler les manifestations de toxicité. Les animaux qui meurent en cours d'expérience de même que ceux encore en vie à l'issue de celle-ci sont autopsiés.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. **Préparations**

Les animaux sont maintenus dans les conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience pendant au moins les 5 jours qui la précèdent. Avant de commencer l'essai, les jeunes animaux sains sont répartis au hasard en lots traités et lots témoins. Peu de temps avant l'essai, on tond la fourrure de la région dorsale des animaux. On peut avoir recours au rasage, mais l'opération doit alors être effectuée 24 heures environ avant l'essai. Il est habituellement nécessaire de répéter ces opérations toutes les semaines environ et il faut prendre grand soin d'éviter toute lésion de la peau pendant ces opérations. La surface à dégager pour l'application de la substance à tester ne sera pas inférieure à 10 % de la surface corporelle. Le poids de l'animal sera pris en compte pour décider de la zone à dégager et des dimensions de la surface à traiter. Lorsque l'essai porte sur des substances solides qui, le cas échéant, peuvent être pulvérisées, la substance à tester doit être humectée au moyen d'eau ou, au besoin, d'un véhicule approprié de manière à garantir un bon contact avec la peau. Les substances liquides sont généralement testées sans dilution préalable. On procède à une application quotidienne à raison de 5 à 7 jours par semaine.

1.6.2. **Conditions expérimentales**

1.6.2.1. Animaux d'expérience

Le rat, le lapin ou le cochon d'Inde adultes peuvent être utilisés; d'autres espèces aussi, mais il faut alors en justifier l'emploi. Au commencement de l'expérience, la différence de poids entre les animaux ne dépassera pas ± 20 % de la valeur moyenne. Si une étude dermique subchronique constitue la phase préparatoire d'une étude à long terme, la même espèce et la même souche seront utilisées pour les deux études.

▼B

1.6.2.2. Nombre et sexe

20 animaux au moins (10 femelles et 10 mâles) à la peau saine seront utilisés pour chaque niveau de dose. Les femelles seront nullipares et non gravides. Si l'on prévoit de sacrifier certains animaux en cours d'expérience, il y a lieu d'ajouter à ce nombre celui des animaux qu'il est prévu de sacrifier avant la fin de l'expérience. De plus, un groupe satellite de 20 animaux (10 par sexe) peut être traité avec la dose la plus élevée pendant 90 jours et faire l'objet d'une observation quant à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive des effets toxiques durant les 28 jours qui suivent le traitement.

1.6.2.3. Doses

On utilisera au moins trois doses ainsi qu'un lot témoin ou, le cas échéant, un lot témoin pour le véhicule. La période d'exposition sera d'au moins six heures par jour. La substance à tester sera appliquée chaque jour à la même heure et sa quantité fera l'objet d'un ajustement hebdomadaire ou bi-hebdomadaire afin de conserver une dose constante en rapport avec le poids corporel de l'animal. À l'exception de l'application de la substance à tester, les animaux du lot témoin seront traités de la même façon que les sujets des lots traités. Si un véhicule est utilisé pour faciliter l'application, il sera administré au lot témoin dans les mêmes conditions que pour les lots traités et la dose reçue correspondra à celle du lot traité par la dose la plus élevée. La dose la plus élevée doit être déterminée de manière à produire des effets toxiques mais pas, ou rarement, la mort de l'animal; la dose la plus faible ne doit faire apparaître aucun effet toxique. Si l'on dispose d'informations sur le niveau de l'exposition humaine, la dose la plus faible dépassera cette valeur. L'idéal serait que la dose intermédiaire produise l'effet toxique minimal observable. Si l'on utilise plusieurs doses intermédiaires, l'écart entre les doses sera calculé de manière à entraîner une gradation des effets toxiques. Dans les lots correspondant aux doses faible et intermédiaire ainsi que chez les témoins, le nombre de décès sera faible, afin de permettre une évaluation significative des résultats.

Si l'application de la substance à tester provoque une grave irritation cutanée, les concentrations seront réduites; ceci peut entraîner une diminution, voire une disparition, des autres effets toxiques à la dose la plus élevée. Si les lésions cutanées sont très graves, il peut s'avérer nécessaire d'arrêter l'expérience et de la recommencer avec des concentrations plus faibles.

1.6.3. **Essai de limite**

Si une expérience préliminaire réalisée avec une dose de 1 000 mg/kg ou avec une dose plus élevée en fonction de la possibilité d'une exposition humaine — pour autant que celle-ci soit connue — n'a provoqué aucun effet toxique, on peut juger inutile de poursuivre l'expérience.

1.6.4. **Période d'observation**

Les animaux d'expérience feront l'objet d'observations quotidiennes afin de déceler les manifestations de toxicité. Le moment de la mort ainsi que le moment auquel les manifestations de toxicité apparaissent et disparaissent seront notés.

▼B

1.6.5. **Mode opératoire**

Les animaux seront placés dans des cages individuelles. Dans les conditions idéales, la substance d'essai est administrée aux animaux 7 jours sur 7 pendant une période de 90 jours.

Les animaux de tous les groupes satellites devant faire l'objet d'observations complémentaires seront gardés en vie pendant 28 jours encore, sans traitement, afin de constater la guérison ou la persistance des effets toxiques. La durée d'exposition sera de 6 heures par jour.

La substance d'essai sera appliquée uniformément sur une surface à peu près égale à 10 % de la surface totale du corps. Dans le cas de substances hautement toxiques, la surface couverte peut être moins importante mais la couche doit être aussi mince et aussi uniforme que possible.

Durant l'exposition, la substance d'essai est maintenue en contact avec la peau au moyen d'un carré de gaze poreux et d'un sparadrap non irritant. La surface traitée sera, en outre, convenablement couverte de manière à maintenir en place le pansement de gaze et la substance d'essai et à éviter que les animaux puissent ingérer ladite substance. Des appareils de contention peuvent être utilisés pour empêcher l'ingestion de la substance mais une immobilisation complète n'est pas recommandée.

À l'issue de la période d'exposition, il faut, si possible, éliminer tout résidu de substance avec de l'eau ou par tout autre procédé adéquat de nettoyage de la peau.

Tous les animaux seront observés quotidiennement et les manifestations de toxicité ainsi que le moment de leur apparition, leur intensité et leur durée seront enregistrés. Pendant la période d'encagement, on observera notamment les modifications du poil et de la peau, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux autonome et central ainsi que de l'activité somatomotrice et du comportement. La consommation alimentaire et le poids des animaux seront déterminés chaque semaine. Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux afin d'éviter toute perte par cannibalisme, autolyse des tissus ou erreur de mise en place. À l'issue de l'expérience, tous les animaux survivants des lots traités non satellites seront autopsiés. Les animaux moribonds seront immédiatement retirés et autopsiés.

Les examens ci-après sont habituellement effectués pour tous les animaux, y compris ceux du lot témoin:

a) Un examen ophtalmologique sera pratiqué à l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareil équivalent avant d'administrer la substance à tester ainsi qu'au terme de l'expérience, de préférence pour tous les animaux mais au moins pour le lot traité par la dose la plus élevée ainsi que pour le lot témoin. Si des modifications oculaires sont observées tous les animaux seront examinés.

b) Un examen hématologique comprenant l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, la numération des hématies et des leucocytes, la formule leucocytaire ainsi qu'une étude de la coagulation par des épreuves telles que temps de coagulation, temps de Quick, temps de thromboplastine ou numération des plaquettes sanguines sera effectué au terme de l'expérience.

▼B

c) Des déterminations biochimiques cliniques dans le sang seront effectuées à l'issue de l'expérience. L'équilibre électrolytique, le métabolisme glucidique, les fonctions hépatique et rénale présentent un intérêt général pour toutes les études. Le choix d'épreuves spécifiques sera influencé par les observations relatives au mode d'action de la substance. Il est suggéré de doser les substances suivantes: le calcium, le phosphore, les chlorures, le sodium, le potassium, le glucose à jeun (la période de jeûne étant adaptée à l'espèce), les transaminases glutamo-pyruvique ([1]) et glutamo-oxaloacétique ([2]), l'ornithine-décarboxylase, la gamma-glutamyl transpeptidase, l'azote uréique, l'albumine, la créatinine plasmatique, la bilirubine totale et les protéines sériques totales. Les autres analyses éventuellement nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate concernent les lipides, les hormones, l'équilibre acido-basique, la méthémoglobine, l'activité cholinestérasique. D'autres analyses biochimiques cliniques peuvent, si nécessaire, être effectuées pour approfondir l'étude des effets observés.

d) Un examen régulier des urines n'est pas nécessaire; un tel examen n'est indiqué qu'en cas de toxicité probable ou manifeste.

Si les informations recueillies dans le passé ne sont pas appropriées, les paramètres hématologiques et biochimiques cliniques seront déterminés avant le commencement de l'expérience.

1.6.6. **Autopsie**

Tous les animaux seront soumis à une autopsie complète comprenant l'examen de la surface externe du corps, de tous les orifices, ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie, les reins, les glandes surrénales et les testicules seront pesés, à l'état humide, le plus rapidement possible après la dissection afin d'éviter le dessèchement. Les organes et tissus ci-après seront conservés dans un milieu approprié dans l'éventualité d'examens histopathologiques ultérieurs: toute lésion macroscopique, encéphale — y compris section de la moelle/du pont de Varole, cortex cérébelleux et cortex cérébral, hypophyse, thyroïde/parathyroïde, tout tissu thymique, (trachée), poumons, cœur, aorte, glandes salivaires, foie, rate, reins, glandes surrénales, pancréas, gonades, organes génitaux annexes, vésicule biliaire (si présente), œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, cæcum, colon, rectum, vessie urinaire, ganglion lymphatique représentatif, (femelle: glande mammaire), (musculature de la cuisse), nerf périphérique, (yeux), (sternum avec moelle osseuse), (fémur — y compris surface articulaire), (moelle épinière à trois niveaux — cervical, médiothoracique et lombaire) et (glandes lacrymales). Les tissus mentionnés entre parenthèses ne seront examinés que sur indication des signes de toxicité ou en cas d'atteinte de l'organe.

1.6.7. **Examen histopathologique**

a) La peau normale et la peau traitée ainsi que les organes et tissus de tous les animaux du lot témoin et du lot exposé à la dose la plus élevée doivent faire l'objet d'un examen histopathologique complet.

b) Toutes les lésions macroscopiques seront examinées.

([1]) Connue actuellement sous le nom d'alanine transaminase serique.
([2]) Connue actuellement sous le nom d'aspartate transaminase sérique.

▼B

c) Les organes-cibles des animaux appartenant aux autres lots traités seront examinés.

d) Si l'on utilise des rats, les poumons des animaux appartenant aux lots exposés aux doses faible et intermédiaire seront soumis à un examen histopathologique afin de déceler tout signe d'infection qui permette de juger facilement de l'état de santé des animaux. D'autres examens histopathologiques systématiques peuvent ne pas être nécessaires pour les animaux de ces lots mais doivent toujours être effectués pour les organes présentant des lésions dans le groupe traité par la dose la plus élevée.

e) Lorsqu'un lot satellite est utilisé, un examen histopathologique sera pratiqué sur les tissus et organes présentant des signes de toxicité dans les lots traités.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats seront résumés sous la forme de tableaux indiquant, pour chaque expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux atteints de lésions, le type de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les résultats seront évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. **RAPPORT**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

— espèce, souche, origine, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.,

— conditions expérimentales,

— doses (y compris, le cas échéant, véhicule) et concentrations,

— dose dépourvue d'effet, si possible,

— réponse toxique par sexe et par dose,

— moment de la mort en cours d'expérience ou indication que l'animal était encore en vie au terme de l'expérience,

— description des effets toxiques ou autres,

— moment de l'observation de tout symptôme et évolution de celui-ci,

— quantité de nourriture et poids corporel,

— observations ophtalmologiques,

— examens hématologiques pratiqués et résultats,

— épreuves biochimiques cliniques pratiquées et résultats (y compris, résultats de l'examen des urines),

— résultats d'autopsie,

▼B

— description détaillée de toutes les observations histopathologiques,

— traitement statistique des résultats, si possible,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼M4

B.29. TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR INHALATION: ÉTUDE SUR 90 JOURS

RÉSUMÉ

La présente méthode d'essai B.29 révisée a été conçue afin de caractériser pleinement la toxicité par inhalation d'une substance d'essai à la suite d'une exposition subchronique (90 jours), et de fournir des données fiables en vue d'estimations quantitatives des risques liés à l'inhalation. Des groupes de rongeurs (10 mâles et 10 femelles) sont exposés 6 heures par jour pendant une période de 90 jours (13 semaines) a) à la substance d'essai à trois niveaux de concentration ou plus, b) à de l'air filtré (témoin négatif), et/ou c) au véhicule (groupe témoin du véhicule). Les animaux sont exposés en général 5 jours par semaine, mais il est aussi permis de les exposer 7 jours par semaine. Des mâles et des femelles sont toujours utilisés, mais peuvent être exposés à des niveaux de concentration différents si l'un des sexes est connu pour être plus sensible à une substance d'essai donnée. Afin de mieux caractériser la toxicité de la substance d'essai, la présente méthode laisse la possibilité au directeur de l'étude d'inclure des groupes satellites (étude de réversibilité), des sacrifices en cours d'essai, des lavages broncho-alvéolaires (LBA), des tests neurologiques et des évaluations histopathologiques ou de pathologie clinique supplémentaires.

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 413 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (2009). Le texte original de la ligne directrice 413 sur la toxicité subchronique par inhalation avait été adopté en 1981 (1). La présente méthode d'essai B.29 [équivalente à la ligne directrice 413 révisée (2009)] a été mise à jour pour prendre en compte l'état de la science et répondre aux exigences règlementaires actuelles et futures.

2. Les études de toxicité subchronique par inhalation sont principalement utilisées pour calculer des concentrations réglementaires en vue d'évaluer les risques pour les travailleurs en milieu professionnel. Elles servent aussi à estimer les risques liés à l'exposition humaine dans les lieux d'habitation, les transports et l'environnement. La présente méthode d'essai permet de caractériser les effets nocifs résultant d'une exposition quotidienne répétée, par inhalation, à une substance d'essai pendant 90 jours (approximativement 10 % de la durée de vie d'un rat). Les données dérivées des études de toxicité subchronique par inhalation peuvent être utilisées pour procéder à des estimations quantitatives des risques et pour choisir les concentrations dans les études de toxicité chronique. La présente méthode d'essai n'est pas spécifiquement destinée à tester les nanomatériaux. Le document d'orientation nº 39 regroupe les définitions utilisées dans le contexte de cette méthode d'essai (2).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

3. Avant toute étude, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur la substance à tester afin d'améliorer la qualité de l'étude et de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination des concentrations d'essai appropriées, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les résultats de tous les essais de toxicité in vitro ou in vivo auxquels elle a été soumise; son (ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées; ainsi que les données issues d'autres études sur l'exposition répétée. En cas de neurotoxicité, connue ou observée au cours de l'étude, le directeur de l'étude pourra décider d'inclure les évaluations jugées nécessaires, comme une batterie d'observations fonctionnelles (FOB) et des mesures de l'activité motrice. Bien que la durée des expositions par rapport à des examens spécifiques puisse être critique, l'exécution de ces activités supplémentaires n'interfère pas avec la conception de l'étude principale.

▼M4

4. Les dilutions de substances corrosives ou irritantes peuvent être testées à des concentrations qui permettront d'atteindre le degré de toxicité désiré. Le document d'orientation n° 39 (2) fournit de plus amples informations. Lors de l'exposition des animaux à ces substances, les concentrations cibles sont assez faibles pour ne causer ni souffrance manifeste ni détresse, mais suffisantes pour prolonger la courbe concentration-réponse jusqu'à des niveaux correspondant à l'objectif scientifique et règlementaire de l'essai. Le choix de ces concentrations est fait au cas par cas, de préférence sur la base d'une étude préliminaire de détermination des concentrations, conçue de façon appropriée, et qui fournit des informations sur l'effet critique mesuré, un éventuel seuil d'irritation et le moment de son apparition (voir paragraphes 11-13). La justification du choix des concentrations est fournie.

5. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés. Les animaux moribonds sont pris en compte au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (3) détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sélection des espèces animales

6. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs adultes en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

7. Les femelles sont nullipares et non gravides. Le jour de la randomisation, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 7 à 9 semaines. Leur poids corporel n'excède pas ± 20 % du poids moyen pour chaque sexe. Sélectionnés au hasard, les animaux sont marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, ils sont conservés dans leur cage pour une période d'au minimum 5 jours avant le début de l'essai.

Conditions d'élevage des animaux

8. Les animaux sont identifiés de façon individuelle, de préférence à l'aide de dispositifs sous-cutanés, afin de faciliter leur observation et d'éviter toute confusion. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est maintenue à 22 ± 3 °C. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement être mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne fait pas obstacle à une observation précise de chaque animal, et n'engendre qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés «nez seul», il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne doivent pas provoquer chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable, alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés «corps entier» à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour empêcher la filtration de l'aérosol d'essai par à la fourrure des congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

▼M4

Chambre d'inhalation

9. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de la substance d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition «nez seul» (qui inclut les dispositifs «tête seule», «nez seul» et «museau seul») est privilégié. Le mode d'exposition «nez seul» est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition «corps entier» peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais cela est justifié dans le rapport de l'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition «corps entier», on veillera à ce que le «volume» total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (2) décrit les principes des techniques d'exposition «corps entier» ou «nez seul», ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques.

ÉTUDES DE TOXICITÉ

Concentrations limites

10. Contrairement aux études de toxicité aiguë, aucune concentration limite n'est définie dans les études de toxicité subchronique par inhalation. La concentration maximale testée prend en compte: 1) la concentration maximale pouvant être atteinte, 2) le niveau d'exposition humaine correspondant au «pire des cas», 3) la nécessité de maintenir une alimentation adéquate en oxygène, et/ou 4) le bien- être des animaux. En l'absence de limites fondées sur des données, les valeurs limites pour la toxicité aiguë du règlement (CE) nº 1272/2008 (13) peuvent être utilisées (c'est-à-dire jusqu'à une concentration maximale de 5 mg/l pour les aérosols, 20 mg/l pour les vapeurs et 20 000 ppm pour les gaz); voir document d'orientation 39 (2). S'il est nécessaire de dépasser ces limites lors d'essais de gaz ou de substances d'essai hautement volatils (comme les réfrigérants), une justification est produite. La concentration limite doit permettre d'obtenir une toxicité sans équivoque, sans causer de stress excessif chez les animaux ni affecter leur longévité (3).

Étude préliminaire de détermination des concentrations

11. Avant le début de l'étude principale, une étude préliminaire de détermination des concentrations est généralement nécessaire. Plus complète qu'une étude d'observation, elle n'est pas limitée par le choix des concentrations. Les connaissances acquises grâce à une étude préliminaire de détermination des concentrations peuvent conduire à la réussite de l'étude principale. En effet, une telle étude peut fournir des informations techniques sur les méthodes d'analyse, la taille des particules, la découverte de mécanismes de toxicité, les données histopathologiques et de pathologie clinique, et les estimations de la concentration sans effet nocif observé (CSENO) et de la concentration maximale acceptable (CMA) dans une étude principale. Le directeur d'étude peut décider de s'appuyer sur une étude préliminaire de détermination des concentrations pour identifier: le seuil d'irritation de l'appareil respiratoire (par exemple avec une histopathologie de l'appareil respiratoire, des tests de la fonction pulmonaire ou des lavages bronchoalvéolaires), la concentration la plus élevée tolérée par les animaux sans provoquer de stress excessif, et les paramètres qui permettront de caractériser au mieux la toxicité de la substance d'essai.

12. Une étude préliminaire de détermination des concentrations peut comporter un ou plusieurs niveaux de concentration. Selon les effets à mesurer retenus, trois à six mâles et trois à six femelles sont exposés à chaque niveau de concentration. La durée d'une étude préliminaire de détermination des concentrations est d'au minimum 5 jours et ne pas excéder 28 jours en général. Il convient d'exposer dans le rapport d'étude les raisons du choix des concentrations retenues pour l'étude principale, dont l'objet est de démontrer une relation concentration-réponse basée sur l'effet mesuré le plus sensible auquel on s'attend. La concentration la plus faible n'engendre en principe aucune manifestation de toxicité, tandis que la concentration la plus élevée permet d'obtenir une toxicité sans équivoque, sans causer de stress excessif chez les animaux ni affecter leur longévité (3).

▼M4

13. Lors du choix des niveaux de concentration pour l'étude préliminaire de détermination des concentrations, toutes les informations disponibles sont prises en compte, y compris les relations structure-activité et les données correspondant à des produits chimiques analogues (voir paragraphe 3). Une étude préliminaire de détermination des concentrations peut confirmer ou réfuter le choix des effets mesurés les plus sensibles selon des critères mécanistiques, comme l'inhibition de la cholinestérase par des composés organophosphorés, la formation de méthémoglobine par des agents cytotoxiques d'isomérie érythro, les hormones thyroïdiennes (T_3, T_4) dans le cas de thyrotoxiques, les protéines, la LDH, ou les neutrophiles dans les lavages bronchoalvéolaires dans le cas de particules inoffensives faiblement solubles ou d'aérosols irritants pour les poumons.

Étude principale

14. L'étude principale de toxicité subchronique comporte en général trois niveaux de concentration ainsi qu'un témoin négatif (air) et/ou un témoin du véhicule, s'il y a lieu (voir paragraphe 18). L'ensemble des informations disponibles doit permettre de déterminer les niveaux d'exposition appropriés, y compris les résultats des études systémiques de toxicité, le métabolisme et la cinétique (on prendra garde d'éviter les niveaux de concentration élevée avec des processus cinétiques de saturation). Chaque groupe d'essai comprend au moins 10 rongeurs mâles et 10 rongeurs femelles exposés à la substance d'essai 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 13 semaines (soit une durée totale de l'étude d'au moins 90 jours). Les animaux peuvent aussi être exposés 7 jours par semaine (par exemple dans le cas d'essais sur des produits pharmaceutiques inhalés). S'il est connu qu'un des sexes est plus réactif à la substance d'essai, les niveaux de concentration peuvent différer selon le sexe afin d'optimiser la concentration-réponse telle que décrite au paragraphe 15. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Lorsque la durée d'exposition est inférieure à 6 heures par jour ou qu'il est nécessaire de mener une étude d'exposition «corps entier» de longue durée (par exemple de 22 heures par jour), des justifications sont fournies, voir document d'orientation 39 (2). Les animaux sont privés de nourriture pendant l'exposition sauf si sa durée dépasse 6 heures. Dans une exposition «corps entier», les animaux peuvent boire de l'eau.

15. Les concentrations cibles choisies permettent d'identifier le(s) organe(s) cible(s) et de mettre en évidence une concentration-réponse claire:

— le niveau de concentration élevé produit des effets toxiques sans engendrer de signes persistants ou la mort, ce qui empêcherait une évaluation valable des résultats,

— le(s) niveau(x) de concentration intermédiaire(s) est (sont) espacé(s) de manière à produire une gradation dans les effets toxiques observés avec une concentration faible et avec une concentration élevée,

— le niveau de concentration faible ne produit quasiment aucune manifestation de toxicité.

Sacrifices en cours d'essai

16. Si l'on envisage le sacrifice d'animaux en cours d'essai, il faut accroître le nombre d'animaux exposés à chaque niveau de concentration du nombre prévu d'animaux sacrifiés avant la fin de l'épreuve. Le recours aux sacrifices en cours d'essai est justifié, et les analyses statistiques en tiennent dûment compte.

▼M4

Étude satellite (étude de réversibilité)

17. Une étude de réversibilité peut être utilisée pour mettre en évidence le caractère réversible, persistant ou retardé de la toxicité, pour une période post-traitement d'une durée appropriée d'au minimum 14 jours. Les groupes satellites sont constitués de dix mâles et de dix femelles exposés en même temps que les animaux d'expérience de l'étude principale. Ils sont exposés à la concentration la plus élevée de la substance d'essai. Il convient également de faire appel à un témoin parallèle (air) et, le cas échéant, à un témoin du véhicule (voir paragraphe 18).

Animaux témoins

18. Les animaux du groupe témoin négatif (air) sont traités d'une manière identique à ceux du groupe d'animaux d'essai, mais au lieu de la substance d'essai, ils sont exposés à de l'air filtré. Lorsque de l'eau ou une autre substance est utilisée pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est inclus dans l'étude, à la place du groupe témoin négatif exposé à l'air seulement. Autant que possible, l'eau est le véhicule utilisé. Dans ce cas, les animaux témoins sont exposés à un air dont le taux d'humidité relative est le même que pour les groupes exposés à la substance d'essai. Le choix du véhicule s'opère sur la base d'une étude préliminaire appropriée ou de données historiques. Si la toxicité d'un véhicule est mal connue, le directeur de l'étude peut choisir d'utiliser un témoin négatif (air) et un témoin du véhicule, mais cela est toutefois fortement déconseillé. Si les données historiques montrent qu'un véhicule n'est pas toxique, le groupe témoin à l'air n'est pas nécessaire et seul un témoin du véhicule est utilisé. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude préliminaire d'une substance d'essai préparée dans un véhicule, ce véhicule est considéré comme non toxique à la concentration testée et est utilisé comme véhicule témoin.

CONDITIONS D'EXPOSITION

Administration des concentrations

19. Les animaux sont exposés à la substance d'essai présentée sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou sous une forme mixte. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, des concentrations choisies, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion. Les matières particulaires peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin de réduire la taille des particules. Pour plus d'informations, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Répartition granulométrique

20. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 3 μm, avec un écart type géométrique (σg) compris entre 1,5 et 3,0 (4). Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques auront une taille inférieure à cette norme, et les particules chargées ou les fibres peuvent avoir une taille supérieure.

▼M4

Préparation de la substance d'essai dans un véhicule

21. La substance d'essai est idéalement testée sans véhicule. S'il est nécessaire d'avoir recours à un véhicule pour atteindre la concentration et la taille particulaire voulues de la substance d'essai, l'eau est choisie de préférence. Chaque fois qu'une substance d'essai est dissoute dans un véhicule, sa stabilité est démontrée.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION

Débit d'air dans la chambre d'exposition

22. Le débit d'air dans la chambre d'exposition est contrôlé avec soin, surveillé en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi en temps réel de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les paramètres d'inhalation dynamiques pertinents. Si la concentration est suivie en temps réel, la fréquence peut être ramenée à une seule mesure du débit de l'air par exposition et par jour. On prendra particulièrement soin d'éviter toute re-respiration dans les chambres d'exposition «nez seul». La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasse pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées. Si les mesures du premier jour d'exposition montrent que la concentration de ces gaz est appropriée, aucune mesure complémentaire ne devrait être nécessaire.

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

23. La température de la chambre d'exposition est maintenue à 22 ± 3 °C. Dans les cas d'exposition «nez seul» et «corps entier», l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est autant que possible surveillée en continu et enregistrée toutes les heures pendant chaque exposition. L'humidité relative est de préférence comprise entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple lorsque la substance d'essai se présente sous forme de solution aqueuse), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences de la substance avec la méthode d'essai.

Substance d'essai: concentration nominale

24. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de la substance d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai: concentration réelle

25. La concentration réelle est la concentration de la substance d'essai prélevée dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à la substance d'essai sont également effectuées par une pré-étude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant

▼M4

plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre le produit à tester (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie.

26. Pendant toute la durée de l'étude, il est recommandé de n'employer si possible qu'un seul lot de la substance d'essai, et l'échantillon de la substance est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il convient de réaliser une caractérisation de la substance d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes: temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de la substance d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).

27. L'atmosphère d'exposition est maintenue constante autant que possible. Un dispositif de suivi en temps réel, tel qu'un photomètre à aérosol pour les aérosols ou un analyseur d'hydrocarbures totaux pour les vapeurs, peut être utilisé pour démontrer la stabilité des conditions d'exposition. La concentration réelle dans la chambre est mesurée au moins 3 fois chaque jour d'exposition et pour chaque niveau d'exposition. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, l'utilisation d'un échantillon par période d'exposition est acceptable. En principe, cet échantillon est alors recueilli pendant la totalité de la période d'exposition. Les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excédent pas ± 10 % pour les gaz et vapeurs et ± 20 % pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de la substance d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition (t_{95}) et leur déclin. Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (2).

28. Pour des systèmes très complexes constitués de gaz ou vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion ou substance d'essai propulsés à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisira donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général le principal principe actif du mélange. Quand la substance d'essai est un mélange, la concentration analytique devra être indiquée pour la préparation totale et pas uniquement pour le principe actif ou la substance indicatrice (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Substance d'essai: répartition granulométrique

29. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum chaque semaine pour chaque niveau de concentration, à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques (APS). Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade et l'autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude.

▼M4

30. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, voir document d'orientation 39 (2). Si pour toutes les concentrations testées, cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au minimum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter l'essai.

31. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes.

OBSERVATIONS

32. Un examen clinique attentif des animaux est pratiqué avant, pendant, et après la période d'exposition. Des observations plus fréquentes peuvent être réalisées en fonction de la réponse des animaux pendant l'exposition. Lorsque l'observation des animaux s'avère difficile en raison des tubes de contention, du mauvais éclairage des chambres d'exposition «corps entier» ou d'atmosphères opaques, les animaux seront observés attentivement après l'exposition. Les observations effectuées avant l'exposition du lendemain peuvent permettre d'estimer une éventuelle réversibilité ou exacerbation des effets toxiques.

33. Toutes les observations sont enregistrées individuellement pour chaque animal. Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.

34. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux, ainsi que de l'activité somatomotrice et du comportement. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma retiennent l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement. Il est possible d'enrichir le protocole d'étude par des estimations complémentaires telles que: cinétique, surveillance biologique, fonction pulmonaire, rétention de produits peu solubles qui s'accumulent dans les tissus pulmonaires et changements comportementaux.

POIDS CORPOREL

35. Le poids de chacun des animaux est enregistré individuellement: juste avant la première exposition (jour 0), deux fois par semaine par la suite (par exemple les vendredis et lundis, afin de mettre en évidence leur rétablissement après un week-end sans exposition, ou dans un délai permettant l'évaluation de la toxicité systémique), et au moment de leur mort ou de leur euthanasie. Si aucun effet n'est observé les 4 premières semaines, le poids corporel peut n'être mesuré qu'une fois par semaine pendant le reste de l'étude. Les animaux du groupe satellite (étude de réversibilité) sont toujours pesés de façon hebdomadaire tout au long de la période de récupération. Au terme de l'étude, tous les animaux sont pesés juste avant leur sacrifice pour ne pas fausser le calcul des rapports du poids des organes au poids du corps.

CONSOMMATION DE NOURRITURE ET D'EAU

36. La quantité de nourriture consommée est mesurée une fois par semaine. La consommation d'eau peut également l'être.

▼M4

PATHOLOGIE CLINIQUE

37. Tous les animaux, y compris ceux des groupes témoins et satellites, quand ils sont sacrifiés, subissent des examens cliniques. Le délai entre la fin de l'exposition et la prise de sang est enregistré, en particulier quand la reconstitution de l'effet visé est rapide. À la fin de l'exposition, un échantillonnage est recommandé pour les paramètres ayant une courte demi-vie plasmatique (HbCO, ChE et MetHb, par exemple).

38. Le tableau 1 énumère les paramètres de pathologie clinique généralement requis pour toutes les études toxicologiques. Une analyse d'urine n'est pas nécessaire en règle générale, mais peut être réalisée si on l'estime utile d'après la toxicité probable ou observée. Afin de mieux caractériser la toxicité de la substance d'essai, le directeur de l'étude peut faire appel à d'autres paramètres (cholinestérase, lipides, hormones, équilibre acido-basique, méthémoglobine ou corps de Heinz, créatine kinase, rapport myéloïde/érythroïde, troponines, gaz du sang, lactate déshydrogénase, sorbitol déshydrogénase, glutamate déshydrogénase, gamma glutamyl transpeptidase, etc.).

Tableau 1

Paramètres standards de pathologie clinique

Hématologie	
Nombre d'érythrocytes	Nombre total de leucocytes
Hématocrite	Différentiel leucocytaire
Concentration d'hémoglobine	Nombre de plaquettes sanguines
Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine	Potentiel de coagulation (en choisir un):
Volume corpusculaire moyen	— Temps de prothrombine
Concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine	— Temps de coagulation
Réticulocytes	— Temps de thromboplastine partielle
Chimie clinique	
Glucose (*)	Alanine aminotransférase
Cholestérol total	Aspartate aminotransférase
Triglycérides	Phosphatase alcaline
Azote uréique dans le sang	Potassium
Bilirubine totale	Sodium
Créatinine	Calcium
Protéines totales	Phosphore
Albumine	Chlorure
Globuline	
Analyse d'urine (facultative)	
Apparence (couleur et turbidité)	Protéines totales
Volume	Glucose
Densité ou osmolarité	Sang/cellules sanguines
pH	

(*) Le directeur d'étude décidera si une période de jeûne est nécessaire ou non pour les animaux, une longue période de jeûne pouvant conduire à des mesures de glucose partiellement erronées pour les animaux traités par rapport aux animaux témoins. La période de jeûne est appropriée à l'espèce utilisée: pour le rat, elle peut être de 16 heures environ (jeûne pendant la nuit). La détermination de la glycémie à jeun peut être effectuée après la période de jeûne de la nuit, pendant la dernière semaine d'exposition, ou après la période de jeûne de la nuit précédant l'autopsie (avec, dans ce dernier cas, tous les autres paramètres de pathologie clinique).

▼M4

39. Quand il est prouvé que les voies respiratoires basses (c'est-à-dire les alvéoles pulmonaires) sont le principal site de dépôt et de rétention, le lavage broncho-alvéolaire (LBA) peut alors être la technique de choix pour effectuer une analyse quantitative des paramètres de la relation dose-effet basée sur les hypothèses, en se concentrant sur l'alvéolite, l'inflammation pulmonaire et la phospholipidose. Ceci permet d'étudier convenablement l'évolution de la relation dose-effet et du décours temporel d'une lésion alvéolaire. Le fluide du LBA peut être analysé en se basant sur le nombre total et différentiel de leucocytes, les protéines totales et la lactate déshydrogénase. D'autres paramètres peuvent également être considérés, comme ceux mettant en évidence une lésion lysosomale, une phospholipidose, une fibrose, une inflammation allergique ou irritante, laquelle peut inclure la détermination de cytokines ou de chimiokines pro-inflammatoires. Les mesures liées au LBA complètent souvent les résultats des examens histopathologiques sans toutefois s'y substituer. Des indications sur la manière de réaliser un lavage de poumon sont disponibles dans le document d'orientation 39 (2).

EXAMEN OPHTALMOLOGIQUE

40. À l'aide d'un ophthalmoscope ou d'un dispositif équivalent, un examen ophthalmologique du fond d'œil, des milieux de réfraction, de l'iris et de la conjonctivite est effectué avant l'administration de la substance d'essai pour tous les animaux, et au terme de l'étude pour tous les groupes témoins et groupes exposés à la concentration élevée. Si des changements dans les yeux sont décelés, tous les animaux des autres groupes sont examinés, y compris le groupe satellite (étude de réversibilité).

MACROPATHOLOGIE ET POIDS DES ORGANES

41. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai et ceux écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une exsanguination complète (si cela est possible) et une autopsie macroscopique. Il convient d'enregistrer le délai entre la fin de la dernière exposition de chaque animal et leur sacrifice. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.

42. Le tableau 2 énumère les organes et tissus devant être conservés dans un milieu approprié lors de l'autopsie macroscopique en vue d'un examen histopathologique. La conservation des organes et tissus [entre crochets], et de tous les autres organes et tissus, est à la discrétion du directeur d'étude. Les organes indiqués **en gras** sont découpés et pesés à l'état humide, le plus tôt possible après la dissection, pour éviter leur dessiccation. La thyroïde et les épididymes ne sont pesés que si cela est nécessaire car leur découpe peut gêner l'évaluation histopathologique. Les organes et tissus sont fixés à l'aide de formol tamponné à 10 %, ou d'un autre fixateur approprié, dès que l'autopsie est effectuée, et pas moins de 24 à 48 heures avant le découpage, en fonction du fixateur utilisé.

▼M4

Tableau 2

Organes et tissus à conserver lors de l'autopsie macroscopique

Aorte	Moelle osseuse (et/ou un aspirat frais)
[Bulbe olfactif]	Muscle (cuisse)
Cæcum	Nerf périphérique (sciatique ou tibial, de préférence proche du muscle)
Capsules surrénales	Œsophage
Cerveau (y compris segments d'hémisphères, cervelet et bulbe rachidien/pont)	**Ovaires**
Cœur	Pancréas
Côlon	Parathyroïdes
Dents	Peau
Duodénum	**Poumons** (tous les lobes sur un niveau, y compris les bronches principales)
[Épididymes]	Prostate
Fémur avec articulation	**Rate**
Foie	Rectum
Ganglions lymphatiques (distaux par rapport au site d'entrée)	**Reins**
Ganglions lymphatiques depuis la région hilaire du poumon, en particulier pour les substances particulaires peu solubles. Pour des examens plus approfondis et/ou des études à but immunologique, d'autres ganglions lymphatiques peuvent être envisagés, comme ceux des régions médiastinale, cervicale/submandibulaire et/ou auriculaire.	Sternum
	Testicules
	Thymus
	Thyroïde
[Glandes de Harder]	Tissus nasopharyngés [au moins 4 niveaux; 1 niveau comprenant le conduit nasopharyngien et le tissu lymphoïde associé à la muqueuse nasale (NALT)]
[Glandes lacrymales (extraorbitales)]	Trachée (au moins 2 niveaux comprenant 1 coupe longitudinale le long de la carène et 1 coupe transversale)
Estomac	[Uretère]
Glande mammaire (femelles)	[Urètre]
Glandes salivaires	**Utérus**
Hypophyse	Vésicule biliaire (si présente)
Iléon	Vésicules séminales
Jénunum	Vessie
[Langue]	[Yeux (rétine, nerf optique) et paupières]
Larynx (3 niveaux, dont la base de l'épiglotte)	Organes cibles
Moelle épinière (niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)	Toutes les masses et lésions macroscopiques

▼M4

43. Les poumons sont retirés intacts, pesés et perfusés avec un fixateur approprié à une pression de 20 à 30 cm d'eau pour veiller à ce que l'architecture pulmonaire soit préservée (5). Les coupes sont recueillies pour tous les lobes sur un niveau comprenant les bronches principales. Si un lavage du poumon est réalisé, le lobe qui n'a pas été lavé est sectionné sur trois niveaux (pas de coupe en série).

44. Au moins 4 niveaux des tissus nasopharyngés sont examinés, dont un devant comporter le conduit nasopharyngien (5) (6) (7) (8) (9) pour permettre un examen adéquat de l'épithélium squameux, transitionnel (respiratoire non-cilié), respiratoire (respiratoire cilié) et olfactif, ainsi que du tissu lymphatique (NALT) (10) (11). Trois niveaux du larynx sont examinés, dont un comprenant la base de l'épiglotte (12). Au moins deux niveaux de la trachée sont examinés, y compris une coupe longitudinale le long de la carène de la bifurcation des bronches extrapulmonaires et une coupe transversale.

HISTOPATHOLOGIE

45. Une évaluation histopathologique de tous les organes et tissus du tableau 2 est réalisée pour les animaux des groupes témoins et des groupes exposés à une concentration élevée de la substance d'essai, ainsi que pour les animaux qui meurent ou sont sacrifiés au cours de l'étude. On portera une attention particulière aux voies respiratoires, aux organes cibles et aux lésions macroscopiques. Les organes et tissus présentant des lésions dans le groupe exposé à une concentration élevée sont examinés pour tous les groupes. Le directeur de l'étude peut choisir de réaliser des évaluations histopathologiques pour d'autres groupes afin de mettre en évidence une relation concentration-réponse claire. Lorsqu'un groupe satellite (étude de réversibilité) est utilisé, il y a lieu d'effectuer un examen histopathologique pour tous les tissus et organes ayant laissé apparaître des effets dans les groupes traités. Lorsqu'un trop grand nombre de morts précoces ou d'autres problèmes survenant dans le groupe exposé à une concentration élevée compromettent la portée des résultats, le groupe exposé à la concentration immédiatement inférieure subit un examen histopathologique. On tentera de corréler les observations macroscopiques et les constatations au niveau microscopique.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Données

46. Pour chacun des animaux, les données suivantes sont fournies: poids corporel, consommation de nourriture, pathologie clinique, pathologie macroscopique, poids des organes et histopathologie. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquent pour chaque groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie. Tous les résultats, quantitatifs et fortuits, sont évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique généralement reconnue peut être utilisée; il y a lieu de sélectionner les méthodes statistiques au stade de la conception de l'étude.

Rapport d'essai

47. Le rapport d'essai contient, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage

— Description des conditions d'encagement, y compris: nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire.

▼**M4**

— Espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat. Des données sources et historiques peuvent être fournies si elles correspondent à des animaux soumis à des conditions d'exposition, d'encagement et de jeûne similaires.

— Nombre, âge et sexe des animaux.

— Méthode de randomisation.

— Description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

Substance d'essai

— Nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation).

— Données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule

— Justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau).

— Données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation

— Description détaillée de la chambre d'inhalation, y compris son volume et son schéma.

— Source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère.

— Équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle.

— Source d'air et système de climatisation utilisé.

— Méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai.

— Différence de pression (positive ou négative).

— Orifices d'exposition par chambre («nez seul») ou emplacement des animaux dans la chambre («corps entier»).

— Stabilité de l'atmosphère d'essai.

— Situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition.

— Traitement de l'air fourni/évacué.

— Débits d'air, débit d'air/orifice d'exposition («nez seul») ou rapport du volume de l'animal à la chambre («corps entier»).

— Temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}).

— Nombre de changements de volume par heure.

— Doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition

— Justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale.

▼**M4**

— Concentrations nominales (masse totale de la substance d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre).

— Concentrations réelles de la substance d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges à tester produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément.

— Toutes les concentrations atmosphériques sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m^3, etc.) plutôt qu'en unités de volume (ppm, ppb, etc.).

— Répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique (σ_g), ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales

— Détails sur la préparation de la substance d'essai, y compris sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des matériaux solides ou pour préparer les solutions de la substance d'essai.

— Description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci.

— Détails sur l'équipement utilisé pour contrôler la température et le taux d'humidité de la chambre ainsi que le débit d'air dans la chambre (réalisation d'une courbe d'étalonnage).

— Détails sur l'équipement utilisé pour recueillir les échantillons servant à déterminer les concentrations dans la chambre et la répartition granulométrique.

— Détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération de la substance d'essai à partir du milieu d'échantillonnage).

— Méthode de randomisation utilisée pour l'assignation des animaux aux groupes d'essai et aux groupes témoins.

— Détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau).

— Justification du choix des concentrations d'essai.

Résultats

— Tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation.

— Tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation.

— Tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g.

— Tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de mortalité, et nature, sévérité, moment d'apparition et durée des effets).

▼**M4**

— Tableau du poids de chacun des animaux.

— Tableau de la consommation de nourriture.

— Tableau des résultats de pathologie clinique.

— Pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques disponibles.

Discussion et interprétation des résultats

— Un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente méthode d'essai, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules.

— La respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis.

— La cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude.

— La cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés.

— Une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (3).

— Le ou les organes cibles sont identifiés.

— La concentration sans effet nocif observé (CSENO) et la concentration minimale avec effet nocif observé (CMENO) sont déterminées.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) OCDE (1981). Toxicité subchronique par inhalation, Ligne directrice nº 413 d'origine, direction de l'environnement, OCDE, Paris.

(2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations nº 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Évaluation, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations nº 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

(4) Whalan E. and Redden J.C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, p. 229-258.

(6) Young J.T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes M.P. and Ward J.M. (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Règlement (CE) nº 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) nº 1907/2006 (JO L 353 du 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M4

B.30. ÉTUDES DE TOXICITÉ CHRONIQUE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 452 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (2009). La ligne directrice 452 initiale avait été adoptée en 1981. La révision de cette méthode B.30 a été jugée nécessaire afin de tenir compte des évolutions récentes dans le domaine du bien-être animal, ainsi que des nouvelles exigences réglementaires (1) (2) (3) (4). La mise à jour de la méthode d'essai B.30 a été effectuée en parallèle avec la révision des chapitres B.32 (Études de cancérogenèse) et B.33 (Études combinées de toxicité chronique et de cancérogenèse) de la présente annexe, dans le but d'obtenir des informations additionnelles à partir des animaux utilisés dans l'étude, et de fournir des précisions concernant le choix des doses. La présente méthode d'essai vise les essais portant sur une large gamme de produits chimiques, dont des pesticides et des produits chimiques industriels.

2. La plupart des études de toxicité chronique étant menées sur des espèces de rongeurs, la présente méthode d'essai est destinée à s'appliquer principalement à des études réalisées avec ces espèces. S'il s'avérait nécessaire de mener de telles études avec des non-rongeurs, les principes et procédures décrits dans la présente méthode d'essai et dans le chapitre B.27 de la présente annexe (Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours) (5) pourront aussi être appliqués, moyennant des modifications appropriées, comme indiqué dans le document d'orientation de l'OCDE nº 116 sur l'élaboration et la conduite des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (6).

3. Les trois principales voies d'administration utilisées dans les études de toxicité chronique sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance d'essai, et de la voie d'exposition prédominante chez l'homme. Des informations complémentaires sur le choix de la voie d'exposition sont fournies dans le document d'orientation nº 116 (6).

4. La présente méthode d'essai porte essentiellement sur l'exposition par voie orale, la voie la plus communément utilisée dans les études de toxicité chronique. Bien que des études de toxicité chronique à long terme utilisant l'exposition par voie cutanée ou par inhalation puissent aussi être nécessaires pour évaluer le risque pour la santé humaine et/ou exigées en vertu de certains régimes réglementaires, ces deux voies d'exposition nécessitent des dispositifs techniques d'une grande complexité. De telles études devront être conçues au cas par cas, encore que la présente méthode d'essai, qui porte sur la caractérisation et l'évaluation de la toxicité chronique par voie orale, puisse fournir les bases d'un protocole d'étude par voie cutanée et/ou l'inhalation, notamment en ce qui concerne les recommandations relatives aux durées de traitement, aux paramètres cliniques et pathologiques, etc. Il existe des documents d'orientation de l'OCDE sur l'administration expérimentale de substances d'essai par inhalation (6) (7) et par voie cutanée (6). Les chapitres B.8 (8) et B.29 (9) de la présente annexe, ainsi que le document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aiguë par inhalation (7) doivent en particulier être consultés lors de la conception d'études à plus long terme portant sur une exposition par inhalation. Le chapitre B.9 de la présente annexe (10) doit être consulté dans le cas d'un essai par voie cutanée.

▼M4

5. L'étude de toxicité chronique donne des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée sur une portion considérable de la durée de vie des espèces employées. L'étude fournit des informations sur les effets toxiques de la substance d'essai, et indiquera les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes. Elle peut aussi donner une estimation de la dose sans effet nocif observé, qui permet d'établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine. De plus, il convient d'accorder une attention particulière à l'observation clinique des animaux afin d'obtenir le plus d'informations possible.

6. Les objectifs des études couvertes par la présente méthode d'essai sont les suivants:

— identification de la toxicité chronique d'une substance d'essai,

— identification des organes cibles,

— caractérisation de la relation dose-effet,

— identification d'un niveau de dose sans effet nocif observé (DSENO) ou du point de départ pour l'établissement d'une dose de référence (DR),

— prévision des effets de toxicité chronique aux niveaux représentatifs de l'exposition humaine,

— obtention de données permettant de vérifier les hypothèses concernant le mode d'action (6).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

7. Lors de l'évaluation des caractéristiques toxicologiques d'une substance chimique d'essai, le laboratoire chargé de l'étude prend en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de réaliser l'étude, afin de pouvoir orienter celle-ci de manière à tester plus efficacement le potentiel de toxicité chronique, et faire le moins possible appel aux animaux. Les informations utiles pour concevoir l'étude sont notamment: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les informations éventuelles sur son mode d'action; les résultats d'éventuelles études de toxicité in vitro ou in vivo; l'utilisation (les utilisations) prévue(s) et le potentiel d'exposition humaine; les données Q(SAR) disponibles et les données toxicologiques relatives aux substances chimiques structurellement apparentées; les données toxicocinétiques disponibles (dose unique et doses répétées, si ces données existent) et les résultats d'autres études à doses répétées. La détermination de la toxicité chronique n'est effectuée qu'après obtention des premiers résultats d'essais de toxicité à doses répétées sur 28 jours et/ou 90 jours. Il convient d'envisager l'adoption d'une approche par étapes pour les essais de toxicité chronique entrepris dans le cadre de l'évaluation globale des effets nocifs potentiels d'une substance d'essai particulière (11) (12) (13) (14).

8. Les méthodes statistiques les plus appropriées pour l'analyse des résultats, compte tenu du plan expérimental et des objectifs de l'étude, sont identifiées avant le début de l'étude. Il convient notamment de déterminer si les statistiques doivent prendre en compte l'ajustement en fonction de la survie et l'analyse effectuée en cas de mort prématurée des animaux d'un ou plusieurs groupes. On trouvera des indications concernant les analyses statistiques appropriées, ainsi que des références clés à des méthodes statistiques reconnues au plan international, dans le document d'orientation nº 116 (6) ainsi que dans le document d'orientation nº 35 sur l'analyse et l'évaluation des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (15).

▼M4

9. Lors de la réalisation d'une étude de toxicité chronique, il est recommandé de toujours suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation nº 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques en tant qu'effets mesurés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (16). Le paragraphe 62 de ce document, en particulier, stipule ce qui suit: «*Dans les études comportant l'administration de doses répétées, lorsqu'un animal présente des signes cliniques progressifs de détérioration de son état, une décision d'euthanasier ou non l'animal est prise en connaissance de cause. Cette décision met en balance des facteurs tels que la valeur des informations pouvant être obtenues en maintenant l'animal dans l'étude d'une part, et l'état général de celui-ci d'autre part. Si la décision est prise de poursuivre l'essai sur cet animal, la fréquence des observations est augmentée selon les besoins. Il est aussi possible, sans toutefois nuire à l'objectif de l'essai, d'interrompre l'administration de la substance d'essai pour soulager la douleur ou la détresse de l'animal, ou de réduire la dose testée.*»

10. On trouvera des informations détaillées et une discussion sur les principes déterminant le choix des doses pour les études de toxicité chronique et de cancérogenèse dans le document d'orientation nº 116 (6) ainsi que dans deux publications de l'Institut international des sciences de la vie (17) (18). La stratégie de base pour le choix des doses dépend du ou des objectifs principaux de l'étude (paragraphe 6). En choisissant des niveaux de dose appropriés, il convient de trouver un équilibre entre, d'une part, l'identification des dangers et, d'autre part, la caractérisation des réponses aux faibles doses et leur pertinence. Cet équilibre est particulièrement nécessaire dans le cas où une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe) est menée (paragraphe 11).

11. Il convient d'examiner l'opportunité de réaliser une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe), plutôt que de réaliser séparément une étude de toxicité chronique (la présente méthode d'essai B.30) et une étude de cancérogenèse (chapitre B.32 de la présente annexe). L'essai combiné permet une meilleure efficacité en temps et en coûts, par rapport à la conduite de deux essais séparés, et ne compromet pas la qualité des données de la phase chronique ou de la phase de cancérogenèse. Toutefois, les principes déterminant le choix de la dose (paragraphes 9 et 20-25) sont respectés rigoureusement lors de la réalisation d'une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe); il est reconnu également que certains cadres réglementaires peuvent imposer la conduite d'études séparées.

12. Les définitions utilisées dans le contexte de la présente méthode d'essai figurent dans le document d'orientation nº 116 (6).

PRINCIPE DE L'ESSAI

13. La substance d'essai est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives, en général pendant une période de 12 mois, bien que des durées plus longues ou plus courtes puissent aussi être choisies, en fonction des exigences réglementaires (voir paragraphe 33). Cette durée est assez longue pour permettre aux effets de toxicité cumulée de se manifester, tout en évitant les effets perturbateurs des changements liés au vieillissement. Les déviations par rapport à une durée d'exposition de 12 mois sont justifiées, surtout dans le cas de durées plus courtes. La substance d'essai est normalement administrée par voie orale, mais la voie inhalatoire ou la voie cutanée peut aussi être appropriée. Un ou plusieurs sacrifices en cours d'étude peuvent aussi être prévus, par exemple à 3 et 6 mois, auquel cas des groupes d'animaux supplémentaires pourront être enrôlés (voir paragraphe 19). Au cours de la période d'administration, les animaux sont examinés soigneusement afin de déceler tout signe de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

▼M4

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces animales

14. La présente méthode d'essai traite principalement de la caractérisation et de l'évaluation de la toxicité chronique chez les rongeurs (voir paragraphe 2), bien que certains régimes réglementaires puissent exiger la réalisation d'études similaires chez des non-rongeurs. Dans ce cas, le choix de l'espèce est justifié. S'il s'avérait nécessaire de réaliser des études de toxicité chronique avec des non- rongeurs, le plan et la conduite de l'étude devraient être conformes aux principes décrits dans la présente méthode d'essai ainsi qu'au chapitre B.27 de la présente annexe (Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours) (5). Des informations additionnelles sur le choix des espèces et des souches sont disponibles dans le document d'orientation nº 116 (6).

15. La présente méthode d'essai se rapporte essentiellement au rat, mais d'autres espèces de rongeurs, comme la souris, peuvent être utilisées. Les rats et les souris sont les modèles expérimentaux choisis de préférence, en raison de leur courte durée de vie, de leur utilisation fréquente dans les études pharmacologiques et toxicologiques, de leur sensibilité à l'induction de tumeurs, et de la disponibilité de souches suffisamment caractérisées. Ces caractéristiques permettent d'obtenir une grande quantité d'informations sur la physiologie et la pathologie de ces animaux. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains, de souches communément utilisées dans les laboratoires. L'étude de toxicité chronique sera effectuée de préférence sur des animaux de même souche et de même provenance que ceux utilisés dans l'étude (les études) de toxicité préliminaire(s) de plus courte durée. Les femelles sont nullipares et non gravides.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

16. Les animaux peuvent être logés individuellement ou réunis dans des cages en petits groupes du même sexe, l'hébergement individuel n'étant à envisager que dans des cas scientifiquement justifiés (19) (20) (21). Les cages sont placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats soit réduite au minimum. La température du local des animaux d'expérience est de 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative est d'au moins 30 % et n'excède pas de préférence 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit comprise entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire, avec eau potable à satiété. Il satisfait tous les besoins nutritionnels de l'espèce étudiée, et la teneur en contaminants alimentaires susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai (résidus de pesticides, polluants organiques persistants, phyto-œstrogènes, métaux lourds et mycotoxines, par exemple) est aussi faible que possible. Des données analytiques sur les teneurs en nutriments et en contaminants alimentaires sont recueillies régulièrement, au moins au début de l'étude et lors des changements de lots; ces données figurent dans le rapport final. Des données analytiques sur l'eau de boisson utilisée dans le cadre de l'étude sont de même fournies. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai, et de satisfaire les besoins nutritionnels des animaux lorsque la substance d'essai est administrée dans la nourriture.

Préparation des animaux

17. Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions de laboratoire depuis au moins 7 jours, et n'ayant jamais été soumis auparavant à des protocoles expérimentaux. Dans le cas des rongeurs, l'administration de la substance commence dès que possible après le sevrage et l'acclimatation, et de préférence avant l'âge de 8 semaines. L'espèce, la souche, la provenance, le sexe, le poids et l'âge des animaux d'expérience sont précisés. Au début de l'étude, la variation de poids des animaux de chaque sexe est minimale, et n'excède pas ± 20 % du poids moyen de tous les animaux étudiés, et ce pour chaque sexe séparément. Les animaux sont affectés de

▼M4

manière aléatoire aux différents groupes (témoins et traités). Après la randomisation, les poids moyens des groupes de chaque sexe ne présentent pas de différences significatives. En cas de différences statistiquement significatives, la phase de randomisation est répétée dans la mesure du possible. Chaque animal reçoit un numéro d'identification unique et en est marqué de manière permanente par tatouage, implant de micro-puce ou toute autre méthode appropriée.

PROTOCOLE

Nombre et sexe des animaux

18. Il convient d'utiliser des animaux des deux sexes. Leur nombre est suffisant pour qu'à la fin de l'étude, chaque groupe contienne un nombre de sujets permettant d'effectuer une évaluation statistique et biologique complète. Pour les rongeurs, il convient normalement d'employer au moins 20 animaux de chaque sexe à chaque niveau de dose, tandis que pour les non-rongeurs, un minimum de 4 animaux de chaque sexe par groupe est recommandé. Dans les études utilisant des souris, il peut être nécessaire de prévoir des animaux supplémentaires dans chaque groupe de dose pour pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis.

Sacrifices en cours d'étude, groupes satellites et animaux sentinelles

19. L'étude peut prévoir le sacrifice d'animaux en cours d'étude (au moins 10 animaux de chaque sexe par groupe), par exemple à 6 mois, afin de recueillir des données sur la progression des changements toxicologiques et des informations mécanistiques, si cela est scientifiquement justifié. Si l'on dispose déjà de ces données, obtenues antérieurement lors d'études de toxicité à doses répétées sur la substance d'essai, les sacrifices en cours d'étude peuvent ne pas être scientifiquement justifiés. Des groupes satellites peuvent également être constitués, afin de contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance chimique étudiée. En général, ces investigations portent uniquement sur les doses maximales de l'étude et sur le groupe témoin. Un groupe supplémentaire d'animaux sentinelles (généralement 5 animaux de chaque sexe) peut être inclus si nécessaire pour le suivi de l'état pathologique au cours de l'étude (22). Si des sacrifices en cours d'étude ou l'inclusion de groupes sentinelles ou satellites sont prévus, le nombre d'animaux utilisés dans l'étude est augmenté du nombre d'animaux que l'on prévoit de sacrifier avant l'achèvement de l'étude. Ces animaux sont normalement sujets aux mêmes observations que ceux soumis à la phase de toxicité chronique de l'étude principale, notamment en ce qui concerne le poids corporel, la prise d'aliments et d'eau, les mesures hématologiques et de biochimie clinique et les examens pathologiques. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude) pour limiter ces observations à des mesures essentielles spécifiques telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité.

Groupes de dose et dosage

20. Le document d'orientation n° 116 (6), donne des indications sur tous les aspects du choix des doses et des écarts entre les doses. Il convient d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 27). Les niveaux de doses seront généralement basés sur les résultats d'études à plus court terme à doses répétées, ou d'études préliminaires de détermination des concentrations, et prennent en compte toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques existantes relatives à la substance d'essai ou aux substances chimiques apparentées.

▼**M4**

21. À moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques de la substance d'essai, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance, tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés. Compte tenu des facteurs présentés au paragraphe 22 ci-dessous, le niveau de dose le plus élevé est choisi pour provoquer une manifestation de toxicité, par exemple un ralentissement de la prise de poids corporel (d'environ 10 %).

22. Toutefois, en fonction des objectifs de l'étude (voir paragraphe 6), on pourra choisir un niveau de dose maximal plus faible que la dose qui provoque des signes de toxicité; par exemple une dose entraînant un effet indésirable préoccupant, mais dont l'impact sur l'espérance de vie ou le poids corporel reste faible. La dose maximale ne dépasse pas 1 000 mg/kg de poids corporel (dose limite, voir paragraphe 27).

23. Les niveaux de dose et les intervalles entre les doses peuvent être choisis de manière à pouvoir établir une relation dose-réponse et une DSENO ou tout autre résultat escompté de l'étude, notamment une DR (voir paragraphe 25) au plus bas niveau de dose. Les facteurs à prendre en compte dans le choix des faibles doses sont notamment la pente attendue de la courbe dose-réponse, les doses qui provoquent des changements métaboliques importants ou qui modifient notablement le mode d'action toxique, le niveau auquel on peut prévoir un seuil, ou celui auquel on peut prévoir de fixer un point de départ pour une extrapolation aux faibles doses.

24. Les intervalles entre les doses dépendront des caractéristiques de la substance d'essai, et ne peuvent donc pas être prescrits dans la présente méthode d'essai, mais des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes, et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (correspondant par exemple à un facteur de plus de 6 à 10) entre les doses. En général, les facteurs supérieurs à 10 sont évités, et leur utilisation fait l'objet d'une justification.

25. Comme le précise le document d'orientation n° 116 (6), les facteurs à prendre en compte dans le choix des doses sont notamment les suivants:

— non-linéarités ou points d'inflexion connus ou supposés de la courbe dose-réponse,

— toxicocinétique et gammes de doses auxquelles l'induction métabolique, la saturation ou la non-linéarité entre des doses externes et internes surviennent ou non,

— lésions précurseurs, marqueurs d'effets ou indicateurs du déroulement de processus biologiques clés sous-jacents,

— aspects principaux (ou présumés) du mode d'action, par exemple doses auxquelles une cytotoxicité commence à se manifester, les dosages hormonaux sont perturbés, les mécanismes homéostatiques sont dépassés, etc.,

— régions de la courbe dose-réponse nécessitant une estimation particulièrement précise, par exemple dans le domaine de la DR prévue ou d'un seuil présumé,

— prise en compte des niveaux prévus d'exposition humaine.

▼M4

26. Le groupe témoin est un groupe non-traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance d'essai est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin sont traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé pour les groupes traités. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et entraîne une diminution sensible de la prise de nourriture liée à une moindre appétence de celle-ci, il pourra être utile d'utiliser un groupe témoin supplémentaire nourri en parallèle, qui constituerait un témoin plus approprié.

27. S'il est possible d'anticiper, en se basant sur les résultats d'études préliminaires, qu'un essai à dose unique, équivalant au moins à 1 000 mg/kg poids corporel/jour, réalisé en suivant les procédures décrites pour la présente étude, ne produira probablement pas d'effets indésirables, et si la toxicité est improbable compte tenu des données disponibles sur les substances chimiques structurellement apparentées, on peut considérer qu'une étude complète à trois niveaux de dose n'est pas indispensable. Une limite de 1 000 mg/kg poids corporel/jour peut s'appliquer sauf si l'exposition humaine indique qu'il est nécessaire de recourir à un niveau de dose plus élevé.

Préparation des doses et administration de la substance d'essai

28. La substance d'essai est normalement administrée par voie orale, soit dans la nourriture ou l'eau de boisson, soit par gavage. Des informations complémentaires sur les voies et méthodes d'administration figurent dans le document d'orientation n° 116 (6). La voie et le mode d'administration dépendent de la finalité de l'étude, des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, de sa biodisponibilité, ainsi que de la voie et du mode prédominants d'exposition humaine. Il convient de justifier le choix de la voie et du mode d'administration. Dans l'intérêt des animaux, le gavage oral n'est normalement choisi que pour les substances pour lesquelles cette voie et ce mode d'administration correspondent à une voie d'exposition potentielle raisonnable chez l'homme (produits pharmaceutiques, par exemple). Dans le cas des produits chimiques alimentaires ou environnementaux, notamment les pesticides, l'administration se fait d'ordinaire via le régime alimentaire ou l'eau de boisson. Toutefois, dans certains contextes, tels que l'exposition professionnelle, l'administration par d'autres voies peut être plus appropriée.

29. Si nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il convient de prendre en compte les caractéristiques suivantes du véhicule et des autres additifs, s'il y a lieu: effets sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la prise d'aliments ou d'eau, ou sur l'état nutritionnel des animaux. Il est recommandé, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager en premier lieu l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, puis celle d'une solution ou d'une émulsion dans une huile (par exemple huile de maïs), et en dernier lieu celle d'une solution dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules autres que l'eau sont connues. Il convient de disposer d'informations sur la stabilité de la substance d'essai et sur l'homogénéité des solutions ou rations contenant les différentes doses (selon les cas) dans les conditions d'administration (nourriture, par exemple).

30. Il importe de veiller à ce que les quantités de substances administrées dans les aliments ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou avec l'équilibre hydrique. Dans les études de toxicité à long terme faisant intervenir une administration par voie alimentaire, la concentration de la substance d'essai dans les aliments ne dépasse pas normalement 5 % de la ration totale, afin d'éviter les déséquilibres nutritionnels. Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (mg/kg d'aliment ou ppm), soit un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal (mg/kg de poids corporel), calculé sur une base hebdomadaire. La solution choisie est spécifiée.

▼M4

31. En cas d'administration par voie orale, les animaux reçoivent une dose quotidienne de la substance d'essai (à raison de sept jours par semaine), et ce normalement pendant une période de 12 mois (voir également le paragraphe 33) encore qu'une durée plus longue puisse être requise selon les prescriptions réglementaires. Tout autre régime de dosage, par exemple une administration cinq jours par semaine, fait l'objet d'une justification. En cas d'administration par voie cutanée, les animaux reçoivent normalement le traitement pendant au moins 6 heures par jour, 7 jours par semaine, comme le précise le chapitre B.9 de la présente annexe (10), et ce pendant une période de 12 mois. L'exposition par inhalation est réalisée pendant 6 heures par jour, 7 jours par semaine, mais il est possible, si cela se justifie, de limiter l'exposition à 5 jours par semaine. La période d'exposition est normalement de 12 mois. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le choix d'une durée d'exposition inférieure à 6 heures par jour devra être justifié. Voir également le chapitre B.8 de la présente annexe (8).

32. Lorsque la substance d'essai est administrée aux animaux par gavage, l'opération est pratiquée aux mêmes moments de la journée au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Normalement, une dose unique sera administrée une fois par jour mais lorsque, par exemple, la substance chimique est un irritant local, il pourra être envisagé de maintenir la dose quotidienne en la fractionnant (deux fois par jour). Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Le volume est maintenu aussi faible que possible et ne dépasse pas normalement 1 ml/100 g de poids corporel pour les rongeurs (22). Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à tous les niveaux de doses. Les substances potentiellement corrosives ou irritantes sont l'exception et leur dilution permet d'éviter tout effet local sévère. Il convient d'éviter les concentrations d'essai susceptibles d'être corrosives ou irritantes pour le tube digestif.

Durée de l'étude

33. Bien que la présente méthode d'essai concerne principalement des essais de toxicité chronique d'une durée de 12 mois, le plan de l'étude permet une application de durée plus courte (6 à 9 mois par exemple) ou plus longue (18 à 24 mois), pour répondre aux exigences de régimes réglementaires particuliers ou obtenir des données mécanistiques spécifiques. Les déviations par rapport à une durée d'exposition de 12 mois font l'objet de justifications, surtout dans le cas de durées plus courtes. Les groupes satellites inclus pour contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance d'essai sont maintenus sans traitement, pendant une période d'au moins 4 semaines et d'au plus un tiers de la durée totale de l'étude, après la cessation de l'exposition. Le document d'orientation n° 116 (6) fournit des indications supplémentaires, notamment en ce qui concerne la survie des animaux d'expérience.

OBSERVATIONS

34. Tous les animaux sont soumis à un examen quotidien, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris, pour déterminer la morbidité et la mortalité. Des observations cliniques sont effectuées au moins une fois par jour, de préférence au(x) même(s) moment(s) de la journée, en tenant compte du moment où l'on prévoit que les effets des différentes doses atteindront leur intensité maximale après administration par gavage.

▼M4

35. Tous les animaux font l'objet d'observations cliniques détaillées au moins une fois avant la première exposition (pour permettre des comparaisons intra-individuelles), à la fin de la première semaine de l'étude, et une fois par mois ensuite. Les observations respectent un protocole qui réduit au minimum les variations entre observateurs, et les rend indépendantes du groupe testé. Ces observations sont effectuées hors de la cage où sont logés les animaux, de préférence dans une enceinte normalisée et à heures fixes. Elles sont soigneusement consignées, de préférence en utilisant un système de cotation explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Les conditions d'observation demeurent aussi constantes que possible. Les observations portent notamment porter sur les symptômes suivants (sans que cette liste soit exhaustive): modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux et des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions, et réactions neurovégétatives (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, variation du diamètre pupillaire, respiration anormale). Il convient également de consigner les changements dans la démarche, la posture et les réactions à la manipulation, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques et les comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou bizarres (par exemple, automutilation, marche à reculons) (24).

36. Avant la première administration de la substance d'essai, tous les animaux font l'objet d'un examen ophtalmologique effectué à l'aide d'un ophtalmoscope ou de tout autre appareil approprié. À l'issue de l'étude, cet examen est réalisé de préférence sur tous les animaux, mais au moins sur ceux du groupe traités à la dose la plus élevée et du groupe témoin. Si des altérations oculaires liées au traitement sont détectées, tous les animaux sont examinés. Si l'analyse structurale ou d'autres données suggèrent une toxicité oculaire, il faut augmenter la fréquence des examens oculaires.

37. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets neurotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 jours et/ou 90 jours, une vérification de la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (24) (stimuli auditifs, visuels ou proprioceptifs, par exemple) (25) (26) (27), et une évaluation de la force de préhension (28) ainsi que de l'activité motrice (29) pourront être menées en option. Elles seront réalisées avant le début de l'étude et tous les 3 mois par la suite, jusqu'à 12 mois inclusivement, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois). On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. Toutefois, d'autres modes opératoires que ceux figurant dans ces références sont également utilisables.

38. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets immunotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 jours et/ou 90 jours, d'autres examens sur cet effet peuvent être menés en option à la fin de l'étude.

Poids corporel, prise d'aliments et d'eau, et efficacité nutritionnelle

39. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La prise d'aliments et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la prise d'eau est mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la prise d'eau dans les études où celle-ci est modifiée.

▼M4

Hématologie et biochimie clinique

40. Dans les études faisant intervenir des rongeurs, des examens hématologiques sont effectués sur au moins 10 mâles et 10 femelles de chaque groupe, à 3, 6 et 12 mois, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois), en utilisant les mêmes animaux tout au long de l'étude. Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis (voir paragraphe 18). Dans les études faisant intervenir des non- rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple, 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien) à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, si aucun effet sur les paramètres hématologiques n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Les échantillons de sang sont prélevés en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbitaire, sous anesthésie.

41. Les investigations portent sur les paramètres suivants (30): numération leucocytaire totale et différentielle, numération érythrocytaire et plaquettaire, concentration d'hémoglobine, hématocrite (volume cellulaire sanguin après centrifugation), volume corpusculaire moyen (VCM), hémoglobine corpusculaire moyenne (HCM), concentration d'hémoglobine corpusculaire moyenne (CHCM), temps de prothrombine et temps de thromboplastine partielle activée. D'autres paramètres hématologiques tels que les corps de Heinz et autres anomalies morphologiques érythrocytaires ou la méthémoglobine peuvent être étudiés si nécessaire en fonction de la toxicité de la substance d'essai. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance d'essai donnée. Si la substance d'essai exerce un effet sur le système hématopoïétique, des numérations réticulocytaires et une cytologie médullaire peuvent également être indiquées mais n'ont pas à être pratiquées de manière systématique.

42. Des analyses de biochimie clinique visant à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur le rein et le foie, sont effectuées à partir d'échantillons de sang prélevés sur au moins 10 mâles et 10 femelles de chaque groupe, à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques, et en utilisant les mêmes animaux tout au long de l'étude. Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer toutes les analyses de biochimie clinique nécessaires. Dans les études faisant intervenir des non-rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple, 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien) à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, si aucun effet sur les paramètres de biochimie clinique n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Il est recommandé de faire jeûner les animaux (à l'exception des souris) pendant la nuit qui précède la prise de sang. Les investigations portent sur les paramètres suivants (30): glucose, urée (azote uréique), créatinine, protéines totales, albumine, calcium, sodium, potassium, cholestérol total, au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatocellulaires (alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase, glutamate déshydrogénase, acides biliaires totaux) (31) et au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatobiliaires (phosphatase alcaline, gamma-glutamyl transférase, 5'- nucléotidase, bilirubine totale, acides biliaires totaux) (31). D'autres paramètres de chimie clinique, tels que les triglycérides à jeun, des hormones spécifiques et la cholinestérase peuvent être mesurés si nécessaire en fonction en fonction de la toxicité de la substance d'essai. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance d'essai donnée.

▼M4

43. Des analyses d'urine sont effectuées à partir d'échantillons prélevés sur au moins 10 mâles et 10 femelles de chaque groupe, à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques et de chimie clinique. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des dosages à 3 mois si les analyses d'urine pratiquées dans le cadre d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables n'ont révélé aucun effet. La liste suivante de paramètres à étudier fait partie d'une recommandation d'experts relative aux études de pathologie clinique (30): aspect, volume, osmolalité ou poids spécifique, pH, protéines totales et glucose. D'autres mesures, notamment la recherche de corps cétoniques, d'urobilinogène, de bilirubine et de sang occulte, peuvent aussi être réalisées. L'étude d'autres paramètres peut aussi s'avérer nécessaire pour élargir les recherches sur l'effet ou les effets observés.

44. On considère généralement que dans les études portant sur des chiens, il convient de déterminer les variables hématologiques et de biochimie clinique de base avant le début du traitement, mais que ce n'est pas indispensable dans les études portant sur des rongeurs (30). Toutefois, si l'on ne dispose pas de données historiques de base appropriées (voir paragraphe 50), il convient d'envisager d'en obtenir

Pathologie

Autopsie macroscopique

45. Tous les animaux de l'étude font normalement l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude ou les groupes satellites) pour limiter ces observations à des mesures essentielles telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité (voir paragraphe 19). Il n'est pas nécessaire que ces animaux fassent l'objet d'une autopsie, ni des procédures ultérieures décrites dans les paragraphes qui suivent. L'autopsie des animaux sentinelles peut devoir être effectuée au cas par cas, à la discrétion du directeur d'étude.

46. Il convient de déterminer le poids des organes de tous les animaux hormis ceux mentionnés dans la dernière partie du paragraphe 45. Les glandes surrénales, le cerveau, les épididymes, le cœur, les reins, le foie, les ovaires, la rate, les testicules, la thyroïde (pesée après fixation, avec les glandes parathyroïdes) et l'utérus de tous les animaux (excepté ceux trouvés moribonds et/ou ayant été sacrifiés en cours d'étude) sont débarrassés, le cas échéant, de tout tissu adhérent et pesés à l'état frais dès que possible après la dissection, pour prévenir la dessiccation. Dans les études chez la souris, la pesée des glandes surrénales est facultative.

47. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (32) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif):

toutes les lésions macroscopiques	ganglions lymphatiques (superficiels et profonds)	muscle squelettique	rein
aorte	glande coagulante	nerf périphérique	[sternum]
[bulbe olfactif]	glande de Harder	[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]	testicule
cæcum	glande lacrymale (exorbitale)	œil (dont rétine)	thymus
cerveau (y compris segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)	œsophage	thyroïde
cœur	glande salivaire	ovaire	trachée

▼M4

col utérin	glande surrénale	pancréas	[uretère]
côlon	hypophyse	parathyroïde	[urètre]
[dents]	iléon	peau	utérus (col inclus)
duodénum	jéjunum	poumon	vagin
épididyme	[langue]	prostate	vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)
estomac (pré-estomac, estomac glandulaire)	moelle épinière (niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)	rate	vésicule séminale
[fémur avec articulation]	segment de moelle osseuse et/ou moelle osseuse fraîchement ponctionnée	rectum	vessie
foie			

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues de la substance d'essai sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu de conserver les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale, et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Pour les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des chapitres B.8 (8) et B.29 (9) de la présente annexe. Pour les autres organes et tissus (outre les tissus de l'appareil respiratoire spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

Histopathologie

48. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (32). Au minimum, les examens histopathologiques devront porter sur les tissus suivants:

— tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin,

— tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude,

— tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques,

— tissus des organes cibles, ou tissus présentant des altérations dues au traitement dans le groupe à dose élevée, prélevés sur tous les animaux de tous les autres groupes de doses,

— dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

▼M4

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

49. Des données sont recueillies pour chaque animal sur tous les paramètres évalués. En outre, toutes les données sont résumées sous forme de tableaux synoptiques indiquant, pour chaque groupe expérimental, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés, ainsi que le moment de l'apparition, la durée et la gravité de tous les effets toxiques observés, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les tableaux récapitulatifs présentent les moyennes et les écarts types (pour les données recueillies en continu) pour les animaux présentant des effets toxiques ou des lésions, ainsi qu'une cotation des lésions.

50. Les données de contrôle historiques peuvent faciliter l'interprétation des résultats de l'étude, par exemple lorsque les données provenant des témoins concurrents semblent diverger de manière significative de données récentes obtenues sur des animaux témoins issus de la même installation d'essai/colonie d'élevage. Si elles sont évaluées, les données de contrôle historiques émanent du même laboratoire et porter sur des animaux du même âge et de la même souche, produits dans les cinq ans précédant l'étude en question.

51. Si possible, les résultats numériques devront être évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Les méthodes statistiques et les données à analyser sont choisies au moment de la conception de l'étude (paragraphe 8). Ce choix permet d'opérer des ajustements en fonction de la survie, si nécessaire.

Rapport d'essai

52. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique, pureté et propriétés physico-chimiques,

— données d'identification,

— provenance de la substance d'essai,

— numéro de lot,

— certificat d'analyse chimique.

Véhicule (le cas échéant):

— justification du choix de véhicule (s'il est autre que l'eau).

Animaux d'expérience:

— espèce/souche utilisée et justification du choix opéré,

— nombre, âge et sexe des animaux au début de l'essai,

▼M4

— provenance, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions expérimentales:

— justification de la voie d'administration et du choix des doses,

— le cas échéant, méthodes statistiques utilisées pour analyser les données,

— détails concernant la formulation de la substance d'essai ou son incorporation dans les aliments,

— données analytiques sur la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,

— voie d'administration et détails concernant l'administration de la substance d'essai,

— pour les études par inhalation, mention de la voie d'entrée (nez seul ou corps entier),

— doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et, le cas échéant, facteur de conversion en dose réelle de la concentration de la substance d'essai (en mg/kg ou en ppm) dans les aliments ou l'eau de boisson,

— détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats (les résultats comprendront des données générales sous forme de tableaux synoptiques et des données propres à chaque animal):

— données sur la survie,

— poids corporel/variations du poids corporel,

— prise d'aliments, calculs de l'efficacité alimentaire, si effectués, et prise d'eau, le cas échéant,

— réponse toxique par sexe et dose, y compris signes de toxicité,

— nature, incidence (et, si elle est évaluée, sévérité), et durée des observations cliniques (transitoires ou permanentes),

— examen ophtalmologique,

— examens hématologiques,

— épreuves de biochimie clinique,

— examens d'urine,

— résultats des recherches de neurotoxicité ou d'immunotoxicité,

— poids corporel à l'issue de l'essai,

— poids des organes (et leur rapport au poids corporel, le cas échéant),

— résultats d'autopsie,

— description détaillée de tous les résultats histopathologiques liés au traitement,

— données relatives à l'absorption, le cas échéant.

▼M4

Traitement statistique des résultats, le cas échéant

Discussion des résultats, notamment:

— relations dose-réponse,

— examen de toutes les informations concernant le mode d'action,

— examen de toutes les approches de modélisation,

— détermination des DR, DSENO et DMENO (dose minimale avec effet nocif observé),

— données de contrôle historiques,

— applicabilité des résultats à l'être humain.

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE:

(1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), document de travail interne, direction de l'environnement, OCDE, Paris.

(2) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(3) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal- based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.

(4) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206, 437-445.

(5) Chapitre B.27 de la présente annexe, Toxicité orale subchronique, Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours.

(6) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 et 453 – Second edition. Série sur les essais et évaluations n° 116, disponible sur le site public de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (www.oecd.org/env/testguidelines).

(7) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(8) Chapitre B.8 de la présente annexe, Toxicité subaiguë par inhalation: étude sur 28 jours.

(9) Chapitre B.29 de la présente annexe, Toxicité subchronique par inhalation: étude sur 90 jours.

(10) Chapitre B.9 de la présente annexe, Toxicité cutanée à doses répétées – étude sur 28 jours.

(11) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(12) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(13) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

▼M4

(14) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al*. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(15) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(16) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(17) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 - 837.

(18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(19) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).

(20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, DC, US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(25) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(26) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(27) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(28) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(29) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

▼**M4**

(30) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(31) EMEA (draft) document «Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity» (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼B

B.31. ÉTUDE DE LA TOXICITÉ POUR LE DÉVELOPPEMENT PRÉNATAL

1. MÉTHODE

Cette méthode est calquée sur la ligne directrice d'essai nº 414 (2001) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode d'essai relative à la toxicité pour le développement est destinée à livrer des informations générales concernant les effets d'une exposition prénatale sur la femelle gravide et sur l'organisme en développement qu'elle porte en elle; cela recouvre notamment l'évaluation des effets sur la mère, ainsi que la mortalité fœtale, les anomalies structurelles ou les altérations de croissance du fœtus. Les déficits fonctionnels, qui représentent pourtant un aspect important du développement, ne sont pas étudiés dans le cadre de la présente méthode d'essai. Ces déficits peuvent être étudiés séparément ou en complément à la présente méthode dans le cadre de la méthode d'essai relative à la neurotoxicité pour le développement. Cette dernière méthode ainsi que la méthode relative à la toxicité pour la reproduction sur deux générations indiquent comment dépister les déficits fonctionnels et d'autres effets postnataux.

Il est possible que la présente méthode d'essai nécessite certaines adaptations dans des cas particuliers, compte tenu, par exemple, des propriétés physico-chimiques ou toxicologiques spécifiques de la substance d'essai. Ces adaptations sont acceptables lorsque des données scientifiques convaincantes donnent à penser qu'elles rendront l'essai plus informant. Le cas échéant, ces données scientifiques devront être soigneusement consignées dans le rapport d'essai.

1.2 DÉFINITIONS

Toxicologie du développement: l'étude des effets nocifs sur un organisme en développement, qui peuvent résulter d'une exposition antérieure à la conception, contemporaine au développement prénatal ou postnatale, jusqu'à la maturation sexuelle. La toxicité pour le développement se manifeste principalement par 1) la mort de l'organisme; 2) une anomalie structurelle; 3) une altération de croissance; 4) un déficit fonctionnel. Autrefois, la toxicologie du développement était souvent dénommée «tératologie».

Effet nocif: toute altération liée au traitement par rapport à une situation de référence, qui diminue la capacité d'un organisme à survivre, se reproduire ou s'adapter à l'environnement. La toxicologie du développement, prise dans son sens le plus large, inclut tous les effets qui interfèrent avec le développement normal du produit de conception, avant et après la naissance.

Altération de croissance: une altération qui touche les organes ou le poids corporel ou la taille de la progéniture.

Altérations (anomalies): altérations structurelles du développement qui comprennent les malformations et les variations (28).

Malformation/Anomalie majeure: changement structurel considéré comme préjudiciable à l'animal (peut aussi être létal) et généralement rare.

▼B

Variation/Anomalie mineure: changement structurel considéré comme peu ou pas préjudiciable à pour l'animal; peut être transitoire et peut survenir fréquemment dans la population témoin.

Produit de conception: l'ensemble des produits de la fécondation d'un œuf, à n'importe quel stade du développement entre la fécondation et la naissance, comprenant les membranes extra-embryonnaires et l'embryon ou le fœtus.

Implantation (nidation): la fixation du blastocyste à la muqueuse épithéliale de l'utérus, y compris la pénétration du blastocyste dans l'épithélium utérin et la nidation dans l'endomètre.

Embryon: le premier stade de développement d'un organisme, plus précisément la phase de développement d'un œuf fécondé qui commence après l'apparition du grand axe et s'achève quand toutes les structures principales sont présentes.

Embryotoxicité: nocivité pour la structure, le développement, la croissance et/ou la viabilité d'un embryon.

Fœtus: produit de conception, durant la période post-embryonnaire.

Fœtotoxicité: nocivité pour la structure, le développement, la croissance et/ou la viabilité d'un fœtus.

Avortement: expulsion prématurée hors de l'utérus des produits de conception: embryon ou fœtus non viable.

Résorption: phénomène par lequel un produit de conception qui meurt après l'implantation se résorbe ou a été résorbé.

Résorption précoce: trace d'implantation non accompagnée d'un embryon ou d'un fœtus reconnaissable.

Résorption tardive: embryon ou fœtus mort qui présente des changements dégénératifs externes.

DSET: dose sans effet toxique (correspond à la NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Aucune

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Normalement, la substance d'essai est administrée aux femelles gravides, au moins à partir de la nidation et jusqu'à la veille du sacrifice, lequel devrait être programmé à une date aussi proche que possible du jour probable de mise bas, sans être trop tardif pour éviter la perte de données en cas de mise bas prématurée. La méthode d'essai ne porte pas uniquement sur la période de l'organogenèse (comprise, par exemple entre le 5ème et le 15^{e} jour chez les rongeurs et entre le 6^{e} et le 18^{e} jour chez le lapin), mais étudie aussi les effets survenus tout au long de la gestation, depuis le stade préimplantatoire, selon les besoins, jusqu'à la veille de la césarienne. Les femelles sont sacrifiées peu avant la césarienne, le contenu utérin est examiné et les fœtus étudiés pour détecter les anomalies externes visibles ainsi que les modifications des tissus mous et du squelette.

▼B

1.5. DESCRIPTION DE LÀ MÉTHODE D'ESSAI

1.5.1. **Choix de l'espèce animale**

Il est recommandé de pratiquer l'essai sur l'espèce la plus appropriée et d'employer les espèces et les souches de laboratoire couramment utilisées dans les essais de toxicité prénatale pour le développement. L'espèce de rongeur préféré est le rat et l'espèce non-rongeur préféré est le lapin. Le cas échéant, l'emploi d'une autre espèce doit être justifié.

1.5.2. **Conditions d'encagement et d'alimentation**

L'animalerie doit être à 22 ºC (± 3º) pour les rongeurs et à 18 ºC (± 3º) pour les lapins, avec un taux d'humidité relative d'au moins 30 % et de préférence inférieur à 70 % sauf durant le nettoyage de la salle, l'idéal se situant entre 50 et 60 %. On appliquera un éclairage artificiel, avec un cycle de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Un régime alimentaire classique pour animaux de laboratoire, avec eau potable à satiété, conviendra.

L'accouplement doit se dérouler dans des cages appropriées. Bien qu'il soit préférable de placer les animaux s'étant accouplés dans des cages individuelles, l'encagement par petits groupes est aussi acceptable.

1.5.3 **Préparation des animaux**

Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours et n'ayant pas été soumis à d'autres essais. On indiquera l'espèce, la souche, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience. Les animaux de tous les groupes d'essai devraient, dans toute la mesure du possible, être du même âge et du même poids. On emploiera de jeunes femelles adultes et nullipares pour chaque dose. On accouplera les femelles avec des mâles de la même espèce et de la même souche, sans accoupler les membres d'une même fratrie. Dans le cas des rongeurs, le jour 0 de la gestation est celui où l'on observe un bouchon vaginal et/ou la présence de sperme; s'agissant des lapins, le jour 0 est ordinairement celui du coït ou de l'insémination artificielle si cette technique est utilisée. Les femelles accouplées seront réparties au hasard entre groupes traités et groupes témoins. On installera les cages de façon à réduire au minimum les éventuels effets liés à leur emplacement. Chaque animal sera désigné par un numéro d'identification propre. En cas d'accouplement par lots, les animaux d'un même lot seront répartis uniformément entre les groupes. De la même façon, les femelles inséminées par un même mâle seront réparties uniformément entre les groupes.

1.6 MODE OPÉRATOIRE

1.6.1 **Nombre et sexe des animaux**

Chaque groupe traité et témoin doit contenir un nombre de femelles suffisant pour qu'une autopsie puisse être pratiquée sur environ 20 femelles présentant un point d'implantation. Des groupes comptant moins de 16 femelles présentant un point d'implantation risquent d'être inadéquats. La mortalité maternelle n'invalide pas nécessairement l'étude, tant qu'elle demeure inférieure à 10 pour cent environ.

▼B

1.6.2 **Préparation des doses**

Si on emploie un véhicule ou un autre additif pour faciliter l'administration des doses, il convient d'être attentif aux effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et la rétention ou l'excrétion de la substance d'essai, aux effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai, lesquels sont susceptibles de modifier sa toxicité ainsi qu'aux effets sur la consommation de nourriture ou d'eau et sur l'état nutritionnel des animaux. Le véhicule ne doit pas être toxique pour le développement ni influer sur la reproduction.

1.6.3 **Dosage**

Normalement, la substance d'essai est administrée quotidiennement depuis la nidation (par exemple 5 jours après l'accouplement) jusqu'à la veille du jour où la césarienne est prévue. Si des études préliminaires, le cas échéant, ne font pas état d'un risque élevé de pertes pré-implantatoires, il est possible d'administrer le traitement pendant toute la durée de la gestation, depuis l'accouplement jusqu'à la veille de la césarienne. Nul n'ignore que le stress ou des erreurs de manipulation pendant la gestation peuvent engendrer des pertes prénatales. Afin de prévenir des pertes fœtales non liées au traitement, on évitera de manipuler inutilement les femelles gravides ou de les soumettre à des facteurs de stress externes comme le bruit.

On utilise au moins trois doses différentes et un groupe témoin en parallèle. Des animaux sains sont répartis au hasard entre les groupes traités et témoins. Les doses doivent être espacées de façon à produire une gradation des effets toxiques. Sauf limitations imposées par les propriétés physiques, chimiques ou biologiques de la substance d'essai, la dose la plus élevée devrait avoir une certaine toxicité pour le développement et/ou la mère (signes cliniques ou diminution du poids corporel), sans entraîner la mort ni provoquer des souffrances importantes. Au moins une dose intermédiaire devrait donner lieu à la plus faible manifestation observable de toxicité. La dose la plus faible ne devrait produire aucun signe de toxicité pour la mère ou pour le développement. Il convient de choisir une série décroissante doses afin de mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet et une concentration maximale sans effet nocif observé (DSET). L'écart optimal entre les doses d'une série décroissante est généralement d'un facteur deux ou quatre et l'adjonction d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation d'écarts trop importants (par exemple, supérieurs à un facteur dix). Bien que le but soit d'établir une DSET maternelle, les études qui n'aboutissent pas à la détermination de cette valeur sont également acceptables (1).

Les doses doivent être choisies en tenant compte de toutes les données de toxicité disponibles ainsi que des informations complémentaires sur le métabolisme et la toxicocinétique de la substance d'essai ou de substances apparentées. Ces informations seront aussi utiles pour justifier l'échelle des doses.

On incorporera un groupe témoin en parallèle. La substance d'essai n'est pas administrée à ce groupe qui n'est traité que par le véhicule, le cas échéant. Tous les groupes doivent recevoir le même volume de substance d'essai ou de véhicule. Les animaux du ou des groupes témoins seront manipulés de la même façon que les animaux du groupe d'essai. Les groupes témoins auxquels on administre le véhicule doivent recevoir la plus grande quantité utilisée de ce dernier (celle que reçoit le groupe traité à la dose la plus faible).

▼B

1.6.4 **Essai limite**

Si un essai réalisé à une dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, administrée par voie orale, selon la méthode décrite dans cette étude, n'entraîne aucune toxicité apparente chez les femelles gravides ou dans leur progéniture, et qu'aucun effet n'est escompté au vu des données disponibles (concernant, par exemple, des composés présentant une structure et/ou une action métabolique analogues) il n'est pas indispensable de mener une étude complète sur trois doses différentes. Suivant le niveau d'exposition humaine prévu, il peut être nécessaire d'appliquer une dose orale plus élevée dans l'essai limite. Pour d'autres modes d'administration, tels que l'inhalation ou l'application cutanée, ce sont souvent les propriétés physicochimiques de la substance d'essai qui définissent et limitent le niveau maximal d'exposition pouvant être atteint (par exemple, l'application cutanée ne doit faire apparaître aucune toxicité locale grave).

1.6.5 **Administration des doses**

La substance d'essai ou le véhicule sont habituellement administrés oralement par intubation. Si l'expérimentateur opte pour un autre mode d'administration, il devra motiver sa décision et justifier son choix, et procéder aux modifications nécessaires (2) (3) (4). La substance d'essai doit être administrée à peu près à la même heure chaque jour.

Normalement, on calcule la dose destinée à chaque animal d'après la pesée la plus récente de ce dernier. Il convient toutefois d'être prudent lorsqu'on adapte la dose au cours du dernier tiers de la gestation. On s'appuiera sur les données existantes pour sélectionner la dose de façon à prévenir un excès de toxicité pour la mère. Néanmoins, si on constate une toxicité excessive chez les mères traitées, il faudra les euthanasier. Si plusieurs femelles gravides manifestent des signes de toxicité excessive, on envisagera de sacrifier le groupe traité à cette dose. Si on recourt au gavage, il faudrait de préférence administrer la substance en une seule fois à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule appropriée. Le volume maximal de liquide administrable en une seule fois dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où l'on peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Lorsqu'on utilise de l'huile de maïs comme véhicule, le volume ne devrait pas excéder 0,4 ml/100 g de poids corporel. On réduira au minimum la variabilité du volume d'essai en adaptant les concentrations de façon à obtenir un volume constant à toutes les doses.

1.6.6 **Observation des mères**

Les observations cliniques sont effectuées et notées au moins une fois par jour, de préférence à la ou aux mêmes heures, en tenant compte de la période durant laquelle on prévoit que les effets atteindront leur intensité maximale. On consignera l'état des animaux, notamment, les animaux morts ou moribonds, les changements comportementaux pertinents et tous les signes de toxicité apparents.

1.6.7 **Poids corporel et consommation de nourriture**

Les animaux sont pesés au jour 0 de gestation ou au plus tard au jour 3 si des animaux déjà accouplés sont fournis par un éleveur extérieur, puis au premier jour de traitement et au moins tous les trois jours durant la période d'administration et enfin le jour du sacrifice.

▼B

Le relevé de la consommation d'aliments doit être effectué tous les trois jours et coïncider avec les jours de pesée des animaux.

1.6.8 **Autopsie**

On sacrifiera les femelles un jour avant la date prévue de mise bas. Les femelles qui présentent des signes d'avortement ou de mise bas prématurée avant la date prévue du sacrifice doivent être sacrifiées et faire l'objet d'un examen macroscopique complet.

Juste après le sacrifice ou la mort en cours de l'étude, les mères sont soumises à un examen macroscopique destiné à mettre en évidence d'éventuels changements pathologiques ou anomalies structurelles. Pour demeurer objectif, il est préférable que l'expérimentateur ignore la dose administrée au groupe lors de l'observation des mères au cours de la césarienne et de l'examen subséquent des fœtus.

1.6.9 **Examen du contenu utérin**

Il y a lieu d'enlever l'utérus juste après le sacrifice ou dès que possible après la mort pour s'assurer de l'état de gravidité des femelles. On examinera aussi les utérus apparemment non gravides (par exemple, par coloration au sulfure d'ammonium chez les rongeurs et par la coloration de Salewski ou par une méthode équivalente appropriée chez les lapins) pour confirmer la non-gravidité (5).

Les utérus gravides sont pesés, col inclus. Les poids des utérus gravides de femelles mortes en cours d'essai ne sont pas déterminés.

On compte le nombre de corps jaunes chez les femelles gravides.

Le contenu utérin est examiné afin de relever le nombre d'embryons ou de fœtus morts et le nombre de fœtus viables. Il est nécessaire de décrire le degré de résorption pour évaluer la date approximative de la mort du produit de conception (voir paragraphe 1.2).

1.6.10 **Examen des fœtus**

Il convient de déterminer le sexe et le poids corporel de chaque fœtus.

On recherche la présence d'altérations externes sur chaque fœtus.

On examine les fœtus pour voir s'ils présentent des altérations du squelette ou des tissus mous (par exemple des variations et des malformations ou des anomalies) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). La catégorisation des altérations fœtales est préférable, mais facultative. Si on procède à une catégorisation, il faut stipuler clairement les critères qui définissent chaque catégorie. On vérifiera avec une attention particulière si le développement du tractus génital n'a pas été altéré.

Pour les rongeurs, on prépare environ la moitié de chaque portée en vue de l'examen des altérations squelettiques. Le restant sera préparé en vue de l'examen des altérations des tissus mous, lequel sera conduit au moyen de coupes sériées réalisées suivant des méthodes reconnues ou appropriées ou de techniques soignées de dissection macroscopique.

▼B

S'agissant des non-rongeurs, par exemple les lapins, les éventuelles altérations des tissus mous et du squelette doivent être recherchées sur tous les fœtus. On examine les corps de ces fœtus en les disséquant soigneusement pour repérer des altérations des tissus mous; cette opération peut faire appel à une technique permettant d'effectuer un examen plus approfondi de la structure cardiaque interne (25). Les têtes de la moitié des fœtus examinés de cette manière doivent être prélevées et préparées en vue de l'évaluation des altérations des tissus mous (notamment les yeux, le cerveau, les conduits nasaux et la langue), selon des techniques classiques de coupes sériées (26) ou une méthode ayant la même sensibilité. Les corps de ces fœtus et ceux des fœtus intacts restants sont préparés puis examinés pour établir s'ils présentent des altérations squelettiques, à l'aide des mêmes méthodes que pour les rongeurs.

2. RÉSULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Les résultats sont consignés séparément pour chaque femelle et sa progéniture, et résumés sous forme de tableaux, reprenant pour chaque groupe d'essai et chaque génération, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux morts durant l'essai ou euthanasiés, la date de chaque mort ou euthanasie, le nombre de femelles gravides, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés, notamment le moment où ils ont débuté, leur durée et leur gravité, les types d'observations pratiquées sur les embryons ou fœtus et toutes les données pertinentes sur la portée.

On évaluera les résultats numériques par une méthode statistique appropriée, en prenant la portée comme unité pour l'analyse des résultats. Il convient d'utiliser une méthode statistique reconnue; le choix de la méthode doit intervenir au stade de la conception de l'étude et doit être justifié. Les résultats concernant les animaux qui n'ont pas survécu jusqu'à la date programmée du sacrifice doivent aussi être consignés. Ces résultats peuvent être inclus dans les moyennes des groupes, s'il y a lieu. La pertinence des résultats obtenus pour ces animaux et partant, la décision de les inclure ou non dans une moyenne de groupe, doit être appréciée au cas par cas.

2.2. ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Les résultats de l'étude de toxicité pour le développement prénatal doivent être évalués du point de vue des effets observés. L'évaluation doit comprendre les informations suivantes:

— les résultats des essais maternels et fœtaux, incluant une évaluation de la relation, ou de l'absence de relation, entre l'exposition des animaux à la substance d'essai et la fréquence et la gravité de tous les effets observés,

— les critères appliqués pour catégoriser, le cas échéant, les altérations externes des fœtus, et les altérations de leurs tissus mous ou de leur squelette,

▼B

— selon les besoins, les données antérieures relatives aux témoins pour affiner l'interprétation des résultats de l'étude,

— les nombres utilisés pour calculer tous les pourcentages ou indices,

— l'analyse statistique appropriée des résultats de l'étude; il convient de fournir suffisamment d'informations sur la méthode d'analyse, pour qu'un réviseur ou un statisticien indépendant puisse réévaluer et reconstruire l'analyse.

Pour toute étude ne révélant aucun effet toxique, il y a lieu d'envisager des expériences complémentaires destinées à déterminer l'absorption et la biodisponibilité de la substance d'essai.

2.3. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Une étude de la toxicité pour le développement prénatal fournit des informations sur les effets de l'exposition répétée à une substance administrée durant la gestation sur les mères et sur le développement intra-utérin de leur progéniture. Les résultats de cette étude doivent être interprétés à la lumière de ceux des études de toxicité subchronique, de reproduction, des études toxicocinétiques et autres. Comme l'étude est centrée à la fois sur la toxicité générale du point de vue de la mère et sur la toxicité pour le développement, ses résultats permettront dans une certaine mesure de distinguer les effets sur le développement qui surviennent en l'absence d'une toxicité générale, des effets qui n'apparaissent qu'à des doses qui sont également toxiques pour la mère (27).

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit inclure les informations particulières énumérées ci-dessous:

Substance d'essai:

— état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques,

— identification, y compris le numéro du CAS s'il est connu,

— pureté.

Véhicule (le cas échéant):

— justification du choix du véhicule s'il diffère de l'eau.

Animaux d'expérience:

— espèce et souche utilisée,

— nombre et sexe des animaux,

— origine, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions d'essai:

— justification du choix des doses appliquées,

— détails concernant la préparation de la substance d'essai ou son incorporation aux aliments, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,

▼B

— détails sur l'administration de la substance d'essai,

— conversion de la concentration de la substance d'essai (ppm) dans la nourriture ou l'eau de boisson en dose administrée (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu,

— conditions ambiantes,

— détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats:

Données relatives à la toxicité pour la mère en fonction des doses, précisant entre autres:

— le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre de survivants, le nombre de femelles gravides, le nombre d'avortements et de mises bas prématurées,

— le jour de la mort si celle-ci est intervenue en cours d'essai et le nombre des animaux ayant survécu jusqu'au jour du sacrifice,

— les résultats concernant les animaux qui n'ont pas survécu jusqu'à la date du sacrifice doivent être consignés, mais non inclus dans les comparaisons statistiques entre les groupes,

— le jour de l'observation de chaque signe clinique anormal et son évolution ultérieure,

— le poids corporel, sa variation et le poids de l'utérus gravide, y compris, si on le souhaite, la variation du poids corporel corrigée en fonction du poids de l'utérus gravide,

— la consommation de nourriture, et d'eau si elle a été mesurée,

— les résultats de l'autopsie, y compris le poids de l'utérus,

— les valeurs de la DSET se rapportant aux effets sur la mère et sur le développement.

Données concernant les effets sur le développement en fonction des doses, pour les portées attestées par des implantations, notamment:

— nombre de corps jaunes,

— nombre d'implantations, nombre et pourcentage de fœtus vivants et morts et nombre de résorptions,

— nombre et pourcentage de pertes pré- et postimplantatoires.

Données concernant les effets sur le développement en fonction des doses, pour les portées comportant des fœtus vivants, notamment:

— nombre et pourcentage de descendants vivants,

— proportion de mâles et de femelles,

— poids corporel des fœtus, de préférence par sexe et pour les deux sexes confondus;

— malformations externes, des tissus mous et du squelette et autres altérations pertinentes,

— critères de catégorisation, le cas échéant,

▼B

— nombre total et pourcentage de fœtus et de portées présentant une quelconque altération externe, des tissus mous ou du squelette; types et fréquence des différentes anomalies et autres altérations pertinentes.

Discussion

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.

(2) Kimmel, CA. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied* Toxicology 14; 386-398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CUT Activities* 17; 1-8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.

(6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology.* D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32: 381-391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47:229-242..

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; :398-408.

(14) Kimmel, CA. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual,* pp. 163-173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61-63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181-188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton.* Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques*, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology,* Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233-239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249-292.

▼M4

B.32. ÉTUDES DE CANCÉROGENÈSE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 451 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La ligne directrice 451 initiale sur les études de cancérogenèse a été adoptée en 1981. Sa révision a été jugée nécessaire afin de tenir compte des évolutions récentes dans le domaine du bien-être animal, ainsi que des nouvelles exigences réglementaires (2) (3) (4) (5) (6). La mise à jour de la présente méthode d'essai B.32 a été effectuée en parallèle avec la révision des chapitres B.30 (études de toxicité chronique) et B.33 (études combinées de toxicité chronique et de cancérogenèse) de la présente annexe, dans le but d'obtenir des informations additionnelles à partir des animaux utilisés dans l'étude, et de fournir des précisions concernant le choix des doses. La présente méthode d'essai B.32 vise les essais portant sur une large gamme de produits chimiques, dont des pesticides et des produits chimiques industriels. Il convient toutefois de noter que certains aspects et certaines dispositions peuvent différer pour les produits pharmaceutiques (voir la Conférence internationale sur l'harmonisation, thème S1B: évaluation de la cancérogénicité des produits pharmaceutiques).

2. La plupart des études de cancérogenèse étant menées sur des espèces de rongeurs, la présente méthode d'essai est destinée à s'appliquer principalement à des études réalisées avec ces espèces. S'il s'avérait nécessaire de mener de telles études avec des non-rongeurs, il conviendrait d'appliquer, moyennant des modifications appropriées, les principes et procédures décrits dans la présente méthode d'essai et au chapitre B.27 – Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours – de la présente annexe (6). Des informations complémentaires peuvent aussi être trouvées dans le document d'orientation de l'OCDE nº 116 sur l'élaboration et la conduite des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (7).

3. Les trois principales voies d'administration utilisées dans les études de cancérogenèse sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance d'essai et de la voie d'exposition prédominante chez l'homme. Des informations complémentaires sur le choix de la voie d'exposition sont fournies dans le document d'orientation nº 116 (7).

4. La présente méthode d'essai porte principalement sur l'exposition par voie orale, la voie la plus communément utilisée dans les études de cancérogenèse. Bien que des études de cancérogenèse utilisant l'exposition par voie cutanée ou par inhalation puissent aussi être nécessaires pour évaluer le risque pour la santé humaine et/ou exigées en vertu de certains régimes réglementaires, ces deux voies d'exposition nécessitent des dispositifs techniques d'une grande complexité. De telles études devront être conçues au cas par cas, encore que la présente méthode d'essai, qui porte sur la caractérisation et l'évaluation de la cancérogénicité par voie orale, puisse fournir les bases d'un protocole d'étude par voie cutanée ou par inhalation, notamment en ce qui concerne les recommandations relatives aux durées de traitement, aux paramètres cliniques et pathologiques, etc. Il existe des documents d'orientation de l'OCDE sur l'administration expérimentale de substances d'essai par voie cutanée (7) et par inhalation (7) (8). Les chapitres B.8 (9) et B.29 (10) de la présente annexe, ainsi que le document d'orientation de l'OCDE sur l'essai de toxicité aiguë par inhalation (8), méritent tout particulièrement d'être consultés lors de la conception d'études à long terme portant sur une exposition par inhalation. Le chapitre B.9 de la présente annexe (11) doit être consulté dans le cas d'un essai portant sur la voie cutanée.

▼M4

5. L'étude de cancérogenèse donne des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée pendant une période pouvant couvrir la vie entière de l'espèce considérée. L'étude fournit des informations sur les effets toxiques de la substance d'essai, y compris sur son pouvoir cancérogène, et peut indiquer les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes. Elle peut aussi donner une estimation de la dose sans effet nocif observé pour ce qui est des effets toxiques et, dans le cas des substances cancérogènes non génotoxiques, des réponses tumorales. Cette estimation permet d'établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine. De plus, il convient d'accorder une attention particulière à l'observation clinique des animaux afin d'obtenir le plus d'informations possibles.

6. Les objectifs des études de cancérogenèse couvertes par la présente méthode d'essai sont les suivants:

— identification des propriétés cancérogènes d'une substance d'essai susceptibles d'augmenter les risques de néoplasmes, la fréquence de survenue de néoplasmes malins ou la diminution du temps nécessaire à leur apparition, par rapport aux groupes témoins concurrents,

— identification d'un ou de plusieurs organes cibles de la cancérogenèse,

— identification du temps d'apparition des néoplasmes,

— caractérisation de la relation entre la dose administrée et la réponse tumorale,

— identification du niveau de dose sans effet nocif observé (DSENO) ou du point de départ pour l'établissement d'une dose de référence (DR),

— extrapolation des effets cancérogènes aux niveaux d'exposition humaine correspondant à de faibles doses,

— obtention de données permettant de vérifier les hypothèses concernant le mode d'action (2) (7) (12) (13) (14) (15).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

7. Pour caractériser et évaluer la cancérogénicité potentielle d'un produit chimique, le laboratoire chargé de l'étude prend en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de réaliser l'étude, afin de pouvoir orienter celle-ci de manière à tester plus efficacement le potentiel cancérogène de la substance, et faire le moins possible appel aux animaux. La connaissance du mode d'action d'un agent cancérogène suspecté et sa prise en compte (2) (7) (12) (13) (14) (15) sont particulièrement importantes puisque la conception optimale de l'essai peut différer selon que la substance d'essai est ou n'est pas un agent cancérogène génotoxique connu ou suspecté. Des informations complémentaires sur certains aspects du mode d'action peuvent être trouvées dans le document d'orientation n° 116 (7).

8. Les informations utiles pour concevoir l'étude sont notamment: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les résultats de toutes les études de toxicité in vitro ou in vivo menées et notamment des essais de génotoxicité; l'utilisation (les utilisations) prévue(s) et le potentiel d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques (par exemple mutagénicité, génotoxicité et pouvoir cancérogène) relatives aux substances chimiques structurellement apparentées; les données toxicocinétiques disponibles (dose unique et doses répétées, si ces données existent) et les résultats d'autres études à doses répétées. La caractérisation du pouvoir cancérogène est effectuée après obtention des

▼M4

premiers résultats d'essais de toxicité à doses répétées menés sur 28 jours et/ou 90 jours. Les essais d'initiation-promotion de cancers à court terme peuvent aussi livrer des informations utiles. Il convient d'envisager l'adoption d'une approche par étapes pour l'étude expérimentale de la cancérogenèse entreprise dans le cadre de l'évaluation globale des effets nocifs potentiels d'une substance d'essai (16) (17) (18) (19).

9. Les méthodes statistiques les plus appropriées pour l'analyse des résultats, compte tenu du plan expérimental et des objectifs de l'étude, sont identifiées avant le début de l'étude. Il convient notamment de déterminer si les statistiques doivent prendre en compte l'ajustement en fonction de la survie, l'analyse des risques de tumeurs cumulées liés à la durée de survie, l'analyse du temps nécessaire à l'apparition d'une tumeur et l'analyse effectuée en cas de mort prématurée des animaux d'un ou de plusieurs groupes. On trouvera des indications concernant les analyses statistiques appropriées, ainsi que des références clés à des méthodes statistiques reconnues au plan international, dans le document d'orientation n° 116 (7), ainsi que dans le document d'orientation n° 35 sur l'analyse et l'évaluation des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (20).

10. Lors de la réalisation d'une étude de cancérogenèse, il est recommandé de toujours suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques comme effets observés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (21). Le paragraphe 62 de ce document, en particulier, stipule ce qui suit: «*Dans les études comportant l'administration de doses répétées, lorsqu'un animal présente des signes cliniques progressifs de détérioration de son état, une décision d'euthanasier ou non l'animal est prise en connaissance de cause. Cette décision met en balance des facteurs tels que la valeur des informations pouvant être obtenues en maintenant l'animal dans l'étude d'une part, et l'état général de celui-ci d'autre part. Si la décision est prise de poursuivre l'essai sur cet animal, la fréquence des observations est augmentée selon les besoins. Il est aussi possible, sans toutefois nuire à l'objectif de l'essai, d'interrompre l'administration de la substance d'essai pour soulager la douleur ou la détresse de l'animal, ou de réduire la dose testée.*»

11. On trouvera des informations détaillées et une discussion sur les principes déterminant le choix des doses pour les études de toxicité chronique et de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (7), ainsi que dans deux publications de l'Institut international des sciences de la vie (22) (23). La stratégie de base pour le choix des doses dépend du ou des principaux objectifs de l'étude (paragraphe 6). En choisissant des niveaux de doses appropriés, il convient de trouver un équilibre entre, d'une part, l'identification des dangers et, d'autre part, la caractérisation des réponses aux faibles doses et leur pertinence. Cet équilibre est particulièrement nécessaire dans le cas où une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe) est menée (paragraphe 12).

12. Il convient d'examiner l'opportunité de réaliser une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe) plutôt que de réaliser séparément une étude de toxicité chronique (chapitre B.30 de la présente annexe) et une étude de cancérogenèse (la présente méthode d'essai B.32). L'essai combiné permet une meilleure efficacité en temps et en coûts par rapport à la conduite de deux essais séparés, et ne compromet pas la qualité des données de la phase chronique ou de la phase de cancérogenèse. Lors de la réalisation d'une étude combinée (chapitre B.33 de la présente annexe), il convient toutefois de respecter les principes déterminant le choix de la dose (paragraphes 11 et 22 à 25) et il est également reconnu que certains cadres réglementaires peuvent imposer la conduite d'études séparées.

▼M4

13. Les définitions utilisées dans le contexte de la présente méthode d'essai figurent à la fin du présent chapitre et dans le document d'orientation nº 116 (7).

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. La substance d'essai est administrée quotidiennement à différents groupes d'animaux, pendant la plus grande partie de leur vie, à des doses progressives et habituellement par la voie orale. Les essais par inhalation ou par la voie cutanée peuvent aussi être appropriés. Les animaux sont observés attentivement pendant la période d'administration afin de déceler d'éventuels signes de toxicité et le développement de lésions néoplasiques. Les animaux qui meurent ou sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces animales

15. La présente méthode d'essai traite principalement de la caractérisation et de l'évaluation de la cancérogénicité chez les rongeurs (paragraphe 2). Le recours à des espèces autres que des rongeurs peut être envisagé si les données disponibles laissent escompter une meilleure prédiction des effets de la substance sur la santé humaine. Dans ce cas, le choix de l'espèce est justifié. L'espèce de rongeur préférée est le rat, mais d'autres rongeurs comme la souris peuvent être utilisés. Bien que le recours à la souris dans les études de cancérogenèse puisse ne présenter qu'un intérêt limité (24) (25) (26), certains programmes réglementaires actuels exigent tout de même la conduite d'essais de cancérogenèse sur la souris, sauf lorsqu'il est établi qu'une telle étude n'est pas nécessaire sur le plan scientifique. Les rats et les souris sont les modèles expérimentaux choisis de préférence, en raison de leur durée de vie relativement courte, de leur utilisation fréquente dans les études pharmacologiques et toxicologiques, de leur sensibilité à l'induction de tumeurs et de la disponibilité de souches suffisamment caractérisées. Ces caractéristiques permettent d'obtenir une grande quantité d'informations sur la physiologie et la pathologie de ces animaux. Des informations additionnelles sur le choix des espèces et des souches sont disponibles dans le document d'orientation nº 116 (7).

16. Il convient d'employer des animaux adultes sains, de souches communément utilisées dans les laboratoires. L'étude de cancérogenèse sera effectuée de préférence sur des animaux de même souche et de même provenance que ceux utilisés dans l'étude (les études) de toxicité préliminaire(s) de plus courte durée. Si toutefois ces animaux sont réputés ne pas répondre aux critères de survie généralement admis dans les études à long terme [voir le document d'orientation nº 116 (7)], il convient d'envisager d'utiliser une souche d'un animal dont le taux de survie permette de réaliser une étude à long terme. Les femelles sont nullipares et non gravides.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

17. Les animaux peuvent être logés individuellement ou réunis dans des cages en petits groupes du même sexe, l'hébergement individuel n'étant à envisager que dans des cas scientifiquement justifiés (27) (28) (29). Les cages sont placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats de l'étude soit réduite au minimum. La température du local des animaux d'expérience est de 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative est d'au moins 30 % et n'excède pas de préférence 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit comprise entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire

▼M4

avec eau potable à satiété. Il satisfait tous les besoins nutritionnels de l'espèce étudiée, et la teneur en contaminants alimentaires susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai (résidus de pesticides, polluants organiques persistants, phyto-œstrogènes, métaux lourds et mycotoxines, par exemple) est aussi faible que possible. Des données analytiques sur les teneurs en nutriments et en contaminants alimentaires sont recueillies régulièrement, au moins au début de l'étude et lors des changements de lots; ces données figurent dans le rapport final. Des données analytiques sur l'eau de boisson utilisée lors de l'étude sont de même fournies. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai et de satisfaire les besoins nutritionnels des animaux lorsque la substance d'essai est administrée dans la nourriture.

Préparation des animaux

18. Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions de laboratoire depuis au moins 7 jours et n'ayant jamais été soumis auparavant à des protocoles expérimentaux. Dans le cas des rongeurs, l'administration de la substance commence dès que possible après le sevrage et l'acclimatation, et de préférence avant l'âge de 8 semaines. L'espèce, la souche, la provenance, le sexe, le poids et l'âge des animaux d'expérience sont précisés. Au début de l'étude, la variation de poids des animaux de chaque sexe est minimale et n'excède pas ± 20 % du poids moyen de tous les animaux étudiés, et ce pour chaque sexe séparément. Les animaux sont affectés de manière aléatoire aux différents groupes (témoins et traités). Après la randomisation, les poids moyens des groupes de chaque sexe ne présentent pas de différences significatives. En cas de différences statistiquement significatives, la phase de randomisation est répétée dans la mesure du possible. Chaque animal reçoit un numéro d'identification unique et en est marqué de manière permanente par tatouage, implant de micropuce ou toute autre méthode appropriée.

PROTOCOLE

Nombre et sexe des animaux

19. Il convient d'utiliser des animaux des deux sexes. Leur nombre est suffisant pour permettre une évaluation biologique et statistique complète. Chaque groupe de dose, de même que chaque groupe témoin correspondant, comprend au moins 50 animaux de chaque sexe. Selon le but de l'étude, il est possible d'augmenter la puissance statistique des principales estimations en répartissant les animaux de manière différenciée entre les groupes de doses, avec plus de 50 animaux dans les groupes à faibles doses pour estimer par exemple la cancérogénicité aux faibles doses. Il convient toutefois de noter qu'une augmentation modérée de la taille d'un groupe entraînera une augmentation relativement faible de la puissance statistique de l'étude. On trouvera des données complémentaires sur la conception statistique de l'étude, et sur le choix de niveaux de doses permettant d'optimiser la puissance statistique, dans le document d'orientation nº 116 (7).

Sacrifices en cours d'étude et groupes satellites (sentinelles)

20. L'étude peut prévoir le sacrifice d'animaux en cours d'étude, par exemple à 12 mois, afin de recueillir des données sur la progression des altérations néoplasiques et des données mécanistiques, si cela est scientifiquement justifié. Si l'on dispose déjà de ces données, obtenues antérieurement lors d'études de toxicité à doses répétées sur la substance d'essai, les sacrifices en cours d'étude peuvent ne pas être scientifiquement justifiés. S'ils sont néanmoins inclus dans l'étude, les groupes d'animaux traités destinés à être sacrifiés en cours d'étude comptent normalement 10 animaux de chaque sexe, et le nombre total d'animaux utilisés dans l'étude est augmenté du nombre d'animaux que l'on prévoit de sacrifier avant l'achèvement de l'étude. Un groupe supplémentaire d'animaux sentinelles (généralement 5 animaux de chaque sexe) peut être inclus si nécessaire pour le suivi de l'état pathologique au cours de l'étude (30). Des informations complémentaires figurent dans le document d'orientation nº 116 (7).

▼M4

Groupes de dose et dosage

21. Le document d'orientation nº 116 (7) donne des indications sur tous les aspects du choix des doses et des écarts entre les doses. Il convient d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin. Les niveaux de doses seront généralement basés sur les résultats d'études à plus court terme à doses répétées, ou d'études préliminaires de détermination des concentrations, et prennent en compte toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques existantes relatives à la substance d'essai ou aux substances chimiques apparentées.

22. À moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques de la substance d'essai, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés. Compte tenu des facteurs mentionnés au paragraphe 23 ci-dessous, la plus forte dose est normalement choisie pour provoquer une manifestation de toxicité, par exemple un ralentissement de la prise de poids corporel (d'environ 10 %). Toutefois, en fonction des objectifs de l'étude (voir paragraphe 6), on pourra choisir un niveau de dose maximal plus faible que la dose qui provoque des signes de toxicité, par exemple une dose entraînant un effet négatif préoccupant mais dont l'impact sur l'espérance de vie ou le poids corporel reste faible.

23. Les niveaux de doses et les intervalles entre les doses peuvent être choisis de manière à pouvoir établir une relation dose-réponse et, selon le mode d'action de la substance d'essai, une DSENO ou tout autre résultat escompté de l'étude, notamment une DR (voir paragraphe 25) au plus bas niveau de dose. Les facteurs à prendre en compte dans le choix des faibles doses sont notamment la pente attendue de la courbe dose-réponse, les doses qui provoquent des changements métaboliques importants ou qui modifient notablement le mode d'action toxique, le niveau auquel on peut prévoir un seuil, ou celui auquel on peut prévoir de fixer un point de départ pour une extrapolation aux faibles doses.

24. Les intervalles entre les doses dépendront des caractéristiques de la substance d'essai, et ne peuvent donc pas être prescrits dans la présente méthode d'essai, mais des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes, et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (correspondant par exemple à un facteur de plus de 6 à 10) entre les doses. En général, les facteurs supérieurs à 10 sont évités, et leur utilisation est justifiée.

25. Comme le précise le document d'orientation nº 116 (7), les facteurs à prendre en compte dans le choix des doses sont notamment les suivants:

— non-linéarités ou points d'inflexion connus ou supposés de la courbe dose-réponse,

— toxicocinétique et gammes de doses auxquelles l'induction métabolique, la saturation ou la non-linéarité entre les doses internes et externes surviennent ou non,

— lésions précurseurs, marqueurs d'effets ou indicateurs du déroulement de processus biologiques clés sous-jacents,

— aspects principaux (ou présumés) du mode d'action, par exemple doses auxquelles une cytotoxicité commence à se manifester, les dosages hormonaux sont modifiés, les mécanismes homéostatiques sont dépassés, etc.,

▼M4

— régions de la courbe dose-réponse nécessitant une estimation particulièrement précise, par exemple dans le domaine de la DR prévue ou d'un seuil présumé,

— prise en compte des niveaux prévus d'exposition humaine.

26. Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe sont traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé pour les groupes traités. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et entraîne une diminution sensible de la prise de nourriture liée à une moindre appétence de celle-ci, il pourra être utile d'utiliser un groupe témoin supplémentaire nourri en parallèle, qui constituerait un témoin plus approprié.

Préparation des doses et administration de la substance d'essai

27. La substance d'essai est normalement administrée par voie orale, soit dans la nourriture ou l'eau de boisson, soit par gavage. Des informations complémentaires sur les voies et méthodes d'administration figurent dans le document d'orientation n° 116 (7). La voie et le mode d'administration dépendent de la finalité de l'étude, des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, de sa biodisponibilité ainsi que de la voie et du mode prédominants d'exposition humaine. Il convient de justifier le choix de la voie et du mode d'administration. Dans l'intérêt des animaux, le gavage oral n'est normalement choisi que pour les substances pour lesquelles cette voie et ce mode d'administration correspondent à une voie d'exposition potentielle raisonnable chez l'homme (produits pharmaceutiques, par exemple). Dans le cas des produits chimiques alimentaires ou environnementaux, notamment les pesticides, l'administration se fait d'ordinaire via le régime alimentaire ou l'eau de boisson. Toutefois, dans certains contextes, tels que l'exposition professionnelle, l'administration par d'autres voies peut être plus appropriée.

28. Si nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il convient de prendre en compte les caractéristiques suivantes du véhicule et des autres additifs, s'il y a lieu: effets sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la consommation d'aliments ou d'eau, ou sur l'état nutritionnel des animaux. Il est recommandé, dans la mesure du possible, d'envisager en premier lieu une solution ou une suspension aqueuse, puis celle d'une solution ou d'une émulsion dans une huile (par exemple huile de maïs), et en dernier lieu celle d'une solution dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules autres que l'eau sont connues. Il convient de disposer de données sur la stabilité de la substance d'essai et sur l'homogénéité des solutions ou rations contenant les différentes doses (selon les cas) dans les conditions d'administration (nourriture, par exemple).

29. Il importe de veiller à ce que les quantités de substances administrées dans les aliments ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou l'équilibre hydrique. Dans les études de toxicité à long terme faisant intervenir une administration par voie alimentaire, la concentration de la substance d'essai dans les aliments ne dépasse pas normalement 5 % de la ration totale, afin d'éviter les déséquilibres nutritionnels. Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (mg/kg d'aliment ou ppm) soit un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal (mg/kg de poids corporel), calculé sur une base hebdomadaire. La solution choisie est spécifiée.

▼M4

30. En cas d'administration par voie orale, les animaux reçoivent une dose quotidienne de la substance d'essai (à raison de 7 jours par semaine) et ce normalement pendant une période de 24 mois pour les rongeurs (voir aussi le paragraphe 32). Tout autre régime de dosage, par exemple une administration 5 jours par semaine, fait l'objet d'une justification. En cas d'administration par voie cutanée, les animaux reçoivent normalement le traitement pendant au moins 6 heures par jour, 7 jours par semaine, comme le spécifie le chapitre B.9 de la présente annexe (11), et ce pendant une période de 24 mois. L'exposition par inhalation est réalisée pendant 6 heures par jour, 7 jours par semaine, mais il est possible, si cela se justifie, de limiter l'exposition à 5 jours par semaine. La période d'exposition est normalement de 24 mois. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le choix d'une durée d'exposition inférieure à 6 heures par jour devra être justifié. Voir aussi à ce sujet le chapitre B.8 de la présente annexe (9).

31. Lorsque la substance d'essai est administrée aux animaux par gavage, l'opération est pratiquée aux mêmes moments de la journée au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Normalement, une dose unique sera administrée une fois par jour mais lorsque, par exemple, la substance chimique est un irritant local, il pourra être envisagé de maintenir la dose journalière en la fractionnant (deux fois par jour). Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Le volume est maintenu aussi faible que possible et n'excède pas normalement 1 ml/100 g de poids corporel pour les rongeurs (31). Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à tous les niveaux de doses. Les substances potentiellement corrosives ou irritantes sont l'exception et leur dilution permettra d'éviter tout effet local sévère. L'essai n'est donc pas mené à des concentrations susceptibles d'être corrosives ou irritantes pour le tube digestif.

Durée de l'étude

32. La durée de l'étude sera normalement de 24 mois pour les rongeurs, ce qui correspond à la majeure partie de la durée de vie normale des animaux utilisés. Elle pourra être allongée ou raccourcie selon la durée de vie de la souche de l'espèce animale utilisée, mais cette décision fait l'objet d'une justification. Pour certaines souches particulières de souris, par exemple AKR/J, C3H/J ou C57BL/6J, une durée de 18 mois peut être plus appropriée. On trouvera ci-après des informations sur la durée, la clôture de l'étude et la survie; d'autres considérations, relatives notamment à l'acceptabilité d'une étude de cancérogenèse estimée négative du fait de la survie des animaux, figurent dans le document d'orientation n° 116 (7).

— La clôture de l'étude est envisagée lorsque le nombre de survivants des groupes soumis aux plus faibles doses ou du groupe témoin tombe en dessous de 25 pour cent.

— La clôture de l'étude n'est pas déclenchée par la mort prématurée des animaux du seul groupe ayant reçu la dose la plus élevée.

— La survie des animaux est prise en considération séparément pour chaque sexe.

— L'étude n'est pas prolongée au-delà du point où les données pouvant être tirées de l'étude ne sont plus suffisantes pour permettre une évaluation statistiquement valable.

▼M4

OBSERVATIONS

33. Un examen de la morbidité ou de la mortalité est effectué quotidiennement chez tous les animaux, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris. Une recherche de signes spécifiques significatifs sur le plan toxicologique devra aussi être effectuée une fois par jour en tenant compte du moment où l'on prévoit que les effets des différentes doses atteindront leur intensité maximale après administration par gavage. Une attention particulière est accordée au développement de tumeurs, et le moment d'apparition, la localisation, les dimensions, l'aspect et la progression de chaque tumeur nettement visible ou palpable sont consignés.

Poids corporel, consommation de nourriture et d'eau, et efficacité alimentaire

34. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La consommation de nourriture et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est aussi mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la consommation d'eau dans les études où la prise d'eau est modifiée.

Hématologie, biochimie clinique et autres mesures

35. Afin d'obtenir le plus possible d'informations de l'étude, surtout en ce qui concerne le mode d'action de la substance, il peut être utile d'effectuer des prélèvements sanguins afin de procéder à des analyses hématologiques et de biochimie clinique, mais la décision appartient au directeur de l'étude. Des analyses d'urine peuvent être aussi appropriées. On trouvera des informations complémentaires sur l'intérêt de tels prélèvements pour une étude de cancérogenèse dans le document d'orientation nº 116 (7). S'il y a lieu, des prélèvements sanguins en vue d'analyses hématologiques et de chimie clinique et des analyses d'urines peuvent être effectués dans le cadre de sacrifices réalisés en cours d'étude (paragraphe 20) et à la fin de l'étude sur un minimum de 10 animaux de chaque sexe par groupe. Les échantillons de sang sont prélevés en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbital sous anesthésie, et seront conservés si nécessaire dans des conditions appropriées. Des étalements sanguins peuvent aussi être préparés en vue d'un examen, notamment si la moelle osseuse semble être l'organe cible, bien que l'utilité d'un tel examen pour l'évaluation du potentiel cancérogène/oncogène ait été mise en question (32).

PATHOLOGIE

Autopsie macroscopique

36. Tous les animaux de l'étude à l'exception des sentinelles et autres animaux satellites (voir paragraphe 20) font l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. L'autopsie des sentinelles et autres animaux satellites peut devoir être effectuée au cas par cas, à la discrétion du directeur de l'étude. La pesée des organes ne fait normalement pas partie d'une étude de cancérogenèse car les changements liés à l'âge ou, dans des phases plus avancées, au développement de tumeurs rendent superflues les données relatives au poids des organes. Ces données peuvent toutefois présenter un grand intérêt pour les évaluations fondées sur le poids de la preuve, notamment en ce qui concerne le mode d'action. Si ces données font partie d'une étude satellite, elles ne sont pas collectées au-delà d'un an après le début de l'étude.

▼M4

37. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (33) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif):

toutes les lésions macroscopiques	cœur	pancréas	estomac (pré-estomac, estomac glandulaire)
glande surrénale	iléon	glande parathyroïde	[dents]
aorte	jéjunum	nerf périphérique	testicule
cerveau (segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	rein	hypophyse	thymus
cæcum	glande lacrymale (exorbital)	prostate	thyroïde
col utérin	foie	rectum	[langue]
glande coagulante	poumon	glande salivaire	trachée
côlon	ganglions lymphatiques (superficiels et profonds)	vésicule séminale	vessie
duodénum	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)	muscle squelettique	utérus (col inclus)
épididyme	[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]	peau	[uretère]
œil (y compris rétine)	œsophage	moelle épinière (niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)	[urètre]
[fémur avec articulation]	[bulbe olfactif]	rate	vagin
vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)	ovaire	[sternum]	segment de moelle osseuse et/ou moelle osseuse fraîchement ponctionnée
glande de Harder			

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues de la substance d'essai sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu de conserver les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale, et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Dans les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des chapitres B.8 et B.29 de la présente annexe. Pour les autres organes et tissus (outre les tissus des voies respiratoires spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

▼M4

Histopathologie

38. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (33). Au minimum, les examens devront porter sur les tissus suivants:

— tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin,

— tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude,

— tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques, notamment des tumeurs,

— lorsque des altérations histopathologiques dues au traitement sont observées dans le groupe à dose élevée, ces mêmes tissus sont examinés chez tous les animaux de tous les autres groupes de doses,

— dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Données

39. Des données sont recueillies pour chaque animal sur tous les paramètres évalués. En outre, toutes les données sont résumées sous forme de tableaux synoptiques indiquant, pour chaque groupe expérimental, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés ainsi que le moment de l'apparition, la durée et la gravité de tous les effets toxiques observés, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les tableaux synoptiques présentent les moyennes et les écarts-types (pour les données recueillies en continu) pour les animaux présentant des effets toxiques ou des lésions, ainsi qu'une cotation des lésions.

40. Les données de contrôle historiques peuvent faciliter l'interprétation des résultats de l'étude, par exemple lorsque les données provenant des témoins concurrents semblent diverger de manière significative de données récentes obtenues sur des animaux témoins issus de la même installation d'essai/colonie d'élevage. Si elles sont évaluées, les données de contrôle historiques émanent du même laboratoire et portent sur des animaux du même âge et de la même souche, produits dans les cinq ans précédant l'étude en question.

41. Si possible, les résultats numériques devront être évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Les méthodes statistiques et les données à analyser sont choisies au moment de la conception de l'étude (paragraphe 9). Ce choix permet d'opérer des ajustements en fonction de la survie, si nécessaire.

Rapport d'essai

42. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique, pureté et propriétés physico-chimiques,

— données d'identification,

▼**M4**

— provenance de la substance chimique,

— numéro de lot,

— certificat d'analyse chimique.

Véhicule (le cas échéant):

— justification du choix du véhicule (s'il est autre que l'eau).

Animaux d'expérience:

— espèce/souche utilisée et justification du choix fait,

— nombre, âge et sexe des animaux au début de l'essai,

— provenance, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions expérimentales:

— justification de la voie d'administration et du choix des doses,

— le cas échéant, méthodes statistiques utilisées pour analyser les données,

— détails concernant la formulation de la substance d'essai ou son incorporation dans les aliments,

— données analytiques sur la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,

— voie d'administration et détails concernant l'administration de la substance d'essai,

— pour les études par inhalation, mention de la voie d'entrée (nez seul ou corps entier),

— doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et, le cas échéant, facteur de conversion en dose réelle de la concentration de la substance d'essai (en mg/kg ou en ppm) dans les aliments ou l'eau de boisson,

— détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats (les résultats comprendront des données générales sous forme de tableaux synoptiques et des données propres à chaque animal)

Résultats généraux:

— données sur la survie,

— poids corporel/variations du poids corporel,

— prise d'aliments, calculs de l'efficacité alimentaire, si effectués, et prise d'eau, le cas échéant,

— données toxicocinétiques (si disponibles),

— ophtalmoscopie (si disponible),

— hématologie (si disponible),

— chimie clinique (si disponible).

▼**M4**

Résultats cliniques:

— signes de toxicité,

— incidence (et, si elle est évaluée, sévérité) de toute anomalie observée,

— nature, sévérité et durée des observations cliniques (transitoires ou permanentes).

Données relatives aux autopsies:

— poids corporel à l'issue de l'essai,

— poids des organes et leur rapport au poids corporel, le cas échéant,

— résultats d'autopsie; incidence et sévérité des anomalies.

Histopathologie:

— observations d'effets histopathologiques non néoplasiques,

— observations d'effets histopathologiques néoplasiques,

— corrélation entre les observations macroscopiques et microscopiques,

— description détaillée de tous les résultats histopathologiques liés au traitement et échelle d'évaluation de la sévérité,

— rapport sur l'analyse éventuelle des lames par des pairs.

Traitement statistique des résultats, le cas échéant

Discussion des résultats, notamment:

— examen de toutes les approches de modélisation,

— relations dose-réponse,

— données de contrôle historiques,

— examen de toutes les informations concernant le mode d'action,

— détermination des DR, DSENO et DMENO (dose minimale avec effet nocif observé),

— applicabilité des résultats à l'être humain;

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE:

(1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OCDE, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.

(5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

▼**M4**

(6) Chapitre B.27 de la présente annexe, Toxicité orale subchronique; Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours.

(7) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Série sur les essais et évaluations nº 116, disponible sur le site internet public de l'OCDE relatifs aux essais de produits chimiques (www.oecd.org/env/testguidelines).

(8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Série sur les essais et évaluations nº 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(9) Chapitre B.8 de la présente annexe – Toxicité subaiguë par inhalation: étude sur 28 jours.

(10) Chapitre B.29 de la présente annexe – Toxicité subchronique par inhalation: étude sur 90 jours.

(11) Chapitre B.9 de la présente annexe – Toxicité cutanée à doses répétées (28 jours).

(12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

(13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., and Fenner-Crisp P.A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

(19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(20) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Série sur les essais et évaluations nº 35 et série sur les pesticides nº 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.

(21) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Série sur les essais et évaluations nº 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

▼**M4**

(22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. and Lumley C.E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T., Griffiths S.A. and Lumley C.E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy P.O.F. & Harron D.W.G. (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

(26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196-1203.

(27) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, DC, US Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(32) Weingand K. *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(33) Crissman J., Goodman D., Hildebrandt P. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

DEFINITION

Test chemical: Any substance or mixture tested using this Test Method.

▼M4

B. 33. ÉTUDES COMBINÉES DE TOXICITÉ CHRONIQUE ET DE CANCÉROGENÈSE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 453 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La ligne directrice 453 originale avait été adoptée en 1981. La présente méthode d'essai B.33 actualisée a été jugée nécessaire afin de tenir compte des évolutions récentes dans le domaine du bien- être animal, ainsi que des nouvelles exigences réglementaires (1) (2) (3) (4) (5). La mise à jour de la présente méthode d'essai B.33 a été effectuée en parallèle avec la révision des chapitres B.32 (Études de cancérogenèse) et B.30 (Études de toxicité chronique) de la présente annexe, dans le but d'obtenir des informations additionnelles à partir des animaux utilisés dans l'étude, et de fournir des précisions concernant le choix des doses. La présente méthode d'essai vise les essais portant sur une large gamme de produits chimiques, dont des pesticides et des produits chimiques industriels. Il convient toutefois de noter que certains aspects et certaines dispositions peuvent différer pour les produits pharmaceutiques (voir la Conférence internationale sur l'harmonisation, thème S1B: évaluation de la cancérogénicité des produits pharmaceutiques).

2. La plupart des études de toxicité chronique et de cancérogenèse étant menées sur des espèces de rongeurs, la présente méthode d'essai est destinée à s'appliquer principalement à des études réalisées avec ces espèces. S'il s'avérait nécessaire de mener de telles études avec des non-rongeurs, il conviendrait d'appliquer, moyennant des modifications appropriées, les principes et procédures décrits dans la présente méthode d'essai et dans le chapitre B.27 – Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours (6) de la présente annexe, comme indiqué dans le document d'orientation n° 116 de l'OCDE sur l'élaboration et la conduite des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (7).

3. Les trois principales voies d'administration utilisées dans les études de toxicité chronique et de cancérogenèse sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance d'essai et de la voie d'exposition prédominante chez l'homme. Des informations complémentaires sur le choix de la voie d'exposition sont fournies dans le document d'orientation n° 116 (7).

4. La présente méthode d'essai porte principalement sur l'exposition par voie orale, la voie la plus communément utilisée dans les études de toxicité chronique et de cancérogenèse. Bien que des études à long terme utilisant l'exposition par voie cutanée ou par inhalation puissent aussi être nécessaires pour évaluer le risque pour la santé humaine et/ou exigées en vertu de certains régimes réglementaires, ces deux voies d'exposition nécessitent des dispositifs techniques d'une grande complexité. De telles études devront être conçues au cas par cas, encore que la présente méthode d'essai, qui porte sur la caractérisation et l'évaluation de la toxicité chronique et de la cancérogénicité par voie orale, puisse fournir les bases d'un protocole d'étude par voie cutanée et/ou inhalation, notamment en ce qui concerne les recommandations relatives aux durées de traitement, aux paramètres cliniques et pathologiques, etc. Il existe des documents d'orientation de l'OCDE sur l'administration expérimentale de substances d'essai par inhalation (7) (8) et par voie cutanée (7). Les chapitres B.8 (9) et B.29 (10) de la présente annexe, ainsi que le document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aiguë par inhalation (8), méritent tout particulièrement d'être consultés lors de la conception d'études à long terme portant sur une exposition par inhalation. Le chapitre B.9 de la présente annexe (11) doit être consulté dans le cas d'un essai portant sur la voie cutanée.

▼M4

5. L'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse donne des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée pendant une période pouvant couvrir la vie entière de l'espèce considérée. L'étude fournit des informations sur les effets toxiques de la substance d'essai, y compris sur son pouvoir cancérogène, et peut indiquer les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes. Elle peut aussi donner une estimation de la dose sans effet nocif observé pour ce qui est des effets toxiques et, dans le cas de substances cancérogènes non génotoxiques, des réponses tumorales. Cette estimation permet d'établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine. De plus, il convient d'accorder une attention particulière à l'observation clinique des animaux afin d'obtenir le plus d'informations possibles.

6. Les objectifs des études de toxicité chronique et de cancérogenèse couvertes par la présente méthode d'essai sont les suivants:

— identification des propriétés cancérogènes d'un produit chimique susceptibles d'augmenter les risques de néoplasmes, la fréquence de survenue de néoplasmes malins ou la diminution du temps nécessaire à leur apparition, par rapport aux groupes témoins concurrents,

— identification du temps d'apparition de néoplasmes,

— identification de la toxicité chronique d'une substance d'essai,

— identification d'un ou de plusieurs organes cibles de la toxicité chronique et de la cancérogenèse,

— caractérisation de la relation dose-effet,

— identification d'un niveau de dose sans effet nocif observé (DSENO) ou du point de départ pour l'établissement d'une dose de référence (DR),

— extrapolation des effets cancérogènes aux niveaux d'exposition humaine correspondant à de faibles doses,

— prévision des effets de toxicité chronique aux niveaux représentatifs de l'exposition humaine,

— obtention de données permettant de vérifier les hypothèses concernant le mode d'action (2) (7) (12) (13) (14) (15).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

7. Pour caractériser et évaluer la cancérogénicité potentielle et la toxicité chronique d'une substance d'essai, le laboratoire chargé de l'étude prend en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de réaliser l'étude, afin de pouvoir orienter celle-ci de manière à tester plus efficacement les propriétés toxicologiques de la substance, et faire le moins possible appel aux animaux. La connaissance du mode d'action d'un agent cancérogène suspecté et sa prise en compte (2) (7) (12) (13) (14) (15) sont particulièrement importantes puisque la conception optimale de l'essai peut différer selon que la substance est ou n'est pas un agent cancérogène génotoxique connu ou suspecté. Des informations complémentaires sur certains aspects du mode d'action peuvent être trouvées dans le document d'orientation nº 116 (7).

8. Les informations utiles pour concevoir l'étude sont notamment: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les informations éventuelles sur son mode d'action; les résultats de toutes les études de toxicité in vitro ou in vivo menées et notamment des essais de génotoxicité; l'utilisation (les utilisations) prévue(s) et le potentiel d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques (par exemple mutagénicité, génotoxicité et pouvoir cancérogène) relatives aux substances structurellement apparentées; les données toxicocinétiques disponibles (dose unique et doses répétées, si ces données existent)

▼M4

et les résultats d'autres études à doses répétées. La détermination de la toxicité chronique et du pouvoir cancérogène n'est effectuée qu'après obtention des premiers résultats d'essais de toxicité à doses répétées menés sur 28 jours et/ou 90 jours. Les essais d'initiation-promotion de cancers à court terme peuvent aussi livrer des informations utiles. Il convient d'envisager l'adoption d'une approche par étapes pour l'étude expérimentale de cancérogenèse entreprise dans le cadre de l'évaluation globale des effets nocifs potentiels d'une substance chimique (16) (17) (18) (19).

9. Les méthodes statistiques les plus appropriées pour l'analyse des résultats, compte tenu du plan expérimental et des objectifs de l'étude, sont identifiées avant le début de l'étude. Il convient notamment de déterminer si les statistiques doivent prendre en compte l'ajustement en fonction de la survie, l'analyse des risques de tumeurs cumulées liés à la durée de survie, l'analyse du temps nécessaire à l'apparition d'une tumeur et l'analyse effectuée en cas de mort prématurée des animaux d'un ou de plusieurs groupes. On trouvera des indications concernant les analyses statistiques appropriées, ainsi que des références clés à des méthodes statistiques reconnues au plan international, dans le document d'orientation n° 116 (7), ainsi que dans le document d'orientation n° 35 sur l'analyse et l'évaluation des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (20).

10. Lors de la réalisation d'une étude de cancérogenèse, il est recommandé de toujours suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation de l'OCDE n° 19 sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques comme effets observés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (21). Le paragraphe 62 de ce document, en particulier, stipule ce qui suit: «*Dans les études comportant l'administration de doses répétées, lorsqu'un animal présente des signes cliniques progressifs de détérioration de son état, une décision d'euthanasier ou non l'animal est prise en connaissance de cause. Cette décision met en balance des facteurs tels que la valeur des informations pouvant être obtenues en maintenant l'animal dans l'étude d'une part, et l'état général de celui-ci d'autre part. Si la décision est prise de poursuivre l'essai sur cet animal, la fréquence des observations est augmentée selon les besoins. Il est aussi possible, sans toutefois nuire à l'objectif de l'essai, d'interrompre l'administration de la substance d'essai pour soulager la douleur ou la détresse de l'animal, ou de réduire la dose testée.*»

11. On trouvera des informations détaillées et une discussion sur les principes déterminant le choix des doses pour les études de toxicité chronique et de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (7), ainsi que dans deux publications de l'Institut international des sciences de la vie (22) (23). La stratégie de base pour le choix des doses dépend du ou des principaux objectifs de l'étude (paragraphe 6). En choisissant des niveaux de doses appropriés, il convient de trouver un équilibre, entre d'une part, l'identification des dangers et, d'autre part, la caractérisation des réponses aux faibles doses et leur pertinence. Cet équilibre est particulièrement nécessaire dans le cas de l'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse considérée ici.

12. Il convient d'examiner l'opportunité de réaliser la présente étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse plutôt que de réaliser séparément une étude de toxicité chronique (chapitre B.30 de la présente annexe) et une étude de cancérogenèse (chapitre B.32 de la présente annexe). L'essai combiné permet une meilleure efficacité en temps et en coûts, et un moindre recours aux animaux, par rapport à la conduite de deux essais séparés, et ne compromet pas la qualité des données de la phase chronique ou de la phase de cancérogenèse. Lors de la réalisation d'une telle étude combinée, il convient toutefois de respecter les principes déterminant le choix de la dose (paragraphes 11 et 22 à 26) et il est également reconnu que certains cadres réglementaires peuvent imposer la conduite d'études séparées. On trouvera dans le document d'orientation n° 116 (7) des indications supplémentaires sur les moyens de concevoir de manière optimale l'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et en rationalisant les diverses procédures expérimentales.

▼M4

13. Les définitions utilisées dans le contexte de la présente méthode d'essai figurent à la fin du présent chapitre et dans le document d'orientation nº 116 (7).

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. L'étude comprend deux phases parallèles: une phase chronique et une phase de cancérogenèse (dont les durées respectives font l'objet des paragraphes 34 et 35). La substance d'essai est normalement administrée par la voie orale, mais la voie inhalatoire ou la voie cutanée peuvent aussi être appropriées. Durant la phase chronique, la substance d'essai est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives, à raison d'un niveau de dose par groupe, en général pendant une période de 12 mois, bien que des durées plus longues ou plus courtes puissent aussi être choisies en fonction des exigences réglementaires (voir paragraphe 34). Cette durée est suffisamment longue pour permettre aux effets de toxicité cumulée de se manifester, tout en évitant les effets perturbateurs des changements liés au vieillissement. Un ou plusieurs sacrifices en cours d'étude peuvent aussi être prévus, par exemple à 3 et 6 mois, auquel cas des groupes d'animaux supplémentaires pourront être inclus dans l'étude (voir paragraphe 20). Durant la phase de cancérogenèse, la substance d'essai est administrée quotidiennement à différents groupes d'animaux pendant la plus grande partie de leur vie. Au cours des deux phases, les animaux sont observés attentivement pour déceler d'éventuels signes de toxicité et le développement de lésions néoplasiques. Les animaux qui meurent ou sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces animales

15. La présente méthode d'essai traite principalement de la caractérisation et de l'évaluation de la toxicité chronique et de la cancérogénicité chez les rongeurs (paragraphe 2). Le recours à des espèces autres que des rongeurs peut être envisagé si les données disponibles laissent escompter une meilleure prédiction des effets de la substance sur la santé humaine. Dans ce cas, le choix de l'espèce est justifié. L'espèce de rongeur préférée est le rat, mais d'autres rongeurs comme la souris peuvent être utilisés. Bien que le recours à la souris dans les études de cancérogenèse puisse ne présenter qu'un intérêt limité (24) (25) (26), certains programmes réglementaires actuels exigent tout de même la conduite d'essais de cancérogenèse sur la souris, sauf lorsqu'il est établi que de tels essais ne sont pas nécessaires sur le plan scientifique. Les rats et les souris sont les modèles expérimentaux choisis de préférence, en raison de leur durée de vie relativement courte, de leur utilisation fréquente dans les études pharmacologiques et toxicologiques, de leur sensibilité à l'induction de tumeurs et de la disponibilité de souches suffisamment caractérisées. Ces caractéristiques permettent d'obtenir une grande quantité d'informations sur la physiologie et la pathologie de ces animaux. S'il s'avérait nécessaire de réaliser des études de toxicité chronique et de cancérogenèse avec des espèces de non- rongeurs, le plan et la conduite de l'étude devraient suivre les principes décrits dans la présente méthode d'essai ainsi que dans le chapitre B.27 de la présente annexe – Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours (6). Des informations additionnelles sur le choix des espèces et des souches sont disponibles dans le document d'orientation nº 116 (7).

16. Il convient d'employer des animaux adultes sains, de souches communément utilisées dans les laboratoires. L'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse sera effectuée de préférence sur des animaux de même souche et de même provenance que ceux utilisés dans l'étude (les études) de toxicité préliminaire(s) de plus courte durée. Si toutefois ces animaux sont réputés ne pas répondre aux critères de survie généralement admis dans les études à long terme [voir le document d'orientation nº 116 (7)], il convient d'envisager d'utiliser une souche d'un animal dont le taux de survie permette de réaliser une étude à long terme. Les femelles sont nullipares et non gravides.

▼M4

Conditions d'hébergement et d'alimentation

17. Les animaux peuvent être logés individuellement ou dans des cages en petits groupes du même sexe, l'hébergement individuel n'étant à envisager que dans des cas scientifiquement justifiés (27) (28) (29). Les cages sont placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats de l'étude soit réduite au minimum. La température du local des animaux d'expérience est de 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative est d'au moins 30 % et n'excède pas de préférence 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit comprise entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété. Il satisfait tous les besoins nutritionnels de l'espèce étudiée, et la teneur en contaminants alimentaires susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai (résidus de pesticides, polluants organiques persistants, phyto-œstrogènes, métaux lourds et mycotoxines, par exemple) est aussi faible que possible. Des données analytiques sur les teneurs en nutriments et en contaminants alimentaires sont recueillies régulièrement, au moins au début de l'étude et lors des changements de lots; ces données figurent dans le rapport final. Des données analytiques sur l'eau de boisson utilisée lors de l'étude sont de même fournies. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai et de satisfaire les besoins nutritionnels des animaux lorsque la substance est administrée dans la nourriture.

Préparation des animaux

18. Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions de laboratoire depuis au moins 7 jours et n'ayant jamais été soumis auparavant à des protocoles expérimentaux. Dans le cas des rongeurs, l'administration de la substance commence dès que possible après le sevrage et l'acclimatation, et de préférence avant l'âge de 8 semaines. L'espèce, la souche, la provenance, le sexe, le poids et l'âge des animaux d'expérience sont précisés. Au début de l'étude, la variation de poids des animaux de chaque sexe est minimale et n'excède pas ± 20 % du poids moyen de tous les animaux étudiés, et ce pour chaque sexe séparément. Les animaux sont affectés de manière aléatoire aux différents groupes (témoins et traités). Après la randomisation, les poids moyens des groupes de chaque sexe ne présentent pas de différences significatives. En cas de différences statistiquement significatives, la phase de randomisation est répétée dans la mesure du possible. Chaque animal reçoit un numéro d'identification unique et en est marqué de manière permanente par tatouage, implant de micropuce ou toute autre méthode appropriée.

PROTOCOLE

Nombre et sexe des animaux

19. Il convient d'utiliser des animaux des deux sexes. Leur nombre est suffisant pour permettre une évaluation biologique et statistique complète. Pour les rongeurs, chaque groupe de dose (comme défini au paragraphe 22) et chaque groupe témoin concurrent prévu pour participer à la phase de cancérogenèse de l'étude comprend donc au moins 50 animaux de chaque sexe. Selon le but de l'étude, il sera possible d'augmenter la puissance statistique des principales estimations en répartissant les animaux de manière différenciée et non égale en nombre dans les divers groupes de dose, avec plus de 50 animaux dans les groupes à faibles doses pour estimer par exemple la cancérogénicité aux faibles doses. Il convient toutefois de noter qu'une augmentation modérée de la taille d'un groupe entraînera une augmentation relativement faible de la puissance statistique de l'étude. Chaque groupe de dose (comme défini au paragraphe 22), et chaque groupe témoin concurrent prévu pour participer à la phase de toxicité chronique de l'étude, comprend au moins, dans le cas des rongeurs, 10 animaux de chaque sexe. On notera

▼M4

que ce nombre est plus faible que celui préconisé dans l'étude de toxicité chronique (chapitre B.30 de la présente annexe). L'interprétation des données obtenues à partir de ce nombre réduit d'animaux par groupe dans la phase de toxicité chronique de la présente étude combinée s'appuie cependant sur les données provenant des animaux plus nombreux étudiés lors de la phase de cancérogenèse de l'étude. Dans les études utilisant des souris, il peut être nécessaire de prévoir des animaux supplémentaires dans chaque groupe traité lors de la phase de toxicité chronique pour pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis. On trouvera des données complémentaires sur la conception statistique de l'étude et le choix de niveaux de doses permettant d'optimiser la puissance statistique dans le document d'orientation n° 116 (7).

Sacrifices en cours d'étude, groupes satellites et animaux sentinelles

20. L'étude peut prévoir le sacrifice d'animaux en cours d'étude, par exemple à 6 mois pour la phase de toxicité chronique, afin de recueillir des données sur la progression des altérations non néoplasiques et des données mécanistiques, si cela est scientifiquement justifié. Si l'on dispose déjà de ces données, obtenues antérieurement lors d'études de toxicité à doses répétées sur la substance d'essai, les sacrifices en cours d'étude peuvent ne pas être scientifiquement justifiés. Les animaux étudiés pendant la phase de toxicité chronique de l'étude, normalement sur une durée de 12 mois (paragraphe 34), fournissent les données correspondant aux sacrifices en cours d'étude pour la phase de cancérogenèse, ce qui réduit le nombre total d'animaux étudiés. Des groupes satellites peuvent aussi être constitués pour la phase de toxicité chronique afin de contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance d'essai. Ces investigations pourront ne porter que sur les doses maximales de l'étude et sur le groupe témoin. Un groupe supplémentaire d'animaux sentinelles (généralement 5 animaux de chaque sexe) peut être inclus si nécessaire pour le suivi de l'état pathologique au cours de l'étude (30). On trouvera des indications supplémentaires sur les sacrifices en cours d'étude et sur le recours à des animaux satellites et sentinelles, ainsi que sur la limitation du nombre total d'animaux étudiés, dans le document d'orientation n° 116 (7).

21. Si l'inclusion d'animaux satellites et/ou des sacrifices en cours d'essai sont prévus, le nombre d'animaux dans chaque groupe de dose prévu à cet effet sera normalement de 10 animaux de chaque sexe, et le nombre total d'animaux étudiés devra être augmenté du nombre d'animaux devant être sacrifiés avant l'achèvement de l'étude. Les animaux destinés à être sacrifiés en cours d'étude et les animaux satellites sont normalement sujets aux mêmes observations que ceux soumis à la phase de toxicité chronique de l'étude principale, notamment en ce qui concerne le poids corporel, la prise d'aliments et d'eau, les mesures hématologiques et de biochimie clinique, et les examens pathologiques. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude) pour limiter ces observations à des mesures essentielles spécifiques telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité.

Groupes de dose et dosages

22. Le document d'orientation n° 116 (7) donne des indications sur tous les aspects du choix des doses et des écarts entre les doses. Il convient d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin, aussi bien pour la phase de toxicité chronique que pour la phase de cancérogenèse. Les niveaux de doses seront généralement basés sur les résultats d'études à plus court terme à doses répétées, ou d'études préliminaires de détermination des concentrations, et devront prendre en compte toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques existantes relatives à la substance d'essai ou aux substances chimiques apparentées.

▼M4

23. Pour la phase de toxicité chronique de l'étude, une étude complète portant sur trois niveaux de doses peut ne pas être considérée comme indispensable s'il est possible d'anticiper qu'un essai à dose unique, équivalant au moins à 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, ne produira probablement pas d'effets indésirables. La décision est fondée sur les résultats d'études préliminaires et sur l'absence probable de toxicité de la substance d'essai, compte tenu des données disponibles sur des substances structurellement apparentées. Une limite de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour peut s'appliquer sauf si l'exposition humaine indique qu'il est nécessaire de recourir à un niveau de dose plus élevé.

24. À moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques de la substance d'essai, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés. La plus forte dose est normalement choisie pour provoquer une manifestation de toxicité, par exemple un ralentissement de la prise de poids corporel (d'environ 10 %). Toutefois, en fonction des objectifs de l'étude (voir paragraphe 6), on pourra choisir un niveau de dose maximal plus faible que la dose qui provoque des signes de toxicité, par exemple une dose entraînant un effet négatif préoccupant mais dont l'impact sur l'espérance de vie ou le poids corporel reste faible.

25. Les niveaux de doses et les intervalles entre les doses peuvent être choisis de manière à pouvoir établir une relation dose-réponse et, selon le mode d'action de la substance d'essai, une DSENO ou tout autre résultat escompté de l'étude, notamment une DR (voir le paragraphe 27). Les facteurs à prendre en compte dans le choix des faibles doses sont notamment la pente attendue de la courbe dose-réponse, les doses qui provoquent des changements métaboliques importants ou qui modifient notablement le mode d'action toxique, le niveau auquel on peut prévoir un seuil, ou celui auquel on peut prévoir de fixer un point de départ pour une extrapolation aux faibles doses. Le principal objectif lors de la réalisation d'une étude combinée de cancérogenèse et de toxicité chronique sera la collecte d'informations à des fins d'évaluation des risques de cancérogenèse, et les données sur la toxicité chronique seront normalement un objectif subsidiaire. Il conviendra de s'en souvenir lors du choix des niveaux de doses et des intervalles entre les doses pour l'étude.

26. Les intervalles entre les doses dépendront des objectifs de l'étude et des caractéristiques de la substance d'essai, et ne peuvent donc pas être prescrits de manière détaillée dans la présente méthode d'essai, mais des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes, et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (correspondant par exemple à un facteur de plus de 6 à 10) entre les doses. En général, les facteurs supérieurs à 10 sont évités, et leur utilisation est justifiée.

27. Comme le précise le document d'orientation n° 116 (7), les facteurs à prendre en compte dans le choix des doses sont notamment les suivants:

— non-linéarités ou points d'inflexion connus ou supposés de la courbe dose-réponse,

— toxicocinétique et gammes de doses auxquelles l'induction métabolique, la saturation ou la non-linéarité entre les doses internes et externes surviennent ou non,

— lésions précurseurs, marqueurs d'effets ou indicateurs du déroulement de processus biologiques clés sous-jacents,

▼M4

— aspects principaux (ou présumés) du mode d'action, par exemple doses auxquelles une cytotoxicité commence à se manifester, les dosages hormonaux sont perturbés, les mécanismes homéostatiques sont dépassés, etc.,

— régions de la courbe dose-réponse nécessitant une estimation particulièrement précise, par exemple dans le domaine de la DR prévue ou d'un seuil présumé,

— prise en compte des niveaux prévus d'exposition humaine, en particulier lors du choix des doses moyennes et faibles.

28. Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin sont traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé pour les groupes traités. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et entraîne une diminution sensible de la prise de nourriture liée à une moindre appétence de celle-ci, il pourra être utile d'utiliser un groupe témoin supplémentaire nourri en parallèle, qui constituerait un témoin plus approprié.

Préparation des doses et administration de la substance d'essai

29. La substance d'essai est normalement administrée par voie orale, soit dans la nourriture ou l'eau de boisson, soit par gavage. Des informations complémentaires sur les voies et méthodes d'administration figurent dans le document d'orientation nº 116 (7). La voie et le mode d'administration dépendent de la finalité de l'étude, des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, de sa biodisponibilité ainsi que de la voie et du mode prédominants d'exposition humaine. Il convient de justifier le choix de la voie et du mode d'administration. Dans l'intérêt des animaux, le gavage oral n'est normalement choisi que pour les substances pour lesquelles cette voie et ce mode d'administration correspondent à une voie d'exposition potentielle raisonnable chez l'homme (produits pharmaceutiques, par exemple). Dans le cas des produits chimiques alimentaires ou environnementaux, notamment les pesticides, l'administration se fait d'ordinaire via le régime alimentaire ou l'eau de boisson. Toutefois, dans certains contextes, tels que l'exposition professionnelle, l'administration par d'autres voies peut être plus appropriée.

30. Si nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il convient de prendre en compte les caractéristiques suivantes du véhicule et des autres additifs, s'il y a lieu: effets sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la prise d'aliments ou d'eau, ou sur l'état nutritionnel des animaux. Il est recommandé, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager en premier lieu l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, puis celle d'une solution ou d'une émulsion dans une huile (par exemple huile de maïs), et en dernier lieu celle d'une solution dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules autres que l'eau sont connues. Il convient de disposer de données sur la stabilité de la substance d'essai et sur l'homogénéité des solutions ou rations contenant les différentes doses (selon les cas) dans les conditions d'administration (nourriture, par exemple).

31. Il importe de veiller à ce que les quantités de substances d'essai administrées dans les aliments ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou avec l'équilibre hydrique. Dans les études de toxicité à long terme faisant intervenir une administration par voie alimentaire, la concentration de la substance d'essai dans les aliments ne dépasse normalement pas 5 % de la ration totale, afin d'éviter les déséquilibres nutritionnels. Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (mg/kg d'aliment ou ppm) soit un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal (mg/kg de poids corporel), calculé sur une base hebdomadaire. La solution choisie est spécifiée.

▼M4

32. En cas d'administration par voie orale, les animaux reçoivent une dose quotidienne de la substance d'essai (à raison de 7 jours par semaine) et ce pendant une période de 12 mois (phase chronique) ou de 24 mois (phase de cancérogenèse) pour les rongeurs (voir aussi les paragraphes 33 et 34). Tout autre régime de dosage, par exemple une administration 5 jours par semaine, donne lieu à une justification. En cas d'administration par voie cutanée, les animaux reçoivent normalement le traitement pendant au moins 6 heures par jour, 7 jours par semaine, comme le spécifie le chapitre B.9 de la présente annexe (11), et ce pendant une période de 12 mois (phase chronique) ou de 24 mois (phase de cancérogenèse). L'exposition par inhalation est réalisée pendant 6 heures par jour, 7 jours par semaine, mais il est possible, si cela se justifie, de limiter l'exposition à 5 jours par semaine. La période d'exposition est normalement de 12 mois (phase chronique) ou de 24 mois (phase de cancérogenèse). Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le choix d'une durée d'exposition inférieure à 6 heures par jour fait l'objet d'une justification. Voir aussi à ce sujet le chapitre B.8 de la présente annexe (9).

33. Lorsque la substance d'essai est administrée aux animaux par gavage, l'opération est pratiquée aux mêmes moments de la journée au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Normalement, une dose unique sera administrée une fois par jour mais lorsque, par exemple, la substance chimique est un irritant local, il pourra être envisagé de maintenir la dose journalière en la fractionnant (deux fois par jour). Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Le volume est maintenu aussi faible que possible et n'excède normalement pas 1 ml/100 g de poids corporel pour les rongeurs (31). Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à tous les niveaux de doses. Les substances potentiellement corrosives ou irritantes sont l'exception et leur dilution permettra d'éviter tout effet local sévère. L'essai n'est pas mené à des concentrations susceptibles d'être corrosives ou irritantes pour le tube digestif.

Durée de l'étude

34. Si la période d'administration et la durée de la phase chronique de cette étude sont normalement de 12 mois, le plan de l'étude permet une application à des essais de durée plus courte (6 à 9 mois par exemple) ou plus longue (18 à 24 mois), pour répondre aux exigences de régimes réglementaires particuliers ou obtenir des données mécanistiques spécifiques. Les déviations par rapport à une durée d'exposition de 12 mois font l'objet de justifications, surtout dans le cas de durées plus courtes. Le traitement de tous les groupes de doses affectés à cette phase est interrompu au moment prévu pour l'évaluation de la toxicité chronique et de lésions pathologiques non néoplasiques. Les groupes satellites inclus pour contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance d'essai sont maintenus sans traitement, pendant une période d'au moins 4 semaines et d'au plus un tiers de la durée totale de l'étude, après la cessation de l'exposition.

35. La durée de la phase de cancérogenèse de cette étude sera normalement de 24 mois pour les rongeurs, ce qui correspond à la majeure partie de la durée de vie normale des animaux utilisés. Elle peut être allongée ou raccourcie selon la durée de vie de la souche de l'espèce animale utilisée, mais ce changement de durée fait l'objet d'une justification. Pour certaines souches particulières de souris, par exemple AKR/J, C3H/J ou C57BL/6J, une durée de 18 mois peut être plus appropriée. On trouvera ci- après des informations sur la durée, la clôture de l'étude et la survie; d'autres considérations, relatives notamment à l'acceptabilité d'une étude de cancérogenèse estimée négative du fait de la survie des animaux, figurent dans le document d'orientation n° 116 (7):

▼M4

— la clôture de l'étude est envisagée lorsque le nombre de survivants des groupes soumis aux plus faibles doses ou du groupe témoin tombe en dessous de 25 pour cent,

— la clôture de l'étude n'est pas déclenchée par la mort prématurée des animaux du seul groupe ayant reçu la dose la plus élevée,

— la survie des animaux est prise en considération séparément pour chaque sexe,

— l'étude n'est pas prolongée au-delà du point où les données pouvant être tirées de l'étude ne sont plus suffisantes pour permettre une évaluation statistiquement valable.

OBSERVATIONS (PHASE DE TOXICITÉ CHRONIQUE)

36. Tous les animaux sont soumis à un examen quotidien, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris, pour déterminer la morbidité et la mortalité. Des observations cliniques générales sont effectuées au moins une fois par jour, de préférence au(x) même(s) moment(s) de la journée, en tenant compte du moment où l'on prévoit que les effets des différentes doses atteindront leur intensité maximale après administration par gavage.

37. Tous les animaux font l'objet d'observations cliniques détaillées au moins une fois avant la première exposition (pour permettre des comparaisons intra-individuelles), à la fin de la première semaine de l'étude, et une fois par mois ensuite. Les observations respectent un protocole qui réduit au minimum les variations entre observateurs et les rend indépendantes du groupe testé. Ces observations sont effectuées hors de la cage où sont logés les animaux, de préférence dans une enceinte normalisée et à heures fixes. Elles sont soigneusement consignées, de préférence en utilisant un système de cotation explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Les conditions d'observation demeurent aussi constantes que possible. Les observations portent notamment sur les symptômes suivants (sans que cette liste soit exhaustive): modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux et des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions, et réactions neurovégétatives (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, variation du diamètre pupillaire, respiration anormale). Il convient également de consigner les changements dans la démarche, la posture et les réactions à la manipulation, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques et les comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou bizarres (par exemple, automutilation, marche à reculons) (32).

38. Avant la première administration de la substance d'essai, tous les animaux font l'objet d'un examen ophtalmologique effectué à l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un autre appareil approprié. À l'issue de l'étude, cet examen est réalisé de préférence sur tous les animaux, mais au moins sur ceux du groupe traité à la dose la plus élevée et du groupe témoin. Si des altérations oculaires liées au traitement sont détectées, tous les animaux sont examinés. Si l'analyse structurale ou d'autres observations suggèrent une toxicité oculaire, il faut augmenter la fréquence des examens oculaires.

39. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets neurotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 et/ou 90 jours, une vérification de la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (32) (stimuli auditifs, visuels ou proprioceptifs, par exemple) (33) (34) (35) et une évaluation de la force de préhension (36) ainsi que de l'activité motrice (37) pourront être menées en option. Elles seront réalisées avant le début de l'étude et tous les 3 mois par la suite, jusqu'à 12 mois inclusivement, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois). On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. Toutefois, d'autres modes opératoires que ceux figurant dans ces références sont également utilisables.

▼M4

40. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets immunotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 et/ou 90 jours, d'autres examens sur cet effet peuvent être menés en option à la fin de l'étude.

Poids corporel, prise d'aliments et d'eau, et efficacité alimentaire

41. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La prise d'aliments et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la prise d'eau est aussi mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la prise d'eau dans les études où celle- ci est modifiée.

Hématologie et biologie clinique

42. Dans les études faisant intervenir des rongeurs, des examens hématologiques sont effectués sur tous les animaux d'expérience (10 mâles et 10 femelles par groupe) à 3, 6 et 12 mois, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois). Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis (voir paragraphe 19). Dans les études faisant intervenir des non-rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien), à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, si aucun effet sur les paramètres hématologiques n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Les échantillons de sang sont prélevés en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbitaire, sous anesthésie.

43. Les investigations portent sur les paramètres suivants (38): numération leucocytaire totale et différentielle, numération érythrocytaire et plaquettaire, concentration d'hémoglobine, hématocrite (volume cellulaire sanguin après centrifugation), volume corpusculaire moyen (VCM), hémoglobine corpusculaire moyenne (HCM), concentration d'hémoglobine corpusculaire moyenne (CHCM), temps de prothrombine et temps de thromboplastine partielle activée. D'autres paramètres hématologiques tels que les corps de Heinz et autres anomalies morphologiques érythrocytaires ou la méthémoglobine peuvent être étudiés si nécessaire en fonction de la toxicité de la substance d'essai. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance d'essai donnée. Si la substance d'essai exerce un effet sur le système hématopoïétique, des numérations réticulocytaires et une cytologie médullaire peuvent être également indiquées mais n'ont pas à être pratiquées de manière systématique.

44. Des analyses de biochimie clinique, visant à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur le rein et le foie, sont effectuées à partir d'échantillons de sang prélevés sur tous les animaux étudiés (10 mâles et 10 femelles par groupe) à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques. Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer toutes les analyses de biochimie clinique nécessaires. Dans les études faisant intervenir des non-rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien), à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, sont superflus si

▼M4

aucun effet sur les paramètres de biochimie clinique n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Il est recommandé de faire jeûner les animaux (à l'exception des souris) pendant la nuit qui précède la prise de sang ([1]). Les investigations portent sur les paramètres suivants (38): glucose, urée (azote uréique), créatinine, protéines totales, albumine, calcium, sodium, potassium, cholestérol total, au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatocellulaires (alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase, glutamate déshydrogénase, acides biliaires totaux) (39) et au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatobiliaires (phosphatase alcaline, gamma- glutamyl transférase, 5'-nucléotidase, bilirubine totale, acides biliaires totaux) (39). D'autres paramètres de chimie clinique, tels que les triglycérides à jeun, des hormones spécifiques et la cholinestérase peuvent être mesurés si nécessaire en fonction de la toxicité de la substance d'essai. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance d'essai donnée.

45. Des analyses d'urine sont effectuées à partir d'échantillons prélevés sur tous les animaux étudiés (10 mâles et 10 femelles par groupe) à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques et de chimie clinique. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des dosages à 3 mois si les analyses d'urine pratiquées dans le cadre d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables n'ont révélé aucun effet. La liste suivante de paramètres à étudier fait partie d'une recommandation d'experts relative aux études de pathologie clinique (38): aspect, volume, osmolalité ou poids spécifique, pH, protéines totales et glucose. D'autres mesures, notamment la recherche de corps cétoniques, d'urobilinogène, de bilirubine et de sang occulte, peuvent aussi être réalisées. L'étude d'autres paramètres peut aussi s'avérer nécessaire pour élargir les recherches sur l'effet ou les effets observés.

46. On considère généralement que dans les études portant sur des chiens, il est nécessaire de déterminer les variables hématologiques et de biochimie clinique de base avant le début du traitement, mais que ce n'est pas indispensable dans les études portant sur des rongeurs (38). Toutefois, si l'on ne dispose pas de données historiques de base appropriées (voir paragraphe 58), il convient d'envisager d'en obtenir.

PATHOLOGIE

Autopsie macroscopique

47. Tous les animaux de l'étude font normalement l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude ou les groupes satellites) pour limiter ces observations à des mesures essentielles spécifiques telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité (voir paragraphe 21). Il n'est pas nécessaire que ces animaux fassent l'objet d'une autopsie, ni des procédures ultérieures décrites dans les paragraphes qui suivent. L'autopsie des animaux sentinelles pourra devoir être effectuée au cas par cas, à la discrétion du directeur de l'étude.

([1]) Pour un certain nombre de dosages effectués sur le sérum ou le plasma, et plus particulièrement pour le dosage du glucose, il est préférable de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang. En l'absence de jeûne, la variabilité des résultats est en effet plus grande, et risque de masquer des effets plus subtils ainsi que de rendre l'interprétation plus difficile. En revanche, le jeûne peut modifier le métabolisme général des animaux et, en particulier dans les études d'alimentation, perturber l'exposition quotidienne à la substance d'essai. Tous les animaux sont évalués dans le même état physiologique et il sera donc préférable de programmer les évaluations détaillées ou neurologiques pour un autre jour que celui des prélèvements de biochimie clinique.

▼**M4**

48. Il convient de déterminer le poids des organes de tous les animaux hormis ceux mentionnés dans la dernière partie du paragraphe 47. Les glandes surrénales, le cerveau, les épididymes, le cœur, les reins, le foie, les ovaires, la rate, les testicules, la thyroïde (pesée après fixation, avec les glandes parathyroïdes) et l'utérus de tous les animaux (excepté ceux trouvés moribonds et/ou ayant été sacrifiés en cours d'étude) sont débarrassés, le cas échéant, de tout tissu adhérent et pesés à l'état frais dès que possible après la dissection, pour prévenir la dessiccation.

49. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (40) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif):

toutes les lésions	macroscopiques	ganglions lymphatiques	(superficiels et profonds)
muscle squelettique	rein	aorte	glande coagulante
nerf périphérique	[sternum]	[bulbe olfactif]	glande de Harder
[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]	testicule	cæcum	glande lacrymale (exorbitale)
œil (dont rétine)	thymus	cerveau (segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)
œsophage	thyroïde	cœur	glande salivaire
ovaire	trachée	col utérin	glande surrénale
pancréas	[uretère]	côlon	hypophyse
parathyroïde	[urètre]	[dents]	iléon
peau	utérus (col inclus)	duodénum	jéjunum
poumon	vagin	épididyme	[langue]
prostate	vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)	estomac (pré-estomac, moelle épinière rate vésicule séminale estomac glandulaire)	(niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)
[fémur avec articulation]	segment de moelle osseuse et/ou moelle osseuse fraîchement ponctionnée	rectum	vessie
foie			

▼M4

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues de la substance d'essai sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu d'examiner les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Dans les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des chapitres B.8 (9) et B.29 (10) de la présente annexe. Pour les autres organes et tissus (outre les tissus des voies respiratoires spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

Histopathologie

50. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (40). Au minimum, les examens devront porter sur les tissus suivants:

— tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin,

— tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude,

— tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques,

— tissus des organes cibles, ou tissus présentant des altérations dues au traitement dans le groupe à dose élevée, prélevés sur tous les animaux de tous les autres groupes de doses,

— dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

OBSERVATIONS (PHASE DE CANCÉROGENÈSE)

51. Un examen de la morbidité ou de la mortalité est effectué quotidiennement chez tous les animaux, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris. Une recherche de signes spécifiques significatifs sur le plan toxicologique est aussi effectuée une fois par jour. Dans le cas d'une étude par gavage, les animaux sont examinés immédiatement après l'administration de la dose. Une attention particulière devra être accordée au développement de tumeurs, et le moment d'apparition, la localisation, les dimensions, l'aspect et la progression de chaque tumeur nettement visible ou palpable sont consignés.

52. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La prise d'aliments et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la prise d'eau est aussi mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la prise d'eau dans les études où celle- ci est modifiée.

▼M4

Hématologie, biochimie clinique et autres mesures

53. Afin d'obtenir le plus possible d'informations de l'étude, surtout en ce qui concerne le mode d'action de la substance, il peut être utile d'effectuer des prélèvements sanguins afin de procéder à des analyses hématologiques et de biochimie clinique, mais la décision concernant ces prélèvements appartient au directeur de l'étude. Des analyses d'urine peuvent être aussi appropriées. Les données obtenues sur les animaux étudiés dans la phase de toxicité chronique, normalement d'une durée de 12 mois (voir paragraphe 34), renseignent sur ces paramètres. On trouvera des informations complémentaires sur l'intérêt de tels prélèvements pour une étude de cancérogenèse dans le document d'orientation nº 116 (7). Les éventuels prélèvements sanguins sont à recueillir à la fin de l'étude, juste avant ou pendant le sacrifice des animaux. Ils sont effectués en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbital, sous anesthésie. Des étalements sanguins peuvent aussi être préparés en vue d'un examen, notamment si la moelle osseuse semble être l'organe cible, bien que l'utilité d'un tel examen pour l'évaluation du potentiel cancérogène/oncogène pendant la phase de cancérogenèse ait été mise en question (38).

PATHOLOGIE

Autopsie macroscopique

54. Tous les animaux de l'étude à l'exception des sentinelles et autres animaux satellites (voir paragraphe 20), font l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. L'autopsie des sentinelles et autres animaux satellites peut être effectuée au cas par cas, à la discrétion du directeur de l'étude. La pesée des organes ne fait normalement pas partie d'une étude de cancérogenèse car les changements liés à l'âge ou, dans des phases plus avancées, au développement de tumeurs rendent superflues les données relatives au poids des organes. Ces données peuvent toutefois présenter un grand intérêt pour les évaluations fondées sur le poids de la preuve, notamment en ce qui concerne le mode d'action. Si ces données font partie d'une étude satellite, elles sont collectées dans l'année suivant le début de l'étude.

55. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (40) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif):

toutes les lésions macroscopiques	ganglions lymphatiques	(superficiels et profonds)	muscle squelettique
rein	aorte	glande coagulante	nerf périphérique
[sternum]	[bulbe olfactif]	glande de Harder	[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]
testicule	cæcum	glande lacrymale (exorbitale)	œil (dont rétine)
thymus	cerveau (segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)	œsophage
thyroïde	cœur	glande salivaire	ovaire
trachée	col utérin	glande surrénale	pancréas
[uretère]	côlon	hypophyse	parathyroïde

▼M4

[urètre]	[dents]	iléon	peau
utérus (col inclus)	duodénum	jéjunum	poumon
vagin	épididyme	[langue]	prostate
vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)	estomac (pré-estomac, moelle épinière rate vésicule séminale	estomac glandulaire)	(niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)
[fémur avec articulation]	segment de moelle osseuse et/ou aspirat frais	rectum	vessie
foie			

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues de la substance d'essai sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu d'examiner les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Dans les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des chapitres B.8 (8) et B.29 (9) de la présente annexe. Pour les autres organes et tissus (outre les tissus des voies respiratoires spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

Histopathologie

56. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (40). Au minimum, les examens histopathologiques devront porter sur les tissus suivants:

— tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin,

— tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude,

— tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques, notamment des tumeurs,

— lorsque des altérations histopathologiques dues au traitement sont observées dans le groupe à dose élevée, ces mêmes tissus sont examinés chez tous les animaux de tous les autres groupes de doses,

— dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

▼M4

RÉSULTATS ET RAPPORT (CANCÉROGENÈSE ET TOXICITÉ CHRONIQUE)

Résultats

57. Des données sont recueillies pour chaque animal sur tous les paramètres évalués. En outre, toutes les données sont résumées sous forme de tableaux synoptiques indiquant, pour chaque groupe expérimental, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés, ainsi que le moment de l'apparition, la durée et la gravité de tous les effets toxiques observés, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les tableaux récapitulatifs présentent les moyennes et les écarts-types (pour les données recueillies en continu) pour les animaux présentant des effets toxiques ou des lésions, ainsi qu'une cotation des lésions.

58. Les données de contrôle historiques peuvent faciliter l'interprétation des résultats de l'étude, par exemple lorsque les données provenant des témoins concurrents semblent diverger de manière significative de données récentes obtenues sur des animaux témoins issus de la même installation d'essai/colonie d'élevage. Si elles sont évaluées, les données de contrôle historiques émanent du même laboratoire, portent sur des animaux du même âge et de la même souche, produits dans les cinq ans précédant l'étude en question.

59. Si possible, les résultats numériques sont évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Les méthodes statistiques et les données à analyser sont choisies au moment de la conception de l'étude (paragraphe 9). Ce choix permet d'opérer des ajustements en fonction de la survie, si nécessaire.

60. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique, pureté et propriétés physico-chimiques,

— données d'identification,

— provenance de la substance,

— numéro de lot,

— certificat d'analyse chimique.

Véhicule (le cas échéant):

— justification du choix du véhicule (s'il est autre que l'eau).

Animaux d'expérience:

— espèce/souche utilisée et justification du choix fait,

— nombre, âge et sexe des animaux au début de l'essai,

— provenance, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai.

▼**M4**

Conditions expérimentales:

— justification de la voie d'administration et du choix des doses,

— le cas échéant, méthodes statistiques utilisées pour analyser les données,

— détails concernant la formulation de la substance d'essai ou son incorporation dans les aliments,

— données analytiques sur la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,

— voie d'administration et détails concernant l'administration de la substance d'essai,

— pour les études par inhalation, mention de la voie d'entrée (nez seul ou corps entier),

— doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et, le cas échéant, facteur de conversion en dose réelle de la concentration de la substance d'essai (en mg/kg ou en ppm) dans les aliments ou l'eau de boisson,

— détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats (les résultats comprendront des données générales sous forme de tableaux synoptiques et des données propres à chaque animal)

Résultats généraux:

— données sur la survie,

— poids corporel/variations du poids corporel,

— prise d'aliments, calculs de l'efficacité alimentaire, si effectués, et prise d'eau, le cas échéant,

— données toxicocinétiques (si disponibles),

— ophtalmoscopie (si disponible),

— hématologie (si disponible),

— chimie clinique (si disponible).

Résultats cliniques:

— signes de toxicité,

— incidence (et, si elle est évaluée, sévérité) de toute anomalie observée,

— nature, sévérité et durée des observations cliniques (transitoires ou permanentes).

Données relatives aux autopsies:

— poids corporel à l'issue de l'essai,

— poids des organes et leur rapport au poids corporel, le cas échéant,

— résultats d'autopsie; incidence et sévérité des anomalies.

Histopathologie:

— observations d'effets histopathologiques non néoplasiques,

— observations d'effets histopathologiques néoplasiques,

▼M4

— corrélation entre les observations macroscopiques et microscopiques,

— description détaillée de tous les résultats histopathologiques liés au traitement et échelle d'évaluation de la sévérité,

— apport sur l'analyse éventuelle des lames par des pairs.

Traitement statistique des résultats, le cas échéant

Discussion des résultats, notamment:

— examen de toutes les approches de modélisation,

— relations dose-réponse,

— données de contrôle historiques,

— examen de toutes les informations concernant le mode d'action,

— détermination des DR, DSENO et DMENO (dose minimale avec effet nocif observé),

— applicabilité des résultats à l'être humain.

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE:

(1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), document de travail interne, direction de l'environnement, OCDE, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208

(4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191

(5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445

(6) Chapitre B.27 de la présente annexe, Essai de toxicité subchronique par voie orale – Toxicité orale à doses répétes – non rongeurs: 90 jours.

(7) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Série sur les essais et évaluations n° 116, disponible sur le site internet public de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (www.oecd.org/env/testguidelines).

(8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(9) Chapitre B.8 de la présente annexe. Toxicité subaiguë par inhalation: étude sur 28 jours.

(10) Chapitre B.29 de la présente annexe, Toxicité subchronique par inhalation: étude sur 90 jours.

(11) Chapitre B.9 de la présente annexe, Toxicité à doses répétées (28 jours) (administration cutanée).

▼M4

(12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

(13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., Fenner-Crisp P.A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

(17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9-35.

(18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al*. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37-68.

(19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69-98.

(20) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Série sur les essais et évaluations n° 35 et série sur les pesticides n° 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.

(21) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

(22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. and Lumley C.E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T., Griffiths S.A. and Lumley C.E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy P.O.F. & Harron D.W.G. (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

(26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196-1203.

▼M4

(27) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, DC, US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15-23.

(32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(33) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(34) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(35) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(36) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(37) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(38) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al*. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(39) EMEA (draft) document «Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity» (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼B

B.34 **TEST DE REPRODUCTION SUR UNE GÉNÉRATION**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Voir introduction générale, partie B.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Néant.

1.4. PRINCIPES DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance à tester est administrée à des doses croissantes à plusieurs groupes d'animaux mâles et femelles. Les mâles devraient être traités durant leur croissance et pendant au moins un cycle complet de spermatogenèse (environ 56 jours chez la souris et 70 jours chez le rat) afin de permettre à la substance de produire quelques effets nocifs sur la spermatogenèse.

Les femelles de la génération P seront traitées pendant au moins deux cycles œstraux complets afin de permettre a la substance testée de produire quelques effets nocifs sur l'œstrus. Les animaux sont ensuite accouplés. La substance testée est administrée aux animaux des deux sexes pendant la période d'accouplement, puis uniquement aux femelles durant la période de gestion et d'allaitement. Si l'on veut administrer la substance par voie respiratoire (inhalation), la méthode nécessite des adaptations.

1.5. CRITÈRE QUALITATIF

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Avant l'essai, de jeunes animaux adultes et sains sont randomisés et répartis par groupes traités et témoins. Les animaux sont maintenus dans les conditions expérimentales de stabulation et d'alimentation pendant au moins 5 jours avant l'expérience. Il est recommandé d'administrer la substance à tester dans la nourriture ou dans l'eau de boisson. D'autres voies d'administration sont également acceptables. La même méthode d'administration sera utilisée pour tous les animaux durant la période expérimentale appropriée. Si un véhicule ou d'autres additifs sont utilisés pour faciliter le traitement, ils devraient être reconnus sans effet toxique. Le traitement devrait être effectué pendant les 7 jours de la semaine.

▼B

Animaux d'expérience

Choix de l'espèce:

L'espèce convenant le mieux est celle du rat ou de la souris. Des souches à faible taux de fécondité ne devraient pas être utilisées. Des animaux sains n'ayant pas été déjà utilisés dans une expérimentation devraient être utilisés. L'espèce, la souche, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience seront spécifiés.

Pour évaluer de façon adéquate la fécondité, mâles et femelles devraient tous deux être étudiés. Tous les animaux traités et témoins devraient être sevrés avant le début du traitement.

Nombre et sexe:

Chaque groupe traité et chaque groupe témoin devrait comporter un nombre d'animaux suffisant pour obtenir environ 20 femelles gravides arrivées à terme ou proches de celui-ci.

L'objectif est d'obtenir un nombre de gestations et de portées suffisant pour permettre une évaluation valable de l'influence de la substance sur la fertilité, la gestation, le comportement maternel des animaux de la génération P ainsi que l'allaitement, la croissance et le développement de la génération F_1, de la conception au sevrage.

Conditions d'essai

La nourriture et l'eau devraient être fournies à satiété. Lorsqu'elles seront proches du terme, les femelles gravides devraient être placées dans des cages individuelles de mise bas ou de maternité et il peut leur être fourni les matériaux de nidification nécessaires.

Doses

Au moins trois groupes traités et un groupe témoin seront utilisés. Si un véhicule est utilisé pour administrer la substance testée, le groupe témoin recevra le volume maximal de véhicule ayant été utilisé. Si une substance à tester entraîne une réduction de la consommation alimentaire ou de l'assimilation, il peut être nécessaire d'utiliser un groupe témoin apparié. Dans les conditions idéales et à moins que la nature physique/chimique ou les effets biologiques de la substance testée ne s'y opposent dans une certaine mesure, le niveau de dose le plus élevé produira un effet toxique sans toutefois entraîner la mort des animaux parentaux (P). La(les) dose(s) intermédiaire(s) devrait(ent) produire des effets toxiques minima attribuables à la substance testée, et la dose faible ne devrait produire aucun effet nocif observable sur les parents ou leur progéniture. Lorsque la substance est administrée par gavage ou en capsule, la dose administrée à chaque animal devrait être établie en fonction du poids corporel de chaque animal et fera l'objet d'un ajustement hebdomadaire afin de tenir compte des modifications de poids corporel. Pour les femelles pendant la gestation, le traitement peut, si on le souhaite, être établi en fonction du poids corporel au jour 0 ou au jour 6 de la gestation.

Essai de limite

Dans le cas de substances faiblement toxiques, si un niveau de dose d'au moins 1 000 mg/kg n'entraîne aucune interférence sur les capacités de reproduction, des études à d'autres niveaux de doses peuvent être considérées non nécessaires. Si une étude préliminaire effectuée avec le niveau de dose élevé, avec une toxicité évidente chez la mère, n'a aucun effet nocif sur la fertilité, on peut juger inutile d'effectuer des études avec d'autres niveaux de doses.

▼B

Mode opératoire

Plan d'expérience

On devrait commencer à administrer quotidiennement la substance aux mâles géniteurs (P) lorsqu'ils auront atteints l'âge de 5 à 9 semaines, après qu'ils auront été sevrés et acclimatés pendant au moins 5 jours. Chez les rats, le traitement est poursuivi pendant 10 semaines, avant la période d'accouplement (pour les souris, 8 semaines). Les mâles devraient être sacrifiés et examinés soit à la fin de la période d'accouplement soit alternativement maintenus en vie avec poursuite de l'administration de la substance dans la nourriture, en vue de la production éventuelle d'une seconde portée, et devraient être sacrifiés et examinés à un moment avant la fin de l'étude. Dans le cas des femelles (P), le traitement devra commencer après au moins 5 jours d'acclimatation et se poursuivre pendant au moins 2 semaines avant l'accouplement. Les femelles P devraient continuer à recevoir leur traitement quotidien durant les 3 semaines de la période d'accouplement, durant la gestation et jusqu'au sevrage des petits F_1. Des modifications du schéma de traitement peuvent être envisagées au cas où l'on disposerait d'autres informations sur la substance étudiée, comme l'induction du métabolisme ou la bio-accumulation.

Procédure d'accouplement

Dans les études de toxicité sur la fonction de reproduction, les accouplements peuvent se faire soit 1:1(1 mâle, 1 femelle) soit 1:2 (1 mâle, 2 femelles).

Dans le cas d'un accouplement 1:1, une femelle sera placée avec le même mâle jusqu'à ce qu'elle soit gravide ou que les 3 semaines se soient écoulées. On examinera les femelles chaque matin afin de relever la présence de sperme ou de bouchon vaginal. Le jour 0 de la gestation est défini comme le jour où l'on constate la présence de bouchon vaginal ou de sperme.

Tous les couples ayant failli à l'accouplement devraient être examinés afin de déterminer la cause de l'apparente stérilité.

Ceci peut impliquer des procédures qui permettent des conditions d'accouplement avec des mâles ou des femelles ayant déjà procréé, de procéder à un examen microscopique des organes de reproduction ou à un examen du cycle œstral ou de la spermatogenèse.

Taille de la portée

On laisse les animaux traités durant l'étude de fertilité mettre bas naturellement et élever librement leurs petits jusqu'au sevrage.

Quand une méthode d'homogénéisation des portées est effectuée, il est suggéré d'appliquer le programme suivant: entre le jour 1 et le jour 4 après la naissance, la taille de chaque portée peut être adaptée en éliminant, par sélection, des petits afin d'obtenir, dans toute la mesure du possible, 4 mâles et 4 femelles par portée.

Si le nombre de mâles ou de femelles ne permet pas d'obtenir 4 petits de chaque sexe par portée, un ajustement partiel peut être accepté (par exemple 5 mâles et 3 femelles). Des ajustements ne sont pas possibles pour les portées de moins de 8 petits.

▼B

Observations

Pendant toute la période d'essai, chaque animal devrait être observé au moins une fois par jour. Des modifications comportementales significatives, des signes de parturition difficile ou prolongée ainsi que tous les signes de toxicité, y compris la mortalité, devraient être enregistrés. Pendant les périodes de pré-accouplement et d'accouplement, la consommation alimentaire sera déterminée quotidiennement. Après la parturition et durant la lactation, la consommation alimentaire ainsi que la consommation d'eau lorsque la substance à tester est administrée dans l'eau de boisson devraient être déterminées le jour de la pesée des petits. Les mâles et les femelles P devraient être pesés le premier jour du traitement, puis toutes les semaines. Ces observations devraient être notées individuellement pour chaque animal adulte.

La durée de la gestation devrait être calculée à partir du jour 0 de la gravidité. Chaque portée devrait être examinée dès que possible après la naissance afin de déterminer le nombre et le sexe des petits, les mort-nés, les nouveau-nés vivants et la présence d'anomalies macroscopiques.

Les petits morts et les petits sacrifiés le quatrième jour devraient être conservés et examinés en vue de déceler d'éventuelles anomalies. Les petits vivants devraient être comptés et les portées pesées le matin qui suit la naissance ainsi que le quatrième et le septième jour, puis chaque semaine jusqu'au terme de l'étude, où les animaux devraient être alors pesés individuellement.

Les anomalies physiques ou comportementales observées chez les mères ou les petits seront enregistrées.

Pathologie

Autopsie

Au moment du sacrifice ou de la mort en cours d'étude, les animaux de la génération P devraient être soumis à un examen macroscopique afin de déceler toute anomalie structurelle ou toute modification pathologique; une attention particulière étant accordée aux organes de l'appareil de reproduction. Les petits, morts ou moribonds, seront examinés du point de vue des malformations.

Histopathologie

Les ovaires, l'utérus, le col utérin, le vagin, les testicules, l'épididyme, les vésicules séminales, la prostate, la glande coagulante, l'hypophyse et l'(les) organe(s) cible(s) de tous les animaux P seront conservés en vue d'un examen microscopique. Au cas où ces organes n'ont pas été examinés au cours d'autres études à dose multiple, ils devraient être soumis à l'examen histologique pour tous les animaux traités à la dose élevée, tous les animaux témoins ainsi que ceux morts en cours d'expérience, lorsque c'est faisable.

Les organes présentant des anomalies chez ces animaux devraient alors être examinés chez tous les autres animaux P. Dans ce cas, l'examen microscopique sera effectué pour tous les tissus présentant des modifications pathologiques macroscopiques. Comme suggéré dans les procédures d'accouplement, les organes reproducteurs des animaux soupçonnés de stérilité seront soumis à un examen microscopique.

▼B

2. **RÉSULTATS**

Les résultats peuvent être résumés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque groupe d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre de mâles féconds, le nombre de femelles gravides, le type de modifications et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de modification.

Lorsque c'est possible, les résultats numériques devraient être évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. **RAPPORT**

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

— espèce/souche utilisée,

— réponse toxique par sexe et par dose, y compris fécondité, gestation et viabilité,

— moment de la mort en cours d'expérience ou indication si l'animal était encore en vie au moment prévu pour le sacrifier à l'issue de l'étude,

— tableau présentant les poids de chaque portée, les poids moyens des petits et les poids individuels des petits à l'issue de l'étude,

— effet toxique ou autre sur la reproduction, la descendance, la croissance post-natale,

— jour de l'observation de tout signe anormal et évolution subséquente,

— poids corporel des animaux P,

— résultats d'autopsie,

— description détaillée des observations microscopiques,

— traitement statistique des résultats, quand cela est nécessaire,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

3.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

▼B

B.35 ÉTUDE DE TOXICITÉ POUR LA REPRODUCTION SUR DEUX GÉNÉRATIONS

1. MÉTHODE

Cette méthode est calquée sur la ligne directrice d'essai nº 416 (2001) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode d'essai relative à la toxicité pour la reproduction sur deux générations est destinée à livrer des informations générales concernant les effets d'une substance d'essai sur l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâle et femelle, notamment la fonction gonadique, le cycle œstral, le comportement à l'égard de l'accouplement, la conception, la gestation, la mise-bas, la lactation, le sevrage ainsi que la croissance et le développement de la descendance. L'étude peut aussi montrer les effets de la substance d'essai sur la morbidité et la mortalité néonatales, fournir des données préliminaires sur la toxicité prénatale et postnatale pour le développement et orienter des essais ultérieurs. Cette méthode étudie non seulement la croissance et le développement de la génération F1, mais évalue aussi l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâle et femelle, ainsi que la croissance et le développement de la génération F2. Il est possible d'obtenir des informations supplémentaires sur la toxicité pour le développement et les déficits fonctionnels en complétant le présent protocole par des études décrites dans les méthodes d'essai relatives à la toxicité pour le développement et/ou à la neurotoxicité pour le développement, ou en procédant à des études séparées à l'aide de méthodes d'essai appropriées.

1.2 PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance d'essai est administrée à différentes doses échelonnées suivant une gradation à plusieurs groupes de mâles et de femelles. On administre la substance aux mâles de la génération P (génération parentale) durant leur croissance et pendant au moins un cycle spermatogène complet (environ 56 jours chez la souris et 70 jours chez le rat) afin de mettre en évidence tous ses effets nocifs sur la spermatogenèse. Les effets sur le sperme sont déterminés d'après plusieurs paramètres, comme la morphologie et la motilité des spermatozoïdes, sur des préparations de tissus et au cours d'un examen histopathologique détaillé. Si l'on dispose de données sur la spermatogenèse provenant d'une précédente étude à doses répétées de durée suffisante, par exemple 90 jours, il n'est pas nécessaire d'inclure les mâles de la génération P dans l'évaluation. Il est toutefois recommandé de conserver des échantillons ou des enregistrements numériques du sperme de la génération P, en vue d'une évaluation ultérieure. Les femelles de la génération P doivent être traitées durant la croissance et pendant plusieurs cycles œstraux complets de manière à pouvoir détecter tous les effets nocifs de la substance d'essai sur le cycle œstral. La substance d'essai est administrée aux animaux de la génération P durant la période d'accouplement, pendant les gestations qui en résultent et jusqu'au sevrage de la descendance F1. Après le sevrage, la descendance F1 continue de recevoir la substance durant toute sa croissance et l'administration se poursuit au cours de l'accouplement et de la production de la génération F2, jusqu'au sevrage de cette dernière.

Tous les animaux subissent un examen clinique et pathologique destiné à mettre en évidence des signes de toxicité; cet examen s'attache en particulier à l'évaluation des effets sur l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâle et femelle, ainsi que sur la croissance et le développement de la descendance.

▼B

1.3 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.3.1 **Choix des espèces**

Le rat est l'espèce qui convient le mieux à cet essai. Si on utilise une autre espèce, il faut justifier ce choix et effectuer les adaptations qui s'imposent. Les souches à faible taux de fécondité ou chez lesquelles l'incidence des anomalies du développement est notoirement élevée sont à proscrire. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux utilisés doit être minimale et ne doit pas dépasser 20 % du poids moyen des représentants de chaque sexe.

1.3.2 **Conditions d'encagement et d'alimentation**

L'animalerie doit être à 22 ºC (+ 3 ºC), avec un taux d'humidité relative d'au moins 30 % et de préférence inférieur à 70 %, sauf pendant le nettoyage de la salle, l'idéal se situant entre 50 et 60 %. On appliquera un éclairage artificiel, avec un cycle de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Un régime alimentaire classique pour animaux de laboratoire, avec eau potable à satiété, conviendra. Le choix des aliments sera guidé par la nécessité d'y incorporer la substance d'essai, si elle est administrée par cette voie.

Les animaux peuvent être encagés individuellement ou par petits groupes du même sexe. L'accouplement doit se dérouler dans des cages appropriées. Après constatation de la copulation, les femelles s'étant accouplées seront placées dans des cages individuelles aménagées pour la mise-bas ou la maternité. Les rates s'étant accouplées peuvent aussi être encagées par petits groupes et séparées un ou deux jours avant la mise-bas. À l'approche de la mise-bas, on leur fournira des matériaux de nidification appropriés et déterminés.

1.3.3 **Préparation des animaux**

Il convient d'utiliser de jeunes animaux sains, acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours et n'ayant pas été soumis à d'autres essais. On indiquera l'espèce, la souche, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience. Il importe de connaître les liens collatéraux entre les animaux, afin de ne pas accoupler les membres d'une même fratrie. Les animaux sont répartis au hasard entre les groupes témoins et les groupes traités (il est recommandé de les regrouper par tranche de poids corporel). Les cages sont placées de manière à réduire au minimum les éventuels effets liés à leur disposition. Chaque animal est désigné par un numéro d'identification propre. Les animaux de la génération P doivent être identifiés avant le début du traitement; ceux de la génération F1 qui sont sélectionnés pour l'accouplement seront identifiés au moment du sevrage. On notera la portée d'origine de tous les animaux de la génération F1 sélectionnés. Il est également recommandé d'identifier chaque petit dès que possible après la naissance, si on envisage de les peser individuellement ou d'effectuer des essais fonctionnels.

Les animaux de la génération P seront âgés de 5 à 9 semaines au début du traitement. Tous les groupes d'essai doivent être aussi homogènes que possible quant au poids et à l'âge des animaux.

▼B

1.4. MODE OPÉRATOIRE

1.4.1. **Nombre et sexe des animaux**

Chaque groupe d'essai ou témoin doit comporter un nombre d'animaux suffisant pour que l'on puisse disposer en fin d'essai d'au moins 20 femelles gravides à terme ou presque. Pour les substances qui occasionnent des effets indésirables (stérilité, toxicité excessive à la dose élevée, par exemple), cela risque d'être impossible. Le but est d'obtenir suffisamment de femelles gravides pour pouvoir procéder à une évaluation significative de l'action de la substance étudiée sur la fertilité, la gestation, le comportement maternel et la période d'allaitement, la croissance et le développement de la descendance F1, depuis la conception jusqu'à la maturité, et sur le développement de leur descendance F2 jusqu'au sevrage. En conséquence, le fait de ne pas avoir obtenu le nombre souhaité de femelles gravides (c'est-à-dire 20) n'invalide pas nécessairement l'étude, et la situation doit être évaluée au cas par cas.

1.4.2. **Préparation des doses**

Il est recommandé d'administrer la substance d'essai par voie orale (dans la nourriture, l'eau de boisson ou par gavage) à moins qu'une autre voie (cutanée ou par inhalation) ne soit jugée plus adéquate.

S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. On recommande, si possible, d'envisager d'abord l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, puis d'une solution ou d'une émulsion dans l'huile (par exemple l'huile de maïs) et en dernier lieu d'une solution dans d'autres véhicules. Si le véhicule n'est pas aqueux, sa toxicité doit être connue. Il faut déterminer la stabilité de la substance d'essai dans le véhicule.

1.4.3. **Dosage**

On utilise au moins trois doses différentes et un témoin en parallèle. Sauf limitations imposées par les propriétés physiques, chimiques ou biologiques de la substance d'essai, la dose la plus élevée doit faire apparaître une certaine toxicité, sans entraîner la mort ni provoquer de souffrances aiguës. En cas de mortalité inattendue, si le taux de mortalité de la génération parentale est inférieur à environ 10 pour cent, l'étude reste en générale acceptable. Il convient de choisir une série décroissante de doses afin de mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet ainsi qu'une dose sans effets toxiques (DSET). L'écart optimal entre chaque dose de la série décroissante est généralement d'un facteur deux ou quatre, et l'adjonction d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation d'écarts trop importants (par exemple, supérieurs à un facteur dix). Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, l'écart entre les doses ne doit pas être supérieur à un facteur trois. Le choix des doses sera orienté par toutes les données existantes sur la toxicité, en particulier les résultats des études à doses répétées. Toute information sur le métabolisme et la cinétique de la substance d'essai ou d'un composé apparenté doit également être prise en considération. Ces informations serviront aussi à justifier l'échelle des doses.

▼B

Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin seront traités de la même manière que les animaux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé. Lorsque la substance d'essai est administrée mélangée aux aliments et qu'il en résulte une diminution de la prise ou la consommation de nourriture, il peut s'avérer nécessaire d'adjoindre un groupe témoin nourri en parallèle. Les résultats d'études contrôlées destinées à évaluer les effets d'une diminution de la consommation de nourriture sur les paramètres de la reproduction peuvent remplacer l'utilisation d'un groupe témoin nourri en parallèle.

Il convient d'être attentif, le cas échéant, aux effets du véhicule ou des autres additifs sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai, aux effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai, susceptibles de modifier sa toxicité, ainsi qu'aux effets sur la consommation de nourriture ou d'eau et sur l'état nutritionnel des animaux.

1.4.4. **Essai limite**

Si un essai réalisé à une dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour administrée par voie orale ou incorporée dans la nourriture ou l'eau de boisson selon un pourcentage équivalent, conformément à la méthode décrite dans cette étude, n'entraîne pas de signes de toxicité observables chez les parents ou dans leur progéniture et qu'aucun effet toxique n'est escompté au vu des données disponibles concernant des composés présentant une structure et/ou une action métabolique analogues, il n'est pas indispensable de mener une étude complète sur plusieurs doses différentes. L'essai limite n'a pas de raison d'être lorsque le niveau d'exposition humaine implique l'utilisation d'une dose orale plus élevée. Pour d'autres modes d'administration, tels que l'inhalation ou l'application cutanée, les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, comme sa solubilité, limitent souvent la concentration maximale applicable.

1.4.5. **Administration des doses**

Les animaux reçoivent la substance d'essai quotidiennement, sept jours sur sept. L'administration par voie orale (dans la nourriture, l'eau de boisson ou par gavage) est préférable. Si l'on opte pour un autre mode d'administration, il convient de justifier ce choix et d'apporter les modifications nécessaires, le cas échéant. On appliquera le même mode d'administration à tous les animaux, durant la période expérimentale adéquate. Si la substance d'essai est administrée par gavage, on procédera à l'aide d'une sonde gastrique. Le volume maximal de liquide administré en une seule fois ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel (0,4 ml/100 g de poids pour l'huile de maïs), sauf dans le cas des solutions aqueuses où l'on peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Sauf dans le cas de substances irritantes ou corrosives dont les effets s'intensifient généralement aux concentrations supérieures, il y a lieu de réduire au minimum la variabilité du volume d'essai en adaptant les concentrations de façon à obtenir un volume constant à toutes les doses. Dans les études par gavage, les petits ne reçoivent normalement la substance d'essai qu'indirectement, par le lait maternel, jusqu'à ce que l'administration directe débute pour eux, à partir du sevrage. Lorsque la substance d'essai est mélangée à la nourriture ou à l'eau de boisson, les petits reçoivent aussi la substance d'essai directement dès qu'ils commencent à s'alimenter seuls, lors de la dernière semaine d'allaitement.

▼B

Il est important de s'assurer que les quantités de substances administrées dans la nourriture ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou l'équilibre hydrique. Si la substance d'essai est ajoutée à la nourriture, elle peut être administrée à concentration constante dans cette dernière (ppm) ou à dose constante par rapport au poids de l'animal; il y a lieu de préciser l'option retenue. Si l'on recourt au gavage, il faut toujours administrer la substance d'essai à peu près à la même heure chaque jour et ajuster la dose au moins une fois par semaine pour qu'elle demeure constante par rapport au poids de l'animal. Cet ajustement devra tenir compte de la diffusion placentaire.

1.4.6. **Programmes expérimentaux**

L'administration quotidienne de la substance d'essai aux mâles et aux femelles de la génération P doit débuter quand ils sont âgés de 5 à 9 semaines. Pour les mâles et les femelles de la génération F1, elle débutera au sevrage; il faut tenir compte du fait que, lorsque la substance d'essai est administrée dans la nourriture ou l'eau de boisson, il est possible que les petits de la génération F1 soient déjà exposés directement à la substance durant la période d'allaitement. Les deux sexes des générations P et F1 continueront à recevoir la substance pendant au moins 10 semaines avant la période d'accouplement. Le traitement sera poursuivi pour les deux sexes durant les deux semaines de la période d'accouplement. Les mâles qui ne serviront pas à l'évaluation des effets sur la reproduction seront euthanasiés et examinés. Les femelles de la génération P continueront à recevoir la substance d'essai tout au long de la gestation et jusqu'au sevrage de leur descendance F1. Il sera peut-être nécessaire de modifier le programme d'administration des doses à la lumière des informations disponibles sur la substance d'essai, notamment en ce qui concerne la toxicité, l'induction métabolique ou la bioaccumulation. La dose administrée à chaque animal est normalement calculée d'après les résultats de la dernière pesée de l'animal. Toutefois, la prudence s'impose lors de l'ajustement de la dose au cours du dernier tiers de la gestation.

Le traitement des mâles et des femelles P et F1 se poursuit jusqu'à leur sacrifice. Tous les adultes mâles et femelles P et F1 qui ne sont plus nécessaires pour l'évaluation des effets sur la reproduction doivent être euthanasiés. Les descendants F1 qui n'ont pas été sélectionnés pour l'accouplement et tous les descendants F2 seront euthanasiés après le sevrage.

1.4.7 **Accouplement**

1.4.7.1 *Accouplement de la génération parentale (P)*

Pour chaque accouplement, on réunira une femelle et un mâle traités à la même dose (accouplement 1:1) jusqu'à ce qu'ils aient copulé ou durant deux semaines. Les femelles subiront un examen quotidien destiné à détecter la présence de sperme ou d'un bouchon vaginal. Le jour 0 de la gestation est défini comme étant celui où l'on observe du sperme ou un bouchon vaginal. Si l'accouplement n'a pas lieu, on peut envisager de faire une deuxième tentative en réunissant les femelles avec des mâles du même groupe ayant fait leurs preuves. Les couples doivent être clairement identifiés dans les résultats. On évitera d'accoupler des membres d'une même fratrie.

▼B

1.4.7.2 *Accouplement de la génération F1*

S'agissant de l'accouplement de la génération F1, on sélectionne au moins un mâle et une femelle de chaque portée, au moment du sevrage, en vue de les accoupler avec d'autres descendants traités à la même dose, mais issus d'une autre portée, afin d'obtenir la génération F2. La sélection des petits au sein d'une même portée doit se faire au hasard s'ils ne diffèrent pas de façon significative quant au poids corporel ou à l'apparence. Si l'on constate de telles différences, on sélectionnera les meilleurs représentants de chaque portée. D'un point de vue pragmatique, il est plus facile d'opérer cette sélection en fonction du poids corporel, mais il pourrait être plus pertinent de se fonder sur l'apparence. Les descendants F1 ne doivent pas être accouplés avant d'avoir atteint leur pleine maturité sexuelle.

On évaluera les couples sans descendance afin de déterminer la cause apparente de leur stérilité. À cet effet, on pourra donner aux animaux d'autres occasions de s'accoupler avec d'autres mâles ou femelles ayant fait leurs preuves, effectuer un examen microscopique des organes reproducteurs, ou analyser les cycles œstraux ou la spermatogenèse.

1.4.7.3. *Deuxième accouplement*

Dans certains cas, notamment lorsque la taille de la portée est modifiée par le traitement ou lorsqu'un effet équivoque est observé dans le premier accouplement, on préconise d'accoupler une deuxième fois les adultes P ou F1, afin d'obtenir une deuxième portée. Il est recommandé d'accoupler une deuxième fois les mâles ou les femelles qui n'ont pas engendré de portée avec un reproducteur ou une reproductrice ayant fait ses preuves. Si la production d'une deuxième portée est jugée nécessaire, le deuxième accouplement doit avoir lieu environ une semaine après le sevrage de la dernière portée.

1.4.7.4. *Taille de la portée*

On laisse les animaux mettre bas normalement et élever leur progéniture jusqu'au sevrage. La normalisation de la taille des portées est facultative; si l'on y recourt, il faut décrire en détail la méthode utilisée.

1.5. OBSERVATIONS

1.5.1. **Observations cliniques**

Une observation clinique générale est réalisée chaque jour; en cas d'administration par gavage, l'heure à laquelle cette observation est réalisée doit tenir compte du moment où l'on prévoit que les effets atteindront leur intensité maximale après administration. On notera les changements de comportement, les signes de mise-bas prolongée ou difficile et tous les symptômes de toxicité. En outre, au moins une fois par semaine, chaque animal devra faire l'objet d'un examen plus détaillé qui pourrait être aisément réalisé à l'occasion d'une pesée de l'animal. Deux fois par jour et une fois par jour pendant le week-end, selon les besoins, on recherchera des signes de morbidité et de mortalité sur tous les animaux.

▼B

1.5.2. **Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau des animaux parents**

Les animaux parents (P et F1) sont pesés le jour de la première administration et ensuite au moins une fois par semaine. Les mères (P et F1) sont pesées au minimum aux jours 0, 7, 14, et 20 ou 21 de la gestation, puis aux mêmes jours que leurs petits durant l'allaitement, et enfin le jour de leur sacrifice. Les résultats sont consignés individuellement pour chaque animal adulte. Durant la période qui précède l'accouplement et pendant la gestation, la consommation de nourriture est mesurée au moins une fois par semaine. La consommation d'eau est relevée au moins une fois par semaine si la substance d'essai est administrée dans l'eau.

1.5.3. **Cycle œstral**

La durée et la normalité du cycle œstral sont évaluées chez les femelles P et Fl à l'aide de frottis vaginaux, avant l'accouplement, et facultativement pendant la période d'accouplement, jusqu'à constatation de preuves d'accouplement. Les cellules vaginales ou cervicales seront prélevées avec soin pour éviter d'agresser la muqueuse et d'induire ainsi une pseudogestation (1).

1.5.4. **Paramètres d'évaluation du sperme**

On note le poids des testicules et des épididymes de tous les mâles P ou F1 sacrifiés, en conservant un exemplaire de chaque organe pour l'examen histopathologique (voir paragraphes 1.5.7, 1.5.8.1). On réservera les testicules et les épididymes d'un sous-lot composé d'au moins dix mâles de chaque génération (P et F1) pour la numération des spermatides résistantes à l'homogénéisation et des spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme. Dans ce même sous-lot de mâles, on recueillera le contenu de la queue de l'épididyme ou du canal déférent en vue d'évaluer la motilité et la morphologie des spermatozoïdes. Si des effets liés au traitement sont observés ou si d'autres études révèlent que la substance peut avoir des effets sur la spermatogénèse, l'évaluation du sperme sera réalisée sur tous les mâles traités aux différentes doses; dans le cas contraire, on pourra limiter la numération aux mâles P et F1 du groupe témoin et du groupe traité à la dose la plus élevée.

Il convient de dénombrer la totalité des spermatides testiculaires résistantes à l'homogénéisation et des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme (2) (3). Le nombre de spermatozoïdes mis en réserve dans la queue de l'épididyme peut être déduit de la concentration et du volume des spermatozoïdes dans la suspension utilisée pour compléter les évaluations qualitatives, et du nombre de spermatozoïdes récupérés après le broyage et/ou l'homogénéisation ultérieurs du tissu caudal restant. La numération doit être effectuée au sein du sous-lot de mâles sélectionnés dans les groupes traités aux différentes doses, immédiatement après le sacrifice, à moins qu'on ne réalise des enregistrements vidéo ou numériques ou qu'on ne congèle des échantillons en vue d'une analyse ultérieure. Dans ces circonstances, le groupe témoin et le groupe traité à la dose la plus élevée peuvent être analysés en premier. Si l'on n'observe pas d'effets liés au traitement (révélés par exemple par la numération, la morphologie ou la motilité des spermatozoïdes), il n'est pas nécessaire d'analyser les groupes traités aux autres doses. Si des effets liés au traitement apparaissent dans le groupe traité à la dose la plus élevée, on évaluera aussi les groupes traités aux doses plus faibles.

▼B

La motilité des spermatozoïdes dans l'épididyme ou le canal déférent est évaluée ou enregistrée sur support vidéo immédiatement après le sacrifice. Le sperme, prélevé de façon à éviter autant que possible de léser les organes, est dilué en vue de l'analyse de la motilité selon une méthode acceptable (4). Il convient d'évaluer subjectivement ou objectivement le pourcentage de spermatozoïdes devenant progressivement mobiles. Si l'on pratique une analyse du mouvement assistée par ordinateur (5) (6) (7) (8) (9) (10), la motilité progressive est évaluée d'après les seuils définis par l'utilisateur pour la vitesse moyenne de trajectoire, la rectilignité ou l'index linéaire. Si les échantillons sont enregistrés en vidéo (11) ou si les images sont enregistrées d'une autre manière au moment de l'autopsie, l'analyse subséquente pourra se limiter aux mâles P et F1 du groupe témoin et du groupe traité à la dose la plus élevée, à moins que des effets liés au traitement n'aient été observés, auquel cas il faudra aussi évaluer les groupes traités aux doses plus faibles. En l'absence d'une image vidéo ou numérique, tous les échantillons de tous les groupes traités devront être analysés lors de l'autopsie.

On procédera à une évaluation morphologique d'un échantillon de sperme de l'épididyme ou du canal déférent. Les spermatozoïdes (au moins 200 par échantillon) doivent être examinés dans des préparations fixées et en milieu liquide (12), puis classés en tant que spécimens normaux ou anormaux. Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes comprennent, par exemple, la fusion, des têtes isolées et des têtes et/ou des queues déformées. L'évaluation doit être réalisée au sein du sous-lot de mâles sélectionnés dans les groupes traités aux différentes doses, immédiatement après le sacrifice ou ultérieurement à partir des enregistrements vidéo ou numériques. Les frottis, une fois fixés, peuvent aussi être analysés à une date ultérieure. Dans ces circonstances, le groupe témoin et le groupe traité à la dose la plus élevée peuvent être analysés en premier. Si l'on n'observe pas d'effets liés au traitement (sur la morphologie des spermatozoïdes, par exemple), l'analyse des groupes traités aux autres doses devient superflue. Si des effets liés au traitement apparaissent dans le groupe traité à la plus dose élevée, il convient d'évaluer également les groupes traités aux doses plus faibles.

Si l'un des paramètres d'évaluation du sperme mentionnés plus haut a déjà été examiné dans le cadre d'une étude de toxicité systémique d'au moins 90 jours, il ne doit pas nécessairement être réévalué au cours de l'étude de la toxicité sur deux générations. Il est cependant recommandé de conserver des échantillons ou des enregistrements vidéo du sperme de la génération P, pour permettre une évaluation ultérieure si nécessaire.

1.5.5. **Descendance**

On examine chaque portée dès que possible après la mise-bas (jour 0 de l'allaitement), afin d'établir le nombre et le sexe des petits, la mortinatalité, le nombre de naissances vivantes et la présence d'anomalies macroscopiques. Les petits trouvés morts au jour 0 seront de préférence examinés, s'ils ne sont pas macérés, afin de mettre en évidence d'éventuelles anomalies et de déterminer la cause de la mort, et conservés. Les petits vivants doivent être comptés et pesés individuellement à la naissance (jour 0 de l'allaitement) ou le jour 1, et pesés régulièrement par la suite, par exemple les jours 4, 7, 14 et 21 de l'allaitement. On notera les anomalies physiques et comportementales observées chez les mères ou les petits.

▼B

Le développement physique de la descendance est consigné essentiellement sous la forme du gain de poids corporel. D'autres paramètres physiques (ouverture des oreilles et des yeux, sortie des dents, développement de la pilosité, par exemple) peuvent fournir des informations supplémentaires, mais ces observations sont de préférence réservées à l'évaluation de la maturité sexuelle (âge et poids corporel au moment de l'ouverture vaginale ou de la séparation balano-préputiale, par exemple) (13). Il est recommandé de réaliser des explorations fonctionnelles (l'activité motrice, les fonctions sensorielles, l'ontogenèse des réflexes, par exemple) de la descendance F1 avant et/ou après le sevrage, notamment celles qui se rapportent à la maturation sexuelle, si elles ne sont pas explorées dans d'autres études. On détermine l'âge auquel sont survenus l'ouverture vaginale ou la séparation balano-préputiale chez les descendants F1 tout juste sevrés qui ont été sélectionnés en vue de l'accouplement. Il convient de mesurer la distance ano-génitale chez les petits F2, le jour de leur naissance, si l'on a constaté une modification de la proportion de mâles et de femelles ou de l'âge de maturation sexuelle dans la génération F1.

Les observations fonctionnelles ne s'imposent plus pour les groupes présentant des signes évidents de toxicité (diminution sensible de la prise de poids, etc., par exemple). Les explorations fonctionnelles, le cas échéant, seront réalisées sur les petits non sélectionnés pour l'accouplement.

1.5.6. **Examen macroscopique**

Juste après le sacrifice ou la mort si celle-ci survient en cours d'étude, tous les animaux parents (P et F1), tous les petits qui présentent des anomalies externes ou des signes cliniques, ainsi qu'un petit/un sexe/une portée choisi(e) au hasard dans chaque génération (F1 et F2) sont soumis à un examen macroscopique destiné à révéler d'éventuels changements pathologiques ou anomalies structurelles. L'examen des organes reproducteurs doit faire l'objet d'une attention particulière. Il y a lieu d'examiner les petits moribonds qui ont été euthanasiés ainsi que les petits morts, s'ils ne sont pas macérés, afin de détecter d'éventuelles anomalies et/ou établir la cause de la mort, et de les conserver.

On examinera les utérus de toutes les femelles primipares, sans compromettre l'évaluation histopathologique, pour voir s'ils présentent des points d'implantation et les dénombrer.

1.5.7. **Pesée des organes**

Juste après le sacrifice, on détermine le poids corporel de tous les parents P et F1 ainsi que le poids des organes suivants (les deux exemplaire des organes qui vont par paires doivent être pesés séparément):

— utérus, ovaires,

— testicules, épididymes (entiers et queues),

— prostate,

— vésicules séminales avec glandes coagulantes et leurs liquides, et prostate (ensemble),

— cerveau, foie, reins, rate, hypophyse, glande thyroïde, glandes surrénales et organes cibles connus.

Les poids corporels des petits F1 et F2 retenus pour l'autopsie sont déterminés après le sacrifice, de même que le poids du cerveau, de la rate et du thymus d'un petit/un sexe/une portée choisi(e) au hasard (voir paragraphe 1.5.6).

▼B

Si possible, les résultats de l'autopsie et de la pesée des organes doivent être interprétés à la lumière des observations effectuées dans d'autres études à doses répétées.

1.5.8. **Histopathologie**

1.5.8.1. *Animaux parents*

Les organes et tissus ci-après des animaux parents (P et F1), ou des échantillons représentatifs de ces derniers, sont fixés et conservés dans un milieu approprié en vue de l'examen histopathologique.

— vagin, utérus avec col, et ovaires (conservés dans un fixateur approprié),

— un testicule (conservé dans un fixateur approprié), un épididyme, les vésicules séminales, la prostate et une glande coagulante,

— organe(s) cible(s) précédemment identifié(s) de tous les animaux P et F1 sélectionnés pour l'accouplement.

Tous les animaux P et F1 du groupe témoin et du groupe traité à la dose la plus élevée, qui ont été sélectionnés pour l'accouplement, doivent faire l'objet d'un examen histopathologique complet des organes et tissus susmentionnés. L'examen des ovaires des femelles P est facultatif. Il convient également d'examiner les organes présentant des altérations liées au traitement dans les groupes traités à la dose la plus faible et à la dose intermédiaire, afin de faciliter la détermination de la DSET. De plus, une évaluation histopathologique sera pratiquée sur les organes reproducteurs des animaux traités aux doses faibles et moyennes, chez lesquels on soupçonne une diminution de la fertilité, par exemple, ceux qui ne se sont pas accouplés, qui n'ont pas conçu, n'ont pas engendré ou n'ont pas donné naissance à des descendants sains, ou ceux chez qui on a constaté des modifications du cycle œstral ou du nombre, de la motilité ou de la morphologie des spermatozoïdes. Toutes les lésions macroscopiques telles qu'atrophies ou tumeurs doivent être examinées.

Un examen histopathologique détaillé des testicules doit être effectué (par exemple, fixation dans du liquide de Bouin, inclusion dans la paraffine et coupes transversales de 4-5 μm d'épaisseur) afin de mettre en évidence des effets liés au traitement, notamment une rétention de spermatides, l'absence de certaines couches ou types de cellules germinales, la présence de cellules géantes multinucléées ou le décollement des cellules spermatogènes dans la lumière des tubules séminifères (14). L'examen d'un épididyme intact doit porter sur la tête, le corps et la queue, ce qui peut être effectué sur une section longitudinale. On observera l'épididyme pour voir s'il ne s'y produit pas d'infiltration de leucocytes, de changement dans la fréquence des types cellulaires et de phagocytose des spermatozoïdes, et s'il ne renferme pas de cellules aberrantes. L'examen des organes reproducteurs mâles peut être effectué à l'aide d'une coloration à l'acide périodique-Schiff ou à l'hématoxyline.

Après la lactation, l'ovaire devrait contenir des follicules primordiaux et des follicules en croissance ainsi que les grands corps jaunes de la lactation. L'examen histopathologique doit révéler une déplétion qualitative de la population de follicules primordiaux. Les follicules primordiaux des femelles F1 feront l'objet d'une évaluation quantitative; le nombre d'animaux, le choix de la section ovarienne et la taille des échantillons de sections doivent être statistiquement valables pour la méthode d'évaluation employée. L'examen comprend la numération des follicules primordiaux, lesquels peuvent être combinés à de petits follicules en croissance, aux fins de la comparaison entre les ovaires des femelles traitées et témoins (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2. *Petits sevrés*

Les tissus présentant des anomalies macroscopiques et les organes cibles de tous les petits qui présentent des anomalies externes ou des signes cliniques ainsi que ceux du petit/du sexe/de la portée choisi(e) au hasard dans chaque génération (F1 et F2) et non retenu(e) pour l'accouplement seront fixés et conservés dans un milieu approprié en vue de l'examen histopathologique. La description histopathologique complète des tissus conservés sera plus particulièrement axée sur les organes reproducteurs.

2. **RÉSULTATS**

2.1 TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Les résultats obtenus sur chaque animal seront consignés et résumés sous forme de tableaux, reprenant pour chaque groupe d'essai et chaque génération, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux morts durant l'essai ou euthanasiés, la date de la mort ou de l'euthanasie, le nombre d'animaux fertiles, le nombre de femelles gravides, le nombre d'animaux manifestant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés, notamment le moment où ils ont débuté, leur durée et leur gravité, les types d'altérations histopathologiques et toutes les données pertinentes sur la portée.

Les résultats numériques seront évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et reconnue; le choix des méthodes statistiques doit intervenir lors de la conception de l'étude et doit être justifié. Les modèles statistiques s'appliquant aux relations «dose-effet» peuvent être utiles à l'analyse des résultats. Le rapport doit fournir suffisamment d'informations sur la méthode d'analyse et le logiciel employés, pour qu'un réviseur ou un statisticien indépendant puisse réévaluer et reconstruire l'analyse.

2.2 ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Les résultats de cette étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations doivent être évalués en fonction des effets observés, notamment à l'autopsie et lors des examens microscopiques. L'évaluation portera sur la relation, ou l'absence de relation, entre la dose administrée de substance d'essai et la présence, la fréquence et la gravité des anomalies, notamment lésions macroscopiques, organes cibles identifiés, altération de la fertilité, anomalies cliniques, altération de la capacité de reproduction et des performances de la portée, modifications du poids corporel, effets sur la mortalité et tout autre effet toxique. Les propriétés physicochimiques de la substance d'essai et, le cas échéant, les données toxicocinétiques doivent être prises en considération lors de l'évaluation des résultats.

Une étude de toxicité pour la reproduction correctement menée doit fournir une estimation satisfaisante de la dose sans effet et permettre de comprendre les effets nocifs de la substance étudiée sur la reproduction, là parturition, l'allaitement et le développement postnatal, notamment la croissance et la maturation sexuelle.

▼B

2.3 INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Une étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations fournit des informations sur les effets d'une l'exposition répétée à une substance durant toutes les phases du cycle de reproduction. L'étude livre notamment des informations sur les paramètres de la reproduction ainsi que sur le développement, la croissance et la survie des descendants. Les résultats de l'étude doivent être interprétés à la lumière des résultats des études subchroniques, prénatales, de développement, toxicocinétiques et autres disponibles. Les résultats de la présente étude peuvent servir à apprécier la nécessité de réaliser d'autres essais sur une substance chimique. L'extrapolation des résultats de l'étude à l'homme présente un intérêt limité. Ces résultats se prêtent davantage à la détermination des concentrations sans effet et des niveaux d'exposition humaine acceptables (20) (21) (22) (23).

3. **RAPPORT**

3.1 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport doit contenir les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques

— identification

— degré de pureté

Véhicule, le cas échéant:

— justification du choix du véhicule s'il diffère de l'eau

Animaux d'expérience:

— espèce et souche

— nombre, âge et sexe des animaux

— origine, conditions d'encagement, régime alimentaire, matériaux de nidification, etc.

— poids de chaque animal au début de l'essai

Conditions d'essai:

— justification du choix des doses

— détails concernant la formulation de la substance d'essai/son incorporation aux aliments, la concentration obtenue

— stabilité et homogénéité de la préparation;

— détails concernant l'administration de la substance d'essai;

— conversion de la concentration de la substance d'essai (ppm) dans la nourriture ou l'eau de boisson en dose administrée (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu;

— détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

▼B

Résultats:

— consommation de nourriture, et d'eau si elle a été enregistrée, efficacité alimentaire (gain de poids corporel par gramme d'aliments consommés), et consommation de la substance d'essai par les animaux P et F1, sauf pendant la cohabitation et durant au moins le dernier tiers de la période d'allaitement;

— données sur l'absorption, le cas échéant;

— poids corporel des animaux P et F1 sélectionnés pour l'accouplement;

— données relatives aux portées et au poids des petits;

— poids corporel au moment du sacrifice et poids absolu et relatif des organes des animaux parents

— nature, gravité et durée des signes cliniques (qu'ils soient réversibles ou non);

— date de mort en cours d'étude ou animaux ayant survécu jusqu'au sacrifice;

— manifestation de la toxicité par sexe et par dose, y compris indices d'accouplement, de fécondité, de gestation, de natalité, de viabilité et d'allaitement; le rapport doit mentionner les chiffres ayant servi au calcul de ces indices;

— effets toxiques ou autres sur la reproduction, la descendance, la croissance postnatale, etc.;

— observations à l'autopsie;

— description détaillée de toutes les observations histopathologiques;

— nombre de femelles P et F1 ayant un cycle normal et durée du cycle;

— nombre total de spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme, pourcentage de spermatozoïdes progressivement mobiles, pourcentage de spermatozoïdes à morphologie normale et pourcentage de spermatozoïdes par anomalie identifiée;

— temps écoulé jusqu'à l'accouplement, exprimé en nombre de jours;

— durée de la gestation;

— nombre d'implantations, de corps jaunes, taille de la portée;

— nombre de naissances vivantes et de pertes postimplantatoires;

— nombre de petits affectés d'anomalies macroscopiques; nombre de rabougris s'il a été déterminé;

— paramètres physiques évalués sur les petits et autres données sur le développement postnatal; il y a lieu de justifier les paramètres physiques évalués;

— observations fonctionnelles réalisées sur les petits et sur les adultes, suivant le cas;

— traitement statistique des résultats, le cas échéant.

▼B

Discussion

Conclusions, y compris valeurs de la DSET pour les effets sur la mère et sur les petits.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.

(4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39 44

(5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog:a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237- 244.

(6) Chapin, R.E. et al, (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In Vitro Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologie Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology*, Part A., Academie, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologie and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401-415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility, Journal of Andrology 8:330-337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints pf Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491-505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379-383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36. **TOXICOCINÉTIQUE**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 417 (2010) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les études portant sur la toxicocinétique d'une substance chimique d'essai ont pour objet de fournir des informations adéquates sur l'absorption, la distribution, la biotransformation (c'est-à-dire le métabolisme) et l'excrétion de cette substance, de faciliter l'établissement d'une relation entre la concentration ou la dose et la toxicité observée, et d'aider à comprendre le mécanisme de toxicité. La toxicocinétique peut aider à comprendre les études de toxicologie en démontrant que l'exposition des animaux d'expérience à la substance d'essai est de nature systémique, et en révélant quels sont les éléments circulants (substance mère/métabolites). Les principaux paramètres toxicocinétiques tirés de ces études fourniront également des renseignements sur le potentiel d'accumulation de la substance d'essai dans les tissus et/ou organes, et sur le risque d'induction d'une biotransformation sous l'effet d'une exposition à cette substance.

2. Les données toxicocinétiques peuvent aider à évaluer l'adéquation et la pertinence des données de toxicité animale, à des fins d'extrapolation des dangers pour l'homme et/ou d'évaluation des risques. De plus, les études de toxicocinétique peuvent apporter des informations utiles pour déterminer les doses à utiliser dans les études de toxicité (cinétique linéaire vs non linéaire), et les effets liés à la voie d'administration, la biodisponibilité et autres aspects relatifs à la conception de l'étude. Certains types de données toxicocinétiques peuvent servir à élaborer des modèles toxicocinétiques à base physiologique (TCBP).

3. Les données sur la toxicocinétique et le métabolisme présentent de l'intérêt à plusieurs titres. Elles peuvent notamment indiquer les toxicités et modes d'action éventuels, ainsi que leur relation aux doses et à la voie d'exposition. En outre, les données sur le métabolisme peuvent apporter des informations utiles pour évaluer l'importance, sur le plan toxicologique, de l'exposition à des métabolites exogènes de la substance d'essai.

4. Des données toxicocinétiques adéquates aideront à confirmer l'acceptabilité et l'applicabilité des méthodes fondées sur les relations quantitatives structure-activité, les prévisions à partir de données croisées sur de substances analogues ou le regroupement des substances pour évaluer la sécurité des substances chimiques. Les données de cinétique peuvent aussi servir à évaluer la pertinence toxicologique d'autres études (par exemple in vivo/in vitro).

5. Sauf mention contraire (voir en particulier les paragraphes 74 à 78), la présente méthode d'essai suppose l'administration orale de la substance d'essai.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

6. Les régimes réglementaires ont des exigences et des besoins différents quant aux effets et paramètres toxicocinétiques à mesurer pour différentes classes de produits chimiques (par exemple pesticides, biocides, produits industriels). Contrairement à la plupart des autres, la présente méthode d'essai décrit des essais de toxicocinétique impliquant des mesures et des effets observés multiples. À l'avenir, plusieurs nouvelles méthodes d'essai et/ou document(s) d'orientation pourraient être élaborés pour décrire séparément et plus en détail chaque effet mesuré. Dans le cas de la présente méthode d'essai, ce sont les exigences et/ou besoins de chaque dispositif réglementaire qui déterminent les essais ou l'évaluation à mettre en œuvre.

▼M4

7. De nombreuses études peuvent être réalisées pour évaluer à des fins réglementaires le comportement toxicocinétique d'une substance d'essai. Néanmoins, en fonction des besoins ou des situations réglementaires particulières, toutes ces études ne sont pas nécessaires à l'évaluation d'un produit. Dans la conduite des études de toxicocinétique, il faut faire preuve de souplesse et prendre en considération les caractéristiques de la substance d'essai. Dans certains cas, l'étude d'une série précise de questions peut suffire à cerner les dangers et les risques associés à la substance d'essai. Parfois, les données toxicocinétiques peuvent être collectées dans le cadre d'une évaluation relevant d'autres études toxicologiques. Dans d'autres cas, il peut être nécessaire de réaliser des études de toxicocinétique supplémentaires et/ou plus approfondies, si la réglementation en vigueur l'exige et/ou lorsque l'évaluation de la substance d'essai soulève de nouvelles interrogations.

8. Avant de lancer une étude, et pour en améliorer la qualité et éviter une utilisation non nécessaire d'animaux, le laboratoire d'essai prend en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai et sur ses métabolites et analogues pertinents. Parmi ces informations pourront figurer des données obtenues grâce à d'autres méthodes d'essai appropriées (études in vivo, in vitro, et/ou évaluations in silico). Les propriétés physico-chimiques, comme le coefficient de partage octanol-eau (log P_{OE}), le pKa, l'hydrosolubilité, la pression de vapeur et le poids moléculaire d'un produit chimique, peuvent être utiles pour planifier l'étude et interpréter ses résultats. Les méthodes décrites à cet effet dans les différentes méthodes d'essai permettront de les déterminer

LIMITATIONS

9. La présente méthode d'essai ne vise pas les cas particuliers, comme les femelles gravides ou en lactation et leur progéniture, ni l'évaluation de la présence éventuelle de résidus chez des animaux exposés servant à l'alimentation. Néanmoins, les données obtenues à l'issue d'une étude menée selon la méthode B.36 peuvent fournir des informations susceptibles d'orienter la conception d'études spécifiques sur ces sujets. La présente méthode d'essai n'est pas destinée aux essais de nanomatériaux. L'examen préliminaire des Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques en vue d'évaluer leur applicabilité aux nanomatériaux indique en effet que la ligne directrice 417 (équivalente à la présente méthode d'essai) peut ne pas s'appliquer à ces derniers (1).

DÉFINITIONS

10. Les définitions utilisées aux fins de la présente méthode d'essai figurent en appendice.

CONSIDÉRATIONS RELATIVES AU BIEN-ÊTRE DES ANIMAUX

11. On trouvera dans le document d'orientation de l'OCDE n° 19 (2) des indications concernant le traitement éthiquement acceptable des animaux. La consultation de ce document est recommandée pour toutes les études in vivo et in vitro décrites dans la présente méthode d'essai.

DESCRIPTION DES MÉTHODES

Études pilotes

12. Pour le choix des paramètres expérimentaux s'appliquant aux études de toxicocinétique (par exemple métabolisme, bilan massique, protocoles analytiques, dosage, exhalation de CO_2, etc.), il est recommandé et conseillé de recourir à des études pilotes. La caractérisation de ces paramètres ne nécessite pas systématiquement l'emploi de substances radiomarquées.

▼M4

Sélection des animaux

Espèces

13. Les espèces (et souches) animales utilisées pour les essais de toxicocinétique sont de préférence les mêmes que celles employées dans d'autres études toxicologiques réalisées avec la substance d'essai concernée. C'est normalement le rat qui est retenu, puisque les études toxicologiques l'utilisent massivement. Le recours à d'autres espèces, à la place ou en complément, est légitime si des études toxicologiques majeures indiquent des effets toxiques significatifs sur ces espèces, ou s'il est démontré que le comportement de ces dernières en termes de toxicité/toxicocinétique est plus pertinent pour l'homme. Il conviendra de justifier le choix de l'espèce animale et de la souche.

14. Sauf mention contraire, la présente méthode d'essai suppose le rat comme espèce d'essai. Certains aspects de cette méthode d'essai pourraient devoir être modifiés en cas de recours à une autre espèce.

Âge et souche

15. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes en bonne santé, âgés normalement de 6 à 12 semaines au moment de l'administration de la dose (voir également les paragraphes 13 et 14). L'utilisation d'animaux autres que des jeunes adultes fait l'objet de justification. Tous les animaux ont à peu près le même âge au début de l'étude. Les écarts de poids entre individus ne dépassent pas ± 20 % du poids moyen du groupe d'essai. Idéalement, la souche utilisée est la même que celle employée pour constituer la base de données toxicologiques concernant la substance d'essai.

Nombre et sexe des animaux

16. Pour chaque dose testée, au minimum quatre animaux de même sexe sont utilisés. Il convient de justifier le sexe des animaux employés. L'utilisation d'animaux des deux sexes (quatre mâles et quatre femelles) est envisagée s'il existe des éléments attestant de différences de toxicité notables en fonction du sexe.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

17. Les animaux sont en général placés dans des cages individuelles pendant la période d'essai. L'encagement collectif se justifie dans des circonstances particulières. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. La température de l'animalerie d'expérience est de 22 °C (± 3 °C) et l'humidité relative de 30 à 70 %. L'alimentation pourra comporter une nourriture classique de laboratoire et de l'eau à satiété.

Substance d'essai

18. Une substance d'essai radiomarquée au ^{14}C est utilisée pour tous les aspects de l'étude concernant le bilan massique et l'identification des métabolites; néanmoins, s'il peut être démontré:

— qu'il est possible d'évaluer correctement le bilan massique et de procéder à l'identification des métabolites à l'aide d'une substance d'essai non marquée, et

— que la spécificité et la sensibilité analytiques de la méthode utilisant une substance d'essai non radioactive sont égales ou supérieures à celles qu'on obtiendrait avec une substance radiomarquée,

▼M4

alors il n'est pas nécessaire de recourir à une substance d'essai radiomarquée. Par ailleurs, d'autres isotopes radioactifs et stables peuvent être employés, en particulier si l'élément en question cause la toxicité ou fait partie de la portion toxique de la substance d'essai. Si possible, le marqueur radioactif se situe dans une portion centrale métaboliquement stable (c'est-à-dire qui n'est pas échangeable, n'est pas éliminée par métabolisme sous forme de CO_2, et n'est pas incorporée dans l'ensemble des radicaux monocarbonés de l'organisme) de la molécule. Le marquage de sites multiples ou de régions spécifiques de la molécule peut être nécessaire pour suivre le devenir métabolique de la substance d'essai.

19. Les substances d'essai radiomarquées et non radiomarquées sont analysées à l'aide de méthodes appropriées permettant d'établir leur pureté et leur identité. La radiopureté de la substance d'essai radioactive est la meilleure qu'on puisse obtenir pour une substance donnée (dans l'idéal, elle est supérieure à 95 %) et un effort raisonnable est fourni pour identifier les impuretés présentes à hauteur de 2 % ou plus. La pureté ainsi que l'identité et la proportion des éventuelles impuretés identifiées sont incluses dans le rapport d'essai. Certains programmes réglementaires peuvent choisir de fournir des orientations supplémentaires pour aider à définir et à spécifier les substances d'essai composées de mélanges, ainsi que les méthodes de détermination de la pureté.

Choix des doses

Étude pilote

20. Le plus souvent, une dose orale unique suffit pour l'étude pilote. La dose est non toxique, mais suffisamment élevée pour permettre l'identification des métabolites dans les excréta (et, le cas échéant, dans le plasma), ainsi que pour remplir l'objectif assigné à l'étude pilote au paragraphe 12 de la présente méthode d'essai.

Études principales

21. Pour les études principales, il est préférable d'administrer un minimum de deux doses, car les informations réunies à partir d'au moins deux groupes de dose peuvent faciliter la détermination des doses pour d'autres études de toxicité, ainsi que l'évaluation de la relation dose-effet d'essais de toxicité déjà disponibles.

22. Lorsque deux doses sont administrées, elles sont toutes deux suffisamment élevées pour permettre l'identification des métabolites dans les excréta (et, le cas échéant, dans le plasma). Les informations tirées des études de toxicité disponibles sont prises en compte pour le dosage. Si l'on ne dispose pas d'informations (provenant, par exemple, d'études de toxicité orale aiguë indiquant des signes cliniques de toxicité, ou d'études de toxicité par doses répétées), on peut envisager pour la dose la plus élevée une valeur inférieure à l'estimation de la DL_{50} (voies orale et cutanée) ou de la CL_{50} (voie par inhalation), ou inférieure à la valeur basse de la plage des estimations de toxicité aiguë. La dose la plus faible correspondra à une fraction de la dose la plus élevée.

23. Si un seul dosage est utilisé, la dose est idéalement suffisamment élevée pour permettre l'identification des métabolites dans les excréta (et, le cas échéant, dans le plasma), sans pour autant produire de toxicité apparente. Il convient de justifier la décision de ne pas inclure un second niveau de dose.

24. Si l'on a besoin de déterminer l'effet de la dose sur les processus cinétiques, deux doses peuvent ne pas suffire et il convient qu'au moins une dose soit assez élevée pour saturer ces processus. Si l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps [*area under the plasma concentration- time curve*] (AUC) ne varie pas de façon linéaire entre deux niveaux de dose utilisés dans l'étude principale, on peut en déduire que la saturation d'un ou de plusieurs des processus cinétiques s'opère quelque part entre ces deux niveaux de dose.

▼M4

25. Pour les substances d'essai faiblement toxiques, il convient d'employer une dose maximale de 1 000 mg/kg de poids corporel (voies orale et cutanée) – si l'administration se fait par inhalation, se référer au chapitre B.2 de la présente annexe; généralement la dose n'excédera pas 2 mg/l. Des considérations spécifiques au produit peuvent rendre nécessaire une dose supérieure, en fonction des besoins réglementaires. Le choix des doses fait toujours l'objet d'une justification.

26. Les données relatives à la toxicocinétique ou à la distribution tissulaire fondées sur une dose unique peuvent convenir pour déterminer le potentiel d'accumulation et/ou de persistance. Néanmoins, dans certaines circonstances, l'administration de doses répétées peut être nécessaire i) pour mieux évaluer le potentiel d'accumulation et/ou de persistance, ou l'évolution des paramètres toxicocinétiques (par exemple induction et inhibition enzymatiques), ou ii) pour répondre aux exigences du dispositif réglementaire en vigueur. Dans les études à doses répétées, si l'administration de doses faibles suffit généralement, il peut parfois s'avérer nécessaire d'administrer des doses élevées (voir également le paragraphe 57).

Administration de la substance d'essai

27. La substance d'essai est dissoute ou mise en suspension homogène dans le même véhicule que celui employé pour les autres études de toxicité par gavage oral réalisées avec la substance d'essai, si des informations sont disponibles à ce sujet. Le choix du véhicule fait l'objet d'une justification. Le choix du véhicule et le volume de dosage sont pris en compte lors de la conception de l'étude. La méthode d'administration classique est le gavage; néanmoins, l'administration de la substance dans une capsule de gélatine ou mélangée à la nourriture peut être avantageuse dans certaines situations (dans les deux cas, le choix fait l'objet d'une justification). Il convient en outre de vérifier la dose effectivement administrée à chaque animal.

28. Le volume maximal de liquide à administrer par gavage oral en une seule fois dépend de la taille des animaux d'expérience, du type de véhicule de dosage, et de la suppression ou du maintien de la nourriture avant l'administration de la substance d'essai. La décision de maintenir ou de restreindre l'alimentation avant l'administration de la dose fait l'objet d'une justification. Normalement, le volume est aussi faible que possible, que le véhicule employé soit aqueux ou non. Pour les rongeurs, le volume de dose ne dépasse pas normalement 10 ml/kg de poids corporel. Dans le cas de substances d'essai plus lipophiles, les volumes de véhicule utilisés peuvent être de 4 ml/kg de poids corporel ou plus. En cas de doses répétées, si le jeûne quotidien est contre-indiqué, il faut envisager des volumes de dose plus faibles (par exemple de 2 à 4 ml/kg de poids corporel). Si possible, l'utilisation de volumes de dose en accord avec ceux utilisés pour la substance d'essai dans des études orales par gavage est envisagée.

29. L'administration de la substance d'essai en intraveineuse (IV) et sa mesure dans le sang et/ou les excréta peuvent servir à déterminer la biodisponibilité ou l'absorption orale relative. Pour ce type d'étude, une dose unique de la substance d'essai (généralement équivalente, mais non supérieure, à la dose orale la plus faible – voir «Choix des doses») est administrée à l'aide d'un véhicule approprié. Cette dose est administrée dans un volume idoine (par exemple 1 ml/kg de poids corporel) et au site choisi, à au moins quatre animaux du sexe approprié (des animaux des deux sexes peuvent être employés s'il y a lieu, voir paragraphe 16). L'administration intraveineuse de la substance d'essai suppose de préparer une dose intégralement dissoute ou mise en suspension. On fera en sorte que le véhicule choisi pour cette administration n'interfère pas avec le flux sanguin ou l'intégrité des cellules

▼M4

sanguines. Si la substance d'essai est perfusée, la vitesse de perfusion est consignée et normalisée pour tous les animaux, à condition qu'une pompe à perfusion soit utilisée. Il convient de recourir à l'anesthésie en cas de canulation de la veine jugulaire (pour administrer la substance d'essai et/ou faire un prélèvement sanguin) ou si l'on utilise l'artère fémorale pour l'administration. Le type d'anesthésie est mûrement réfléchi, car il peut avoir des conséquences toxicocinétiques. Les animaux doivent pouvoir se rétablir avant que la substance d'essai et le véhicule leur soient injectés.

30. D'autres voies d'administration, comme la voie cutanée et l'inhalation (voir paragraphes 74 à 78) peuvent également convenir pour certaines substances d'essai, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et des conditions d'utilisation ou de la voie d'exposition humaine prévisibles.

Mesures

Bilan massique

31. Le bilan massique est déterminé par la somme du pourcentage de la dose (radioactive) administrée excrétés dans l'urine, les fèces et l'air expiré, et du pourcentage présent dans les tissus, la carcasse résiduelle, et le liquide de lavage de la cage (voir paragraphe 46). En général, une récupération totale de plus de 90 % de la substance d'essai (radioactivité) administrée est considérée comme satisfaisante.

Absorption

32. Une estimation initiale de l'absorption peut être réalisée en excluant du bilan massique le pourcentage de la dose retrouvé dans le tractus gastro-intestinal et/ou dans les fèces. Pour le calcul du pourcentage d'absorption, voir le paragraphe 33. Pour l'analyse des excréta, voir les paragraphes 44 à 49. Si l'importance exacte de l'absorption faisant suite à l'administration d'une dose orale ne peut être établie à partir des études de bilan massique (par exemple, lorsque plus de 20 % de la dose administrée est présente dans les fèces), des explorations plus poussées peuvent être nécessaires. Elles peuvent comprendre soit 1) l'administration orale de la substance d'essai et la mesure de sa présence dans la bile, soit 2) l'administration orale et intraveineuse de la substance d'essai, et la mesure de la quantité nette de substance présente dans l'urine, plus dans l'air expiré, plus dans la carcasse pour chacune de ces deux voies. Dans les deux cas, la mesure de la radioactivité est utilisée comme méthode de substitution à l'analyse spécifique de la substance d'essai et de ses métabolites.

33. Pour étudier l'excrétion biliaire, on administre généralement la substance d'essai par voie orale. Dans ce type d'étude, les voies biliaires d'au moins quatre animaux du sexe approprié (ou des deux sexes le cas échéant) sont canulées et une dose unique de la substance d'essai est administrée. Après l'administration, il convient de surveiller aussi longtemps que nécessaire l'excrétion de radioactivité/substance d'essai dans la bile, afin d'estimer le pourcentage de la dose administrée excrété par cette voie, ce qui peut ensuite servir à calculer l'ampleur de l'absorption orale, de la manière suivante:

$$\text{Pourcentage d'absorption} = \frac{(\text{quantités présentes dans la bile} + \text{l'urine} + \text{l'airexpiré} + \text{la carcasse hors tractus gastro} - \text{intestinal})/\text{quantité administrée}}{\times\ 100}$$

34. Pour certaines classes de substances d'essai, une sécrétion directe de la dose absorbée peut avoir lieu au travers des membranes intestinales. Dans ce cas, la mesure du pourcentage de la dose présent dans les fèces après administration orale chez un rat aux voies biliaires canulées n'est pas jugée représentative de la dose non absorbée. Il est recommandé, si on prévoit une sécrétion intestinale, de calculer le pourcentage de la dose absorbé en estimant l'absorption par comparaison de l'excrétion après administration par voie orale et par voie intraveineuse (rat intact ou à voies biliaires canulées) (voir paragraphe 35). Il est également conseillé, quand la quantification de la sécrétion intestinale est jugée nécessaire, de mesurer l'excrétion chez le rat à voies biliaires canulées après administration intraveineuse de la dose.

▼M4

Biodisponibilité

35. Il est possible de déterminer la biodisponibilité à partir de la cinétique plasmatique/sanguine des groupes oraux et IV, comme décrit aux paragraphes 50 à 52, par une analyse spécifique de la substance d'essai et/ou de son (ses) métabolite(s) pertinent(s), c'est-à-dire sans qu'il soit besoin de recourir à une substance d'essai radiomarquée. Le calcul de la biodisponibilité (F) de la substance d'essai ou de son (ses) métabolite(s) pertinents s'effectue alors comme suit:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dose_{IV}/Dose_{exp})$$

où AUC est l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps et exp la voie d'administration (orale, cutanée ou par inhalation).

36. Afin d'évaluer les risques liés aux effets systémiques, on préfère généralement utiliser la biodisponibilité du composant toxique plutôt que le pourcentage d'absorption pour comparer les concentrations systémiques provenant d'études animales avec des données analogues de surveillance biologique tirées d'études sur l'exposition des travailleurs. La situation peut se complexifier si les doses se situent dans la plage non linéaire, aussi importe-t-il que l'étude de toxicocinétique détermine des doses dans la plage linéaire.

Distribution tissulaire

37. Connaître la distribution tissulaire d'une substance d'essai et/ou de ses métabolites est important pour identifier les tissus cibles, comprendre les mécanismes de toxicité à l'œuvre et obtenir des informations sur le potentiel d'accumulation et de persistance de la substance d'essai et de ses métabolites. Le pourcentage de dose (radioactive) totale dans les tissus et dans la carcasse résiduelle est mesuré au minimum à la fin de l'étude d'excrétion (par exemple normalement 7 jours après le dosage ou moins en fonction du comportement spécifique de la substance d'essai). Lorsque aucune substance d'essai n'est détectée dans les tissus à la fin de l'étude (par exemple parce que la substance peut avoir été éliminée avant la fin de l'étude en raison d'une courte demi-vie), il convient de prendre soin de ne pas mal interpréter les données. Dans ce type de situation, la distribution tissulaire est examinée au moment du pic de concentration plasmatique/sanguine (T_{max}) ou au maximum du taux d'excrétion urinaire de la substance d'essai (et/ou de ses métabolites) selon le cas, (voir paragraphe 38). De plus, il se peut que la collecte de tissues à d'autres moments soit nécessaire pour évaluer la variation de la distribution en fonction du temps (s'il y a lieu), pour aider à établir le bilan massique, et/ou si une autorité compétente l'exige. Parmi les tissus à prélever figurent le foie, la graisse, le tractus gastro-intestinal, le rein, la rate, le sang total, la carcasse résiduelle, les tissus des organes cibles et tout autre tissu potentiellement intéressant pour l'évaluation toxicologique de la substance d'essai, par exemple thyroïde, hématies, organes reproducteurs, peau, œil (en particulier pour les animaux pigmentés). On envisagera d'analyser un plus large éventail de tissus aux mêmes moments afin d'optimiser l'utilisation des animaux et si des études de toxicité chronique ou subchronique mettent en évidence une toxicité pour certains organes cibles. Il convient également de consigner la concentration du résidu (radioactif) et les ratios tissu-plasma (sanguin).

38. Il est possible que l'évaluation de la distribution tissulaire à d'autres moments, tels qu'aux moments du pic de concentration plasmatique/sanguine (par exemple T_{max}) ou au maximum du taux d'excrétion urinaire, obtenue à partir des études de cinétique plasmatique/sanguine ou d'excrétion respectivement, soit aussi nécessaire ou exigée par une autorité compétente. Cette information peut être utile pour comprendre la toxicité et le potentiel d'accumulation et de persistance de la substance d'essai et des métabolites. Le choix des éléments à prélever fait l'objet d'une justification; les prélèvements destinés à être analysés sont généralement les mêmes que ceux énumérés au paragraphe 37.

▼**M4**

39. Pour les études sur la distribution tissulaire, il est possible de quantifier la radioactivité en procédant à la dissection, l'homogénéisation, la combustion et/ou la solubilisation des organes, puis à un comptage par scintillation liquide des résidus piégés. Certaines techniques, actuellement à différents stades de développement, notamment l'autoradiographie quantitative du corps entier et l'autoradiographie microscopique des récepteurs, peuvent s'avérer utiles pour déterminer la distribution d'une substance d'essai dans les organes et/ou les tissus (3) (4).

40. Pour les voies d'administration autres que la voie orale, on prélève et analyse des tissus spécifiques, comme les poumons dans les études par inhalation ou la peau dans les études par voie cutanée. Voir les paragraphes 74 à 78.

Métabolisme

41. On recueille les excréta (et, le cas échéant, le plasma) afin d'identifier et de quantifier la substance d'essai et ses métabolites, non modifiés, selon la méthode indiquée aux paragraphes 44 à 49. Il est acceptable de regrouper les excréta pour faciliter l'identification des métabolites au sein d'un groupe de dose donné. Il est recommandé d'établir le profil des métabolites à chaque période de l'étude. Néanmoins, si l'absence d'échantillons ou de radioactivité empêche de le faire, il est acceptable de regrouper l'urine et les fèces recueillies à différents moments, mais provenant uniquement d'animaux du même sexe ayant reçu la même dose. Des méthodes qualitatives et quantitatives appropriées sont mises en œuvre pour étudier l'urine, les fèces et la radioactivité expirée par les animaux traités, ainsi que la bile, le cas échéant.

42. Un effort raisonnable est fait pour identifier tous les métabolites présents à hauteur de 5 % ou plus de la dose administrée et pour fournir un schéma métabolique de la substance d'essai. Il convient d'identifier les substances d'essai ayant été caractérisées, dans les excréta, comme comprenant 5 % ou plus de la dose administrée. L'identification équivaut à la détermination exacte de la structure des composants. Habituellement, l'identification est réalisée en soumettant simultanément à une chromatographie le métabolite et des étalons connus, en utilisant deux systèmes différents, ou grâce à des techniques à même de fournir une identification structurale positive, par exemple spectrométrie de masse, résonance magnétique nucléaire (RMN), etc. Dans le cas d'une co-chromatographie, il faut éviter d'utiliser des techniques chromatographiques employant la même phase stationnaire avec deux systèmes de solvants différents pour vérifier l'identité de métabolites, car alors les méthodes ne sont pas indépendantes. L'identification par co-chromatographie fait usage de deux systèmes dissemblables, analytiquement indépendants, par exemple une chromatographie sur couche mince (CCM) à phase inversée et une CCM à phase normale, ou une CCM et une chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Du moment que la qualité de la séparation chromatographique est acceptable, aucune confirmation supplémentaire par spectroscopie n'est demandée. Les méthodes qui apportent des informations structurales, telles que la chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse (CG-SM), la chromatographie liquide/spectrométrie de masse (CL-SM), ou la chromatographie liquide/spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) et la spectrométrie par RMN, peuvent également fournir une identification non ambiguë.

43. S'il est impossible d'identifier les métabolites présents à hauteur de 5 % ou plus de la dose administrée, il convient de le justifier ou de l'expliquer dans le rapport final. Il peut être avisé d'identifier les métabolites représentant moins de 5 % de la dose administrée, afin de mieux comprendre la voie métabolique en vue d'évaluer les dangers et/ou les risques liés à la substance d'essai. Une confirmation de la structure de ces métabolites est autant que possible fournie. Pour cela, il pourra être nécessaire d'établir leur profil dans le plasma, le sang ou d'autres tissus.

▼M4

Excrétion

44. Le taux et l'importance de l'excrétion de la dose administrée sont déterminés par la mesure du pourcentage de la dose (radioactive) retrouvé dans l'urine, les fèces et l'air expiré. Ces données aideront également à établir le bilan massique. Les quantités de substance d'essai (radioactivité) éliminées dans l'urine, les fèces et l'air expiré sont évaluées à des intervalles de temps appropriés (voir les paragraphes 47 à 49). Les expériences à doses répétées sont conçues de manière à permettre d'obtenir des données sur l'excrétion, afin de remplir les objectifs définis au paragraphe 26. On pourra ainsi effectuer des comparaisons avec les expériences à dose unique.

45. Si une étude pilote montre que la substance d'essai (radioactivité) n'est pas excrétée en quantités significatives (voir paragraphe 49) dans l'air expiré, il ne sera pas nécessaire de collecter celui-ci dans le cadre de l'étude définitive.

46. Chaque animal est placé, pour la collecte des excréta (urine, fèces et air expiré), dans une unité individuelle d'étude du métabolisme. À la fin de chaque période de collecte (voir paragraphes 47 à 49), ces unités sont rincées à l'aide d'un solvant approprié (lavage de la cage) pour assurer une récupération maximale de la substance d'essai (radioactivité). La collecte des excréta s'achève au bout de 7 jours, ou après récupération, avant ce délai, d'au moins 90 % de la dose administrée.

47. La quantité totale de substance d'essai (radioactivité) dans l'urine est déterminée à deux moments au moins de la première journée de collecte, dont une fois 24 h après l'administration de la dose, puis quotidiennement jusqu'à la fin de l'étude. Il est recommandé de retenir plus de deux points d'échantillonnage pendant la première journée (par exemple, 6 h, 12 h et 24 h après l'administration de la dose). Les résultats des études pilotes sont analysés afin d'obtenir des informations sur les moments de collecte alternatifs ou supplémentaires à mettre en œuvre. Le calendrier de collecte fait l'objet d'une justification.

48. La quantité totale de substance d'essai (radioactivité) dans les fèces est déterminée quotidiennement, 24 h après l'administration de la dose et jusqu'à la fin de l'étude, sauf si les études pilotes suggèrent d'effectuer des prélèvements plus fréquents ou à d'autres moments. Dans ce cas, une justification est fournie.

49. La collecte du CO_2 expiré et d'autres produits volatils peut être interrompue dans une étude donnée quand on retrouve moins de 1 % de la dose administrée dans l'air exhalé pendant 24 h de collecte.

Études en fonction du temps

Cinétique sanguine/plasmatique

50. Ces études visent à estimer les principaux paramètres toxicocinétiques [par exemple C_{max}, T_{max}, demi-vie ($t_{1/2}$), AUC] concernant la substance d'essai. Elles peuvent se mener à dose unique, mais impliquent généralement deux doses ou plus. Le dosage est à définir en fonction de la nature de l'expérience et/ou de la question étudiée. Des données cinétiques peuvent être nécessaires pour résoudre des questions comme la biodisponibilité de la substance d'essai et/ou déterminer l'effet de la dose sur l'élimination (c'est-à-dire pour établir si la saturation de l'élimination dépend ou non de la dose).

51. Pour ce type d'étude, il convient d'utiliser au moins quatre animaux du même sexe par groupe de dose. Le choix du sexe des animaux employés fait l'objet d'une justification. L'utilisation d'animaux des deux sexes (quatre mâles et quatre femelles) est envisagée s'il existe des éléments attestant de différences de toxicité notables en fonction du sexe.

▼M4

52. Après l'administration de la substance d'essai (radiomarquée), il convient de prélever des échantillons de sang sur chaque animal, à des moments et selon une méthode appropriés. Le volume et le nombre des échantillons sanguins prélevés par animal sont susceptibles d'être limités par les effets éventuels de prélèvements répétés sur la santé/la physiologie des animaux et/ou par la sensibilité de la méthode analytique. Les échantillons seront analysés séparément pour chaque animal. Dans certaines circonstances (par exemple caractérisation des métabolites), il peut être nécessaire de regrouper les échantillons prélevés sur plusieurs animaux. Ces échantillons regroupés sont clairement identifiés, et le regroupement fait l'objet d'une explication. Si une substance d'essai radiomarquée est utilisée, il peut y avoir lieu d'analyser la radioactivité totale. Dans ce cas, l'analyse est effectuée dans le sang total et le plasma, ou dans le plasma et les globules rouges, pour permettre de calculer le rapport sang/plasma. Dans d'autres circonstances, il peut être nécessaire de procéder à une étude plus approfondie requérant l'identification du composé parent et/ou de ses métabolites, ou d'évaluer la fixation aux protéines.

Autres études de cinétique tissulaire

53. Ces études ont pour objet d'obtenir des informations sur l'évolution dans le temps afin de répondre à des questions liées notamment au mode d'action toxique, à la bioaccumulation et à la biopersistance en déterminant la concentration de la substance d'essai dans différents tissus. Le choix des tissus et le nombre de points temporels évalués dépendront de l'aspect étudié et de la base de données toxicologiques disponible sur la substance d'essai. Pour concevoir ces études de cinétique tissulaire complémentaires, il convient de tenir compte des informations recueillies décrites aux paragraphes 37 à 40. Ces études peuvent nécessiter un dosage unique ou un dosage répété. La méthode retenue fait l'objet d'une justification détaillée.

54. Des études de cinétique tissulaire complémentaires peuvent être entreprises:

— lorsqu'on constate une demi-vie sanguine allongée, suggérant la possibilité d'une accumulation de la substance d'essai dans différents tissus, ou

— pour voir si un niveau d'état stationnaire a été atteint dans des tissus particuliers (dans des études à doses répétées, par exemple, même quand un niveau d'état stationnaire a apparemment été atteint dans le sang, il peut être utile de s'assurer qu'il en est de même dans les tissus cibles).

55. Pour ce type d'étude en fonction du temps, il convient d'administrer une dose orale appropriée de la substance d'essai à au moins quatre animaux par dose et par point temporel, et de surveiller l'évolution dans le temps de la distribution dans les tissus choisis. À moins qu'une toxicité spécifique liée au sexe ait été observée, on emploiera des animaux d'un seul sexe. La question de savoir si l'analyse doit porter sur la radioactivité totale ou sur la substance mère et/ou ses métabolites dépendra du problème traité. La distribution tissulaire est évaluée à l'aide des techniques appropriées.

Induction/inhibition enzymatique

56. Des études sur les effets possibles de l'induction/inhibition enzymatique ou sur la biotransformation de la substance d'essai concernée peuvent être nécessaires dans l'un ou plusieurs des cas suivants:

1) lorsque des éléments indiquent une relation entre la biotransformation de la substance d'essai et l'augmentation de la toxicité;

2) lorsque les données de toxicité disponibles indiquent une relation non linéaire entre la dose et le métabolisme;

▼M4

3) si les études sur l'identification des métabolites révèlent un métabolite potentiellement toxique qui pourrait être le produit d'une voie enzymatique induite par la substance d'essai;

4) pour expliquer des effets a priori liés à des phénomènes d'induction enzymatique;

5) si l'on observe des modifications toxicologiques importantes dans le profil métabolique de la substance d'essai, dans le cadre d'expériences in vitro ou in vivo menées sur différentes espèces ou dans différentes conditions, il peut être nécessaire de caractériser l'enzyme ou les enzymes impliquées (par exemple, des enzymes de phase I comme les isoenzymes constituant le système des mono-oxygénases à cytochrome P 450, des enzymes de phase II comme les isoenzymes de la sulfotransférase ou de l'uridine diphosphate glucuronosyltransférase, ou tout autre enzyme pertinente). Ces informations peuvent servir à évaluer la pertinence des extrapolations interespèces.

57. Pour évaluer les variations toxicocinétiques liées à la substance d'essai, il convient de mettre en œuvre des protocoles d'étude adéquats, convenablement validés et justifiés. Ces études peuvent par exemple consister à administrer des doses répétées d'une substance d'essai non marquée, puis une dose unique radiomarquée le 14^{e} jour, ou des doses répétées d'une substance d'essai radiomarquée et des échantillonnages les 1er, 7^{e} et 14^{e} jours pour déterminer le profil des métabolites. L'administration de doses répétées d'une substance d'essai radiomarquée peut également fournir des renseignements sur la bioaccumulation (voir paragraphe 26).

MÉTHODES COMPLÉMENTAIRES

58. Outre les expériences in vivo décrites dans la présente méthode d'essai, des méthodes complémentaires peuvent fournir des informations sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou l'élimination d'une substance d'essai chez certaines espèces.

Utilisation d'informations in vitro

59. Plusieurs aspects concernant le métabolisme de la substance d'essai peuvent être étudiés dans le cadre d'études in vitro faisant appel à des systèmes d'essai appropriés. Des hépatocytes fraîchement isolés ou en culture et des fractions subcellulaires (par exemple microsomes et cytosol ou fraction S9) du foie peuvent servir à étudier les métabolites possibles. Le métabolisme local dans l'organe cible, par exemple le poumon, peut être intéressant pour l'évaluation des risques. À cette fin, les fractions microsomales des tissus cibles peuvent être utiles. Les études sur microsomes peuvent permettre de traiter les différences potentielles entre les sexes et selon les stades de la vie, et de caractériser les paramètres enzymatiques (K_m et V_{max}) qui peuvent aider à évaluer la dose-dépendance du métabolisme en lien avec les niveaux d'exposition. En outre, les microsomes peuvent permettre d'identifier les enzymes microsomales impliquées dans le métabolisme de la substance d'essai qui peuvent servir pour l'extrapolation inter-espèces (voir aussi paragraphe 56). On peut également examiner le potentiel d'induction de la biotransformation à l'aide de fractions subcellulaires du foie (par exemple, microsomes et cytosol) d'animaux prétraités par la substance d'essai concernée, par le biais d'études in vitro d'induction sur les hépatocytes, ou à partir de lignées cellulaires spécifiques exprimant des enzymes pertinentes. Dans certaines circonstances et certaines conditions, on peut envisager d'utiliser des fractions subcellulaires provenant de tissus humains, afin de déterminer les éventuelles différences entre espèces en matière de biotransformation. Les résultats d'études in vitro peuvent également servir à l'élaboration de modèles toxicocinétiques à base physiologique (TCBP) (5).

▼M4

60. Les études d'absorption cutanée in vitro peuvent fournir des renseignements supplémentaires pour caractériser l'absorption (6).

61. Des cultures primaires de cellules hépatiques et des coupes de tissus frais peuvent être utilisées pour répondre aux mêmes questions que les microsomes hépatiques. Dans certains cas, il est possible de répondre à certaines questions en utilisant des lignées cellulaires exprimant spécifiquement l'enzyme pertinente ou des lignées cellulaires génétiquement modifiées. Il peut aussi être utile d'étudier l'inhibition et l'induction d'isoenzymes particulières du cytochrome P450 (par exemple CYP1A1, 2E1, 1A2, etc.) et/ou d'enzymes de phase II par le composé parent dans le cadre d'essais in vitro. Les informations obtenues peuvent présenter de l'intérêt pour des composés de structure proche.

Utilisation des données toxicocinétiques provenant d'études de toxicité

62. L'analyse des échantillons de sang, de tissus et/ou d'excréta obtenus au cours d'autres études de toxicité peut fournir des données sur la biodisponibilité, l'évolution de la concentration plasmatique dans le temps (AUC, C_{max}), le potentiel de bioaccumulation, les taux d'élimination et les variations métaboliques et cinétiques liées au sexe ou au stade de vie.

63. Le plan d'étude peut aussi être adapté pour répondre à des questions concernant la saturation de l'absorption, les voies de biotransformation ou d'excrétion à des doses plus élevées, l'emprunt de nouvelles voies métaboliques à des doses plus élevées, ou la limitation des métabolites toxiques à des doses plus élevées.

64. D'autres aspects liés à l'évaluation des dangers peuvent aussi être abordés, notamment:

— la sensibilité en fonction de l'âge, qui dépend de l'état de la barrière hémato-encéphalique, des reins et/ou des capacités de détoxication,

— la sensibilité de certaines sous-populations due à des différences de capacité de biotransformation ou à d'autres différences toxicocinétiques,

— l'ampleur de l'exposition du fœtus par transfert transplacentaire des produits chimiques ou de celle du nouveau-né par le biais de la lactation.

Utilisation de modèles toxicocinétiques

65. Les modèles toxicocinétiques peuvent contribuer à différents aspects de l'évaluation des dangers et des risques, par exemple à la prévision de l'exposition systémique et de la dose délivrée aux tissus internes. En outre, pour aborder des questions particulières portant sur le mode d'action, ces modèles peuvent servir de base à l'extrapolation entre espèces, entre voies d'exposition, entre dosages, et à des fins d'évaluation des risques pour l'homme. Les données utiles à l'élaboration de modèles TCBP pour une substance d'essai sur une espèce quelconque sont 1) les coefficients de partage, 2) les constantes biochimiques et paramètres physiologiques, 3) les paramètres d'absorption des différentes voies d'exposition et 4) les données cinétiques in vivo pour l'évaluation des modèles [par exemple paramètres d'élimination pour les voies d'excrétion pertinentes (> 10 %), K_m et V_{max} pour le métabolisme]. Les données expérimentales utilisées pour élaborer le modèle sont obtenues par des méthodes scientifiquement valables, et les résultats du modèle sont validés. Les paramètres spécifiques à la substance d'essai ou à l'espèce, comme le taux d'absorption, le coefficient de partage sang-tissu et les constantes de vitesse métabolique, sont souvent déterminés pour faciliter l'élaboration de modèles non compartimentaux ou à base physiologique (7).

▼M4

RÉSULTATS ET RAPPORT

66. Il est recommandé de faire figurer une table des matières dans le rapport d'essai.

Corps du rapport

67. Le corps du rapport présente les informations décrites par la présente méthode d'essai, organisées en sections et paragraphes de la manière suivante:

Résumé

68. Cette section du rapport d'étude résume la conception de l'étude et décrit les méthodes utilisées. Elle met également en relief les principaux résultats concernant le bilan massique, la nature et l'importance des métabolites, les résidus tissulaires, le taux d'élimination, le potentiel de bioaccumulation, les différences liées au sexe, etc. Ce résumé est suffisamment détaillé pour permettre une évaluation des résultats.

Introduction

69. Cette section du rapport présente les objectifs de l'étude, les raisons l'ayant motivée et les principes de sa conception, ainsi que les références utiles et un historique permettant de la resituer.

Matériels et méthodes

70. Cette section du rapport décrit en détail toutes les informations pertinentes, notamment:

a) Substance d'essai

Cette sous-section porte sur l'identification de la substance d'essai: nom chimique, structure moléculaire, détermination qualitative et quantitative de sa composition chimique, pureté chimique et, si possible, type et quantité des éventuelles impuretés. Elle comprend également des informations sur les propriétés physico-chimiques de la substance, notamment: état physique, couleur, coefficient de solubilité et/ou de partage brut, stabilité et, éventuellement, corrosivité. Le cas échéant, des informations sont également données sur les isomères. Si la substance d'essai est radiomarquée, cette sous-section renseigne sur le type de radionucléide, la position du marqueur, l'activité spécifique et la pureté radiochimique.

Il convient d'indiquer le type de véhicule, diluant, agent de suspension, émulsifiant ou autre matériau utilisé pour administrer la substance d'essai, ou d'en donner une description.

b) Animaux d'expérience

Cette sous-section renseigne sur les animaux d'expérience, notamment: choix de l'espèce et de la souche et justification de ce choix, âge au début de l'étude, sexe, poids corporel, état de santé et conditions d'élevage.

c) Méthodes

Cette sous-section décrit en détail la conception de l'étude et la méthode utilisée. Elle comprend les éléments suivants:

1) justification des éventuelles modifications apportées à la voie ou aux conditions d'exposition, s'il y a lieu;

▼M4

2) justification du choix des niveaux de dose;

3) description des éventuelles études pilotes utilisées pour la conception expérimentale des études de suivi. Les données à l'appui des études pilotes sont jointes;

4) mode de préparation de la solution administrée et, le cas échéant, type de solvant ou de véhicule;

5) nombre de groupes de traitement et nombre d'animaux par groupe;

6) niveaux et volume des doses (et, si la radioactivité est utilisée, activité spécifique de la dose);

7) voie(s) et méthodes d'administration;

8) fréquence d'administration;

9) période de jeûne (le cas échéant);

10) radioactivité totale par animal;

11) manipulation des animaux;

12) collecte et traitement des échantillons;

13) méthodes d'analyse utilisées pour la séparation, la quantification et l'identification des métabolites;

14) limites de détection des méthodes employées;

15) autres mesures et protocoles expérimentaux utilisés (notamment validation des méthodes d'analyse des métabolites).

d) Analyse statistique

Si on recourt à l'analyse statistique pour dépouiller les résultats de l'étude, il convient d'apporter suffisamment d'informations sur la méthode d'analyse et le logiciel employés pour qu'un examinateur/statisticien indépendant puisse réévaluer et reconstruire l'analyse.

Si on recourt à une modélisation systémique (par exemple à un modèle TCBP), la présentation du modèle employé comporte une description complète du modèle, afin qu'un expert indépendant puisse reconstruire et valider celui-ci (voir le paragraphe 65 et l'appendice des définitions).

Résultats

71. Toutes les données sont récapitulées et présentées sous forme de tableaux accompagnés d'une évaluation statistique appropriée, comme décrit dans la présente section. Les données résultant du comptage de la radioactivité sont récapitulées et présentées de manière appropriée à l'étude, généralement en microgrammes ou milligrammes d'équivalents par masse d'échantillon, mais d'autres unités peuvent être utilisées. Cette section comporte des graphiques illustrant les résultats, reproduit les données chromatographiques et spectrométriques représentatives, identifie/quantifie les métabolites et présente les voies métaboliques proposées, y compris la structure moléculaire des métabolites. En outre, les renseignements suivants figurent, le cas échéant, dans cette section:

1) quantité et pourcentage de récupération de la radioactivité dans l'urine, les fèces, l'air expiré, ainsi que dans l'urine et les fèces récupérées lors du nettoyage de la cage.

— Pour les études par voie cutanée, inclure également les données relatives à la récupération de la substance d'essai sur la peau traitée et lors du nettoyage cutané, les données sur la radioactivité résiduelle présente dans le dispositif couvrant la peau et l'unité d'étude du métabolisme, ainsi que les résultats de l'étude de nettoyage cutané; pour plus de précisions, voir les paragraphes 74 à 77.

▼M4

— Pour les études par inhalation, inclure également des données sur la récupération de la substance d'essai dans les poumons et dans les tissus nasaux (8); pour plus de précisions, voir le paragraphe 78;

2) distribution tissulaire, en pourcentage de la dose administrée et en concentration (microgrammes d'équivalents par gramme de tissu) et ratios tissu/sang et tissu/plasma;

3) bilan-matière élaboré pour chaque étude impliquant l'analyse des tissus et des excréta;

4) concentrations plasmatiques et paramètres toxicocinétiques (biodisponibilité, AUC, C_{max}, T_{max}, élimination, demi-vie) après administration de la substance par la ou les voies d'exposition pertinentes;

5) vitesse et importance de l'absorption de la substance d'essai après administration par la ou les voies d'exposition pertinentes;

6) quantités de substance d'essai et de métabolites (en pourcentage de la dose administrée) collectées dans les excréta;

7) référence aux données présentées en annexe, qui comprennent les données par animal pour tous les critères de mesure (par exemple administration de la dose, pourcentage de récupération, concentrations, paramètres toxicocinétiques, etc.);

8) graphique représentant les voies métaboliques proposées et la structure moléculaire des métabolites.

Discussion et conclusions

72. Dans cette section, il convient pour le ou les auteurs de:

1) proposer une voie métabolique, en s'appuyant sur les résultats concernant le métabolisme et l'élimination de la substance d'essai;

2) examiner les éventuelles différences potentielles liées à l'espèce ou au sexe concernant l'élimination et/ou la biotransformation de la substance d'essai;

3) présenter dans un tableau et examiner l'identité et l'importance des métabolites, les taux d'élimination, le potentiel de bioaccumulation et le niveau des résidus tissulaires de la substance mère et/ou de ses métabolites, ainsi que les éventuelles modifications dose-dépendantes des paramètres toxicocinétiques, s'il y a lieu;

4) intégrer à cette section toute donnée toxicocinétique pertinente obtenue au cours d'études de toxicité;

5) formuler une conclusion succincte pouvant être étayée par les résultats de l'étude;

6) ajouter des sections supplémentaires (si nécessaire ou opportun).

73. Les sections supplémentaires serviront à présenter des informations bibliographiques, tableaux, graphiques, annexes, etc.

▼M4

AUTRES VOIES D'EXPOSITION

Voie cutanée

Traitement cutané

74. Cette section fournit des renseignements spécifiques sur les études de toxicocinétique par voie cutanée. Pour l'absorption cutanée, il convient de consulter le chapitre B.44 [Absorption cutanée: méthode in vivo (9)] de la présente annexe. Pour d'autres effets observés, tels que la distribution et le métabolisme, la présente méthode d'essai B.36 peut être utilisée. Pour le traitement par voie cutanée, on peut utiliser un ou plusieurs niveaux de dose. La substance d'essai (c'est-à-dire la préparation pure, diluée ou le mélange contenant la substance d'essai à appliquer sur la peau) est identique (ou représente un substitut réaliste) aux produits auxquels pourraient être exposés l'homme ou les autres espèces cibles potentielles. Le choix du ou des niveaux de dose s'effectue conformément aux indications des paragraphes 20 à 26 de la présente méthode d'essai. Parmi les facteurs à prendre en considération figurent l'exposition humaine potentielle et/ou les doses auxquelles une toxicité a été observée au cours d'autres études de toxicité cutanée. Si nécessaire, il convient de dissoudre la ou les doses cutanées dans un véhicule adéquat et de les appliquer dans un volume adapté à leur administration. Peu de temps avant l'essai, la fourrure de la région dorsale du tronc des animaux à tester est tondue. Le rasage peut être employé mais il est effectué environ 24 heures avant l'essai. Lorsque la fourrure est rasée ou tondue, cette opération s'effectue en évitant toute lésion de la peau qui pourrait entraîner une modification de sa perméabilité. Environ 10 % de la superficie corporelle sont dégagés pour application de la substance d'essai. Dans le cas de substances d'essai hautement toxiques, la zone couverte peut être plus petite, mais il convient de recouvrir une surface aussi large que possible d'une pellicule mince et uniforme. La surface de traitement utilisée est la même pour tous les groupes d'essai par voie cutanée. Les zones traitées sont recouvertes à l'aide d'une protection adaptée maintenue en place. Les animaux sont encagés séparément.

75. Une étude de nettoyage cutané est menée afin d'évaluer la quantité de la dose appliquée susceptible d'être retirée de la peau lors d'un lavage de la zone traitée au savon doux et à l'eau. Cette étude peut également aider à établir le bilan massique quand la substance d'essai est administrée par voie cutanée. Pour ce type d'étude, il convient d'appliquer une dose unique de la substance d'essai à deux animaux. Le niveau de dose est choisi conformément aux indications du paragraphe 23 de la présente méthode d'essai (voir également le paragraphe 76 à propos du temps de contact avec la peau). La quantité de substance d'essai récupérée lors de ce lavage permet d'évaluer l'efficacité d'élimination de la substance d'essai par la procédure de nettoyage.

76. Sauf si sa corrosivité l'empêche, la substance d'essai est appliquée et maintenue sur la peau pendant un minimum de 6 heures. Une fois la protection retirée, la zone traitée est lavée selon la procédure décrite pour l'étude de nettoyage cutané (voir paragraphe 75). La protection et la solution ayant servi au nettoyage sont analysées à la recherche de résidus de la substance d'essai. À la fin de l'étude, les animaux sont euthanasiés conformément à (2), et la peau traitée est prélevée. Une section appropriée de la peau traitée est analysée pour déterminer la présence résiduelle de la substance d'essai (radioactivité).

77. Pour l'évaluation toxicocinétique des produits pharmaceutiques, des procédures différentes peuvent être nécessaires, en accord avec les dispositions réglementaires.

▼M4

Inhalation

78. Pour ce type d'étude, on utilise une concentration unique de la substance d'essai, ou davantage si nécessaire. Le choix de la ou des concentrations s'effectue conformément aux indications des paragraphes 20 à 26 de la présente méthode d'essai. Les traitements par inhalation seront menés à l'aide d'un appareillage de type «cône nasal» ou «tête seule» pour empêcher l'absorption par d'autres voies d'exposition (8). Si d'autres méthodes d'exposition par inhalation sont retenues, il convient de justifier et de documenter ce choix. La durée d'exposition par inhalation est définie; elle est généralement comprise entre 4 et 6 heures.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) OCDE (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OCDE, Paris.

(2) OCDE (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Évaluation; Environmental Health and Safety Publications, Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000), OCDE, Paris.

(3) Solon E.G., Kraus L. (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.

(4) Stumpf W.E. (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

(5) Loizou G., Spendiff M., Barton H.A., Bessems J., Bois F.Y., d'Yvoire M.B., Buist H., Clewell H.J. 3rd, Meek B., Gundert-Remy U., Goerlitz G., Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.

(6) Chapitre B.45 de la présente annexe, Absorption cutanée: méthode in vitro.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Genèv, Organisation mondiale de la santé, Programme international sur la sécurité des substances chimiques.

(8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(9) Chapitre B.44 de la présente annexe, Absorption cutanée: méthode in vivo.

(10) Barton H.A. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(11) Gibaldi M. and Perrier D., (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Appendice

DÉFINITIONS

Absorption orale: pourcentage de la dose de substance d'essai absorbé à partir du site d'administration (à savoir le tractus gastro-intestinal). Ce paramètre essentiel peut permettre de comprendre quelle proportion de la substance d'essai administrée atteint la veine porte, et par la suite le foie.

Absorption: processus par le(s)quel(s) une substance chimique pénètre dans, ou traverse, des tissus. L'absorption se réfère au composé parent et à tous ses métabolites. À ne pas confondre avec la «biodisponibilité».

Accumulation (bioaccumulation): augmentation dans le temps de la quantité d'une substance d'essai présente dans les tissus (généralement les tissus adipeux, à la suite d'une exposition répétée); si une substance d'essai pénètre dans le corps à une vitesse supérieure à son taux d'élimination, cette substance s'accumule dans l'organisme et peut atteindre des concentrations toxiques.

ADME: acronyme de «Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion».

AUC (aire sous la courbe des concentrations plasmatiques): aire sous la courbe dans un diagramme représentant l'évolution dans le temps de la concentration d'une substance d'essai dans le plasma. Cette aire correspond à la quantité totale de substance d'essai absorbée par le corps pendant une période de temps prédéfinie. Dans des conditions de linéarité, l'AUC (du temps zéro à l'infini) est proportionnelle à la quantité totale de substance d'essai absorbée par le corps, indépendamment du taux d'absorption.

Autoradiographie microscopique des récepteurs (microautoradiographie des récepteurs): cette technique peut servir à étudier l'interaction xénobiotique avec des sites tissulaires ou des populations cellulaires spécifiques, par exemple dans le cadre d'études sur la fixation au récepteur ou le mode d'action spécifique qui peuvent nécessiter une qualité de résolution et de sensibilité impossible à obtenir par d'autres techniques comme l'autoradiographie du corps entier.

Autoradiographie (autoradiographie du corps entier): cette technique, qui sert à déterminer qualitativement et/ou quantitativement la localisation tissulaire d'une substance d'essai radioactive, utilise l'imagerie par rayons X ou, innovation plus récente, l'imagerie numérique par plaque au phosphore pour visualiser les molécules ou fragments de molécules radiomarqués en enregistrant le rayonnement émis au sein de l'objet étudié. Par rapport à la dissection des organes, l'autoradiographie quantitative du corps entier peut présenter des avantages pour évaluer la distribution de la substance d'essai, la récupération globale et la résolution du matériau radioactif dans les tissus. Par exemple, on peut utiliser cette technique sur un modèle animal pigmenté, afin d'évaluer l'association possible de la substance d'essai avec la mélanine, qui peut se lier à certaines molécules. Cependant, tout en offrant un moyen commode de visualiser l'ensemble des sites de fixation de grande capacité et de faible affinité dans le corps entier, cette technique est probablement moins performante pour identifier des sites cibles spécifiques tels que les sites de liaison au récepteur, dont la détection nécessite une résolution et une sensibilité relativement élevées. Lorsqu'on recourt à l'autoradiographie, les expériences visant à déterminer le bilan massique du composé administré sont menées sur un groupe séparé ou dans le cadre d'une étude distincte de l'étude de distribution tissulaire, dans laquelle tous les excréta (qui peuvent inclure également l'air expiré) et toutes les carcasses sont homogénéisés et analysés par comptage à scintillation liquide.

Bilan massique: comptabilité des entrées de la substance d'essai dans le système, et de ses sorties de celui- ci.

Bilan matière: voir «bilan massique».

Bioaccumulation: voir «Accumulation».

▼M4

Biodisponibilité: fraction d'une dose administrée qui atteint la circulation systémique ou est rendue disponible sur le site de l'activité physiologique. Généralement, la biodisponibilité d'une substance d'essai se réfère au composé parent, mais elle peut également se référer à ses métabolites. Elle ne tient compte que d'une seule forme chimique. *Nota bene* biodisponibilité et absorption ne sont pas synonymes. La différence, par exemple, entre l'absorption orale (c'est-à-dire la présence dans la paroi intestinale et la veine porte) et la biodisponibilité (c'est-à-dire la présence dans le sang systémique et dans les tissus) peut, entre autres facteurs, provenir de la dégradation chimique liée au métabolisme de la paroi intestinale, à l'efflux vers la lumière intestinale ou encore au métabolisme présystémique dans le foie (10). La biodisponibilité du composant toxique (composé parent ou métabolite) est un paramètre essentiel, dans l'évaluation des risques pour la santé humaine (extrapolation de dose élevée à faible, extrapolation de voie à voie), pour dériver une valeur interne de la dose sans effet nocif observé (DSENO) ou de la dose de référence (BMD) externes (dose appliquée). Pour étudier les effets sur le foie en cas d'administration orale, l'absorption orale suffit. Néanmoins, pour évaluer tout autre effet que l'effet à la porte d'entrée, la biodisponibilité est généralement un paramètre plus fiable pour l'évaluation des risques.

Biopersistance: voir «Persistance».

Biotransformation: conversion chimique (généralement enzymatique), dans l'organisme, d'une substance d'essai donnée en une autre. Synonyme de «métabolisme».

$\mathbf{C_{max}}$: concentration maximale (pic de concentration) dans le sang (plasma/sérum) après l'administration, ou excrétion maximale (pic d'excrétion) urinaire ou fécale après l'administration.

Coefficient de partage: également appelé coefficient de distribution, il mesure la solubilité différentielle d'une substance chimique dans deux solvants.

Compartiment: portion (ou unité) structurelle ou biochimique d'un corps, d'un tissu ou d'une cellule séparée du reste de ce corps, de ce tissu ou de cette cellule.

Concentration sanguine (plasmatique) à l'état stationnaire: état hors équilibre d'un système ouvert dans lequel toutes les forces agissant sur le système sont exactement contrebalancées par des forces opposées, de sorte que tous les composants du système ont une concentration stationnaire, bien que de la matière s'écoule au travers de ce système.

Concentration sanguine (plasmatique/sérique) maximale: concentration maximale (pic de concentration) dans le sang (plasma/sérum) après l'administration (voir aussi «C_{max}»).

Demi-vie ($\mathbf{t_{1/2}}$): temps nécessaire pour que la concentration de la substance d'essai diminue de moitié dans un compartiment. Elle se réfère généralement à la concentration plasmatique ou à la quantité de substance d'essai présente dans l'ensemble du corps.

Distribution: dispersion d'une substance d'essai et de ses dérivés au travers d'un organisme.

Distribution tissulaire: déplacement réversible d'une substance d'essai d'un endroit du corps à un autre. La distribution tissulaire peut s'étudier par dissection, homogénéisation, combustion et comptage par scintillation liquide des organes ou par autoradiographie qualitative et/ou quantitative du corps entier. La première méthode est utile pour obtenir la concentration et le pourcentage de récupération dans les tissus et la carcasse des mêmes animaux, mais peut avoir une résolution trop faible pour tous les tissus et atteindre une récupération globale inférieure à l'optimum (< 90 %). Voir la définition de l'autoradiographie.

Enzymes/Isoenzymes: protéines qui catalysent des réactions chimiques. Les isoenzymes sont des enzymes qui catalysent des réactions chimiques similaires mais diffèrent par leur séquence d'acides aminés.

Excrétion biliaire: excrétion par les voies biliaires.

▼M4

Excrétion: processus par le(s)quel(s) une substance d'essai administrée et/ou ses métabolites sont éliminés du corps.

Exogène: d'origine extérieure à l'organisme ou au système, ou produit à l'extérieur de lui.

Extrapolation: inférence d'une ou de plusieurs valeurs inconnues à partir de ce qui est connu ou a été observé.

Induction/induction enzymatique: synthèse d'enzymes en réponse à un stimulus environnemental ou à une molécule inductrice.

Linéarité/cinétique linéaire: en cinétique, un processus est linéaire quand tous les taux de transfert entre compartiments sont proportionnels aux quantités ou aux concentrations présentes, c'est-à-dire de premier ordre. En conséquence, les volumes d'élimination et de distribution sont constants, de même que les demi-vies. Les concentrations obtenues sont proportionnelles au taux d'administration (exposition), et l'accumulation est plus aisément prévisible. On peut juger de la linéarité/non-linéarité en comparant les paramètres pertinents, par exemple l'AUC, après administration de différentes doses ou après exposition unique et exposition répétée. L'absence de dose-dépendance peut indiquer la saturation des enzymes participant au métabolisme du composé; une augmentation de l'AUC après exposition répétée par rapport à une exposition unique peut indiquer une inhibition du métabolisme, et une diminution de l'AUC peut signaler une induction du métabolisme [voir aussi (11)].

Mécanisme (mode) de toxicité/d'action: le mécanisme d'action se réfère aux interactions biochimiques spécifiques par lesquelles une substance d'essai produit son effet. Le mode d'action se rapporte aux phénomènes plus généraux conduisant à la toxicité d'une substance d'essai.

Métabolisme: synonyme de «biotransformation».

Métabolites: produits du métabolisme ou des processus métaboliques.

Modélisation systémique (modèle toxicocinétique à base physiologique, à base pharmacocinétique, pharmacocinétique à base physiologique, à base biologique, etc.): modèle abstrait utilisant le langage mathématique pour décrire le comportement d'un système.

Paramètres enzymatiques: K_m, constante de Michaelis et V_{max}, vitesse maximale.

Persistance (biopersistance): présence à long terme d'une substance chimique (dans un système biologique) s'expliquant par sa résistance à la dégradation/l'élimination.

Prévision à partir de données croisées: les informations sur les effets mesurés pour une ou plusieurs substances chimiques sont utilisées pour prédire l'effet observé pour la substance chimique cible.

Saturation: état dans lequel un ou plusieurs processus cinétiques (par exemple, absorption, métabolisme ou élimination) sont à leur maximum (c'est-à-dire «saturés»).

Sensibilité: capacité d'une méthode ou d'un instrument de mesure à distinguer entre des réponses correspondant à différents niveaux d'une variable d'intérêt.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Tissu cible: tissu sur lequel se manifeste un effet indésirable majeur d'une susbtance toxique.

T_{max}: temps nécessaire pour atteindre C_{max}.

▼**M4**

Toxicocinétique (pharmacocinétique): étude de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion des substances chimiques au cours du temps.

Validation des modèles: processus destiné à évaluer si un modèle décrit convenablement les données toxicocinétiques disponibles. Les modèles peuvent être évalués par comparaison statistique ou visuelle de leurs prévisions avec les valeurs expérimentales, en fonction d'une variable indépendante commune (par exemple le temps). L'ampleur de l'évaluation est justifiée en fonction de l'usage escompté du modèle.

Vitesse d'élimination: mesure quantitative de la vitesse à laquelle une substance d'essai est éliminée du sang, du plasma ou d'un tissu donné, par unité de temps.

Voie d'administration (orale, intraveineuse, cutanée, par inhalation, etc.): se rapporte aux moyens par lesquels une substance chimique est administrée dans le corps (par exemple, par gavage oral, oralement mélangée à la nourriture, par voie cutanée, par inhalation, en intraveineuse, etc.).

Voies de détoxication: série d'étapes conduisant à l'élimination des substances chimiques toxiques du corps, que ce soit par transformation métabolique ou par excrétion.

▼B

B.37 NEUROTOXICITÉ RETARDÉE DES SUBSTANCES ORGANOPHOSPORÉES APRÈS EXPOSITION AIGUË

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Lorsqu'on évalue les effets toxiques des substances, il est important d'étudier la capacité qu'ont certaines substances à entraîner certains types de neurotoxicité que les autres études de toxicité pourraient ne pas mettre en évidence. Certains composés organophosphorés ont une neurotoxicité différée et doivent faire l'objet de telles études.

Des essais de dépistage in vitro peuvent être utilisés pour identifier les substances susceptibles d'entraîner une polyneuropathie différée; toutefois, des résultats négatifs à l'issue d'essais in vitro ne suffisent pas à prouver que la substance testée n'est pas neurotoxique.

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Les substances organophosphorées comprennent les esters, thioesters organophosphorés non chargés ou anhydrides des acides organophosphoriques, organophosphoniques ou organophos-phoramidiques ou des acides phosphorothioïques, phosphonothioïques ou phosphorothioamidiques apparentés ou d'autres substances pouvant entraîner la neurotoxicité différée parfois observée pour les substances de cette classe.

La neurotoxicité retardée est un syndrome associé à l'installation prolongée et d'ataxie retardée, associée à des axonopathies distales au niveau de la moelle épinière et des nerfs périphériques, et à une inhibition et un vieillissement de l'estérase caractéristique des neuropathies (neuropathy taret esterase — NTE) dans les tissus nerveux.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Une substance de référence peut être testée sur un lot témoin positif, afin de démontrer que, dans les conditions de l'essai, la réaction de l'espèce testée n'est pas modifiée de façon significative.

Le tri-o-tolyi phosphate est un exemple de produit neurotoxique couramment utilisé [nº CAS 78-30-8, nº EINECS 201-103-5, nomenclature CAS: acide phosphorique, tris(2-méthylphényl)es-ter]; il est également connu sous le nom de tns-o-crésylphosphate.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance à tester est administrée oralement, en une prise unique, à des poules domestiques qui ont été protégées, le cas échéant, contre des effets cholinergiques aigus. Les animaux sont observés pendant 21 jours pour détecter des troubles du comportement, une ataxie et une paralysie. Des analyses biochimiques sont réalisées, en particulier pour mettre en évidence l'inhibition de l'estérase NTE, sur des poules sélectionnées au hasard dans chaque lot, en général 24 et 48 heures après administration. 21 jours après l'exposition, les poules restantes sont sacrifiées et un examen histopathologique est effectué sur des tissus nerveux choisis.

▼B

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.5.1. **Préparation**

De jeunes poules adultes exemptes d'affections virales, ne faisant l'objet d'aucune médication susceptible d'interférer et ne présentant pas de troubles de la démarche sont réparties au hasard en lots d'expérience et lots témoins, et sont acclimatées aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours avant le début de l'étude.

Les cages ou enclos utilisés doivent être suffisamment grands pour que les poules puissent se mouvoir librement et pour que leur démarche puisse être aisément observée.

La substance à tester est généralement administrée oralement, par gavage ou dans des capsules de gélatine, ou par une méthode comparable. Les substances liquides peuvent être administrées directement ou dissoutes dans un véhicule approprié tel que l'huile de maïs; les substances solides doivent si possible être dissoutes car il se peut que d'importantes quantités de solides administrées dans des capsules de gélatine ne soient pas bien absorbées. Si le véhicule est autre que de l'eau, ses caractéristiques toxiques doivent être connues et, dans le cas contraire, déterminées avant le début de l'essai.

1.5.2. **Conditions de l'essai**

1.5.2.1. *Animaux d'expérience*

L'espèce recommandée est la poule pondeuse domestique adulte jeune âgée de 8-12 mois *(Gallus gallus domesticus)*. Il convient d'utiliser des races et souches de taille standard; les poules doivent normalement avoir été élevées dans des conditions leur permettant de se mouvoir librement.

1.5.2.2. *Nombre et sexe*

Outre le lot d'expérience, il faut prévoir un lot témoin recevant le véhicule seul et un lot témoin positif. Le lot recevant le véhicule seul doit être traité de la même façon que le lot d'expérience, exception faite de l'administration de la substance à tester.

Il faut prévoir suffisamment d'animaux dans chaque lot pour que l'on puisse en sacrifier au moins six pour effectuer les déterminations biochimiques (trois à chacun des deux temps de prélèvement) et qu'il en survive six après la période d'observation de 21 jours.

Le lot témoin positif peut être réalisé en parallèle ou provenir d'expériences antérieures récentes. Il doit se composer d'au moins six poules traitées par un produit neurotoxique connu à effet retardé; trois poules seront réservées aux examens biochimiques et trois à la recherche de signes pathologiques. La mise à jour périodique des données historiques recueillies antérieurement est recommandée. De nouveaux lots positifs devront être réalisés si une des conditions essentielles de l'expérience (par exemple souches, alimentation, hébergement) a été modifiée par le laboratoire chargé de l'essai.

▼B

1.5.2.3. *Niveau de doses*

Il convient d'effectuer une étude préliminaire sur un nombre approprié de poules réparties dans des lots traités à différentes doses, afin de déterminer la dose à utiliser pour l'étude principale. Un certain taux de mortalité est inévitable dans cette étude préliminaire. Toutefois, pour éviter la mort consécutive à des effets cholinergiques aigus, il est possible d'utiliser de l'atropine ou un autre agent protecteur ne perturbant pas la réaction neurotoxique différée. Diverses méthodes d'essai peuvent être utilisées pour évaluer la dose non létale maximale d'une substance (voir méthode B.1 *bis)*. Les données recueillies antérieurement sur les poules ou d'autres informations toxicologiques peuvent également être utiles pour déterminer la dose.

La dose utilisée dans l'étude principale doit être aussi élevée que possible, compte tenu des résultats de l'étude préliminaire et de la limite supérieure de 2 000 mg/kg poids corporel. Quel que soit le taux de mortalité, il doit subsister un nombre suffisant d'animaux pour effectuer les analyses biochimiques (six) et l'examen histologique (six) au 21e jour. Il convient d'utiliser de l'atropine ou un autre agent qui ne perturbe pas les réactions neurotoxiques différées, afin d'éviter la mort par effets cholinergiques aigus.

1.5.2.4. *Essai limite*

Lorsqu'un essai réalisé selon le mode opératoire décrit ci-après, à une dose d'au moins 2 000 mg/kg p.c/jour, n'entraîne pas d'effets toxiques observables et que les données relatives aux substances de structure voisine ne laissent pas supposer une toxicité, il n'est pas nécessaire d'effectuer une étude à une dose plus élevée. L'essai limite est applicable, sauf lorsqu'une exposition humaine fait apparaître la nécessité d'utiliser une dose plus élevée.

1.5.2.5. *Période d'observation*

La période d'observation doit s'étendre sur 21 jours.

1.5.3. **Mode opératoire**

Après administration d'un agent protecteur pour éviter que des effets cholinergiques aigus n'entraînent la mort, la substance à tester est administrée en une prise unique.

1.5.3.1. *Observation générale*

L'observation doit débuter immédiatement après l'exposition. Toutes les poules sont observées soigneusement plusieurs fois au cours des deux premiers jours, puis au moins une fois par jour, pendant 21 jours ou jusqu'à la date prévue du sacrifice. Tous les signes de toxicité doivent être notés, ainsi que la date d'apparition des troubles du comportement, leur type, leur gravité et leur durée. L'ataxie doit être mesurée à l'aide d'une échelle d'évaluation ordinale comportant au moins quatre niveaux; la paralysie doit être notée. Au moins deux fois par semaine, les poules destinées à la recherche des signes pathologiques doivent être sorties de leurs cages et soumises à une épreuve d'activité motrice forcée, d'escalade d'échelles par exemple, afin de faciliter l'observation de faibles manifestations de toxicité. Les animaux moribonds ou présentant des signes de détresse ou de souffrance intense doivent être immédiatement retirés de l'étude, euthanasiés et autopsiés.

▼B

1.5.3.2. *Poids corporel*

Toutes les poules sont pesées juste avant l'administration de la substance, et au moins une fois par semaine par la suite.

1.5.3.3. *Biochimie*

Six poules choisies au hasard dans chacun des lots d'expérience et des lots témoins négatifs, ainsi que trois poules prélevées dans le lot témoin positif (si l'essai est réalisé en parallèle sur ce dernier) sont sacrifiées quelques jours après administration; le cerveau et la moelle épinière lombaire sont préparés et analysés pour détecter l'inhibition de l'estérase caractéristique des neuropathies. Il peut en outre s'avérer utile d'analyser l'inhibition de cette estérase sur du nerf sciatique. En règle générale, trois poules du lot témoin et de chaque lot d'expérience sont sacrifiées après 24 heures et trois autres après 48 heures, tandis que les trois poules du lot témoin positif sont sacrifiées après 24 heures. Si l'observation des signes cliniques d'intoxication (souvent estimés par le moment d'apparition des effets cholinergiques) indique que la substance toxique est éliminée très lentement, il peut s'avérer préférable de prélever les tissus sur trois poules à deux autres temps compris entre 24 heures et au plus tard 72 heures après administration.

S'il y a lieu, il est également possible d'effectuer des déterminations de l'acétylcholinestérase (AChE) sur des échantillons. Toutefois, il peut y avoir réactivation spontanée de l'acétylcholinestérase in vivo, ce qui pourrait faire sous-estimer l'activité de la substance en tant qu'inhibiteur de l'AChE.

1.5.3.4. *Autopsie*

L'autopsie de tous les animaux (sacrifices prévus ou exigés par l'état de l'animal) doit comporter un examen de l'aspect du cerveau et de la moelle épinière.

1.5.3.5. *Examen histopathologique*

Les tissus nerveux des animaux survivants après la période d'observation et non utilisés pour les études biochimiques doivent faire l'objet d'un examen microscopique. Les tissus doivent être fixés in situ par des techniques de perfusion. Les coupes doivent être pratiquées au niveau du cervelet (plan longitudinal moyen), du bulbe rachidien, de la moelle épinière et des nerfs périphériques. Les coupes de la moelle épinière seront pratiquées dans la partie cervicale supérieure, dans la région thoracique moyenne et dans la région lombo-sacrée. Des coupes devront également être réalisées dans la partie distale du nerf tibial et au niveau de ses ramifications vers les muscles gastroenémiens, ainsi qu'au niveau du nerf sciatique. Les coupes seront colorées à l'aide de colorants appropriés, spécifiques de la myéline et des axones.

2. **RÉSULTATS**

En règle générale, si les résultats obtenus pour les différents points d'évaluation retenus (biochimie, histopathologie et observation du comportement) sont négatifs, il n'est normalement pas nécessaire de poursuivre les essais de neurotoxicité différée. Les résultats équivoques ou non concluants peuvent nécessiter une poursuite de l'étude.

Les résultats doivent être indiqués pour chaque animal, individuellement. En outre, tous les résultats doivent être présentés sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux présentant des lésions, des troubles du comportement ou des modifications biochimiques, le type et la gravité de ces lésions ou troubles, ainsi que le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion ou trouble aux différents niveaux de gravité.

▼B

Les résultats de cette étude doivent être évalués du point de vue de l'incidence, de la gravité et de la corrélation entre les effets comportementaux, biochimiques et histopathologiques et tout autre effet observé dans les lots traités et les lots témoins.

Les résultats numériques seront évalués par des méthodes statistiques appropriées et reconnues. Ces méthodes statistiques doivent être choisies lors de la conception de l'étude.

3. **COMPTE RENDU**

PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience:

— souche utilisée,

— nombre d'animaux et âge,

— origine, conditions d'hébergement, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'expérience.

Conditions expérimentales:

— détails concernant la préparation de la substance à tester, sa stabilité et son homogénéité, s'il y a lieu,

— justification du choix du véhicule,

— détails concernant l'administration de la substance à tester,

— détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau,

— justification du choix de la dose,

— spécification des doses administrées, avec indications détaillées concernant le véhicule, le volume et la forme physique de la substance administrée,

— identité de l'agent protecteur éventuel et détails concernant son administration.

Résultats:

— données relatives au poids corporel,

— données concernant la réaction toxique par groupe, y compris la mortalité,

— nature, gravité et durée des effets cliniques observés (réversibilité éventuelle),

— description détaillée des méthodes biochimiques et de leurs résultats,

— résultats de l'autopsie,

— description détaillée de tous les résultats histopathologiques,

— le cas échéant, traitement statistique des résultats.

Discussion des résultats

Conclusion

4. **RÉFÉRENCES**

Cette méthode reprend la ligne directrice 418 de l'OCDE.

▼B

B.38 **NEUROTOXICITÉ RETARDÉE DES SUBSTANCES ORGANOPHOSPHORÉES ÉTUDE PAR ADMINISTRATION RÉITÉRÉE SUR 28 JOURS**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Lorsqu'on évalue les effets toxiques des substances, il est important d'étudier la capacité qu'ont certaines substances à entraîner certains types de neurotoxicité que les autres études de toxicité pourraient ne pas mettre en évidence. Certains composés organophosphorés ont une neurotoxicité différée et doivent faire l'objet de telles études.

Des essais de dépistage in vitro peuvent être utilisés pour identifier les substances susceptibles d'entraîner une polyneuropathie différée; toutefois, des résultats négatifs à l'issue d'études in vitro ne suffisent pas à prouver que la substance testée n'est pas neurotoxique.

Cet essai de neurotoxicité retardée sur 28 jours fournit des informations sur d'éventuels dangers pour la santé pouvant découler d'expositions répétées au cours d'une période déterminée. Il donnera des informations sur la relation dose-effet et pourra fournir une estimation du niveau de dose sans effet néfaste observé, pouvant être utile à l'établissement des critères de sécurité pour l'exposition.

Voir introduction générale, partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Les substances organophosphorées comprennent les esters, thioesters organophosphorés non chargés ou anhydrides des acides organophosphoriques, organophosphoniques ou organophos-phoramidiques ou des acides phosphorothioïques, phosphonothioïques ou phosphorothioamidiques apparentés ou d'autres substances pouvant entraîner la neurotoxicité différée parfois observée pour les substances de cette classe.

La neurotoxicité retardée est un syndrome associé à l'installation prolongée et d'ataxie retardée, associée à des axonopathies distales au niveau de la moelle épinière et des nerfs périphériques, et à une inhibition et un vieillissement de l'estérase caractéristique des neuropathies (neuropathy target esterase — NTE) dans les tissus nerveux.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance à tester est administrée quotidiennement par voie orale à des poules domestiques pendant 28 jours. Les animaux sont observés au moins une fois par jour pour rechercher des troubles du comportement, une ataxie et une paralysie, et ce jusqu'au 14e jour après administration de la dernière dose. Des analyses biochimiques sont réalisées, en particulier pour mettre en évidence l'inhibition de l'estérase NTE, sur des poules sélectionnées au hasard dans chaque lot, en général 24 et 48 heures après la dernière administration. Deux semaines après la dernière administration, les poules restantes sont sacrifiées et un examen histopathologique est effectué sur certains tissus nerveux.

▼B

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Préparation**

De jeunes poules adultes exemptes d'affections virales, ne faisant l'objet d'aucune médication susceptible d'interférer et ne présentant pas de troubles de la démarche sont réparties au hasard entre les lots d'expérience et les lots témoins, et sont acclimatées aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours avant le début de l'étude.

Les cages ou enclos utilisés doivent être suffisamment grands pour que les poules puissent se déplacer librement et pour que leur démarche puisse être aisément observée.

La substance à tester doit être administrée par voie orale chaque jour, sept jours sur sept, de préférence par gavage ou dans des capsules de gélatine. Les substances liquides peuvent être administrées directement ou dissoutes dans un véhicule approprié tel que l'huile de maïs; les substances solides doivent si possible être dissoutes car il se peut que d'importantes quantités de solides administrées dans des capsules de gélatine ne soient pas bien absorbées. Si le véhicule est autre que de l'eau, ses caractéristiques toxiques doivent être connues et, dans le cas contraire, déterminées avant le début de l'essai.

1.4.2. **Conditions de l'essai**

1.4.2.1. *Animaux d'expérience*

Il est recommandé d'utiliser de jeunes poules pondeuses adultes *(Gallus quitus domesticus)* âgées de 8 à 12 mois. Il convient d'utiliser des races et souches de taille standard; les poules doivent normalement avoir été élevées dans des conditions leur permettant de se déplacer librement.

1.4.2.2. *Nombre et sexe*

En règle générale, il faut prévoir au moins trois lots d'expérience et un lot témoin recevant uniquement le véhicule. Le lot recevant le véhicule seul doit être traité de la même façon que le lot d'expérience, exception faite de l'administration de la substance à tester.

Il faut prévoir suffisamment d'animaux dans chaque lot pour que l'on puisse en sacrifier au moins six pour effectuer les analyses biochimiques (trois lors de chacun des deux temps de prélèvement) et qu'il en survive six après la période d'observation post-traitement de 14 jours.

1.4.2.3. *Doses*

Les doses doivent être sélectionnées en tenant compte des résultats d'un essai de neurotoxicité retardée après exposition aigué et de toute autre information disponible concernant la toxicité ou la cinétique de la substance à tester. La dose la plus élevée doit être choisie dans le but de produire des effets toxiques et de préférence une neurotoxicité différée, sans entraîner la mort ni des souffrances manifestes. Il convient ensuite de définir une série décroissante de doses afin de mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet et une dose minimale n'entraînant aucun effet observable.

▼B

1.4.2.4. *Essai limite*

Lorsqu'un essai réalisé selon le mode opératoire décrit ci-après, à une dose d'au moins 1 000 mg/kg p.c./jour, n'entraîne pas d'effets toxiques observables et que les données relatives aux substances de structure apparentée ne laissent pas supposer une toxicité, il n'est pas nécessaire d'effectuer une étude à une dose plus élevée. L'essai limite est applicable, sauf lorsqu'une exposition humaine fait apparaître la nécessité d'utiliser une dose plus élevée.

1.4.2.5. *Période d'observation*

Tous les animaux doivent être observés au moins une fois par jour pendant la période d'exposition et pendant les 14 jours suivants, sauf si une autopsie est prévue.

1.4.3. **Mode opératoire**

La substance à tester est administrée tous les jours, sept jours sur sept, pendant 28 jours.

1.4.3.1. *Observation générale*

L'observation doit débuter immédiatement après l'exposition. Toutes les poules sont observées attentivement au moins une fois par jour pendant les 28 jours de traitement et pendant les 14 jours suivants ou jusqu'à la date prévue de leur sacrifice. Tous les signes de toxicité doivent être consignés, ainsi que leur date d'apparition, leur type, leur gravité et leur durée. L'observation doit porter sur les troubles du comportement, sans toutefois s'y limiter. L'ataxie doit être mesurée à l'aide d'une échelle d'évaluation ordinale comportant au moins quatre niveaux; la paralysie doit être consignée. Au moins deux fois par semaine, les poules doivent être sorties de leurs cages et soumises à une épreuve d'activité motrice forcée, d'escalade d'échelles, par exemple, afin de faciliter l'observation des effets toxiques minimaux. Les animaux moribonds ou présentant des signes de détresse ou de souffrance intense doivent être immédiatement retirés de l'étude, euthanasiés et autopsiés.

1.4.3.2. *Poids corporel*

Toutes les poules sont pesées juste avant la première administration de la substance, et au moins une fois par semaine par la suite.

1.4.3.3. *Biochimie*

Six poules prélevées au hasard dans chacun des lots d'expérience et des lots témoins recevant le véhicule seul sont sacrifiées quelques jours après la dernière administration; le cerveau et la moelle épinière lombaire sont préparés et analysés pour détecter l'inhibition de l'estérase caractéristique des neuropathies (NTE). Il peut en outre s'avérer utile de rechercher l'inhibition de cette estérase sur le nerf sciatique. En règle générale, trois poules du lot témoin et de chaque lot d'expérience sont sacrifiées 24 heures après la dernière administration et trois autres 24 heures plus tard, soit 48 heures après la dernière administration; si les résultats de l'étude par exposition aigué ou d'autres études (étude toxicocinétique, par exemple) indiquent qu'il est préférable de choisir d'autres temps de sacrifice, les temps de sacrifices seront modifiés en conséquence et les documents justificatifs seront fournis.

S'il y a lieu, il est également possible d'effectuer des déterminations de l'acétylcholinestérase (AChE) sur ces échantillons. Toutefois, il peut y avoir réactivation spontanée de l'acétylcholinestérase in vivo, ce qui pourrait faire sous-estimer l'activité de la substance en tant qu'inhibiteur de l'AChE.

▼B

1.4.3.4. *Autopsie*

L autopsie de tous les animaux (sacrifice programmé ou imposé par l'état des animaux) doit comporter un examen de l'aspect du cerveau et de la moelle épinière.

1.4.3.5. *Examen histopathologique*

Les tissus nerveux des animaux survivants après la période d'observation et non utilisés pour les études biochimiques doivent faire l'objet d'un examen microscopique. Les tissus doivent être fixés in situ par des techniques de perfusion. Les coupes doivent être pratiquées au niveau du cervelet (plan longitudinal moyen), du bulbe rachidien, de la moelle épinière et des nerfs périphériques. Les coupes de la moelle épinière seront pratiquées dans la partie cervicale supérieure, dans la région thoracique moyenne et dans la région sacro-lombaire. Des coupes devront également être réalisées dans la région distale du nerf tibial et au niveau de ses ramifications vers les muscles jumeaux du triceps, ainsi qu'au niveau du nerf sciatique. Les coupes seront colorées à l'aide de colorants appropriés, spécifiques de la myéline et des axones. Dans un premier temps, l'examen microscopique sera effectué sur les tissus conservés de tous les animaux du lot traité à la dose la plus élevée et du lot témoin. Si des effets sont mis en évidence dans le lot traité à la dose la plus élevée, l'examen microscopique devra également porter sur les tissus des animaux des lots traités à la dose intermédiaire et à la dose faible.

2. **RÉSULTATS**

En règle générale, si les résultats obtenus pour les différents critères d'évaluation retenus dans cette méthode (biochimie, histopathologie et observation du comportement) sont négatifs, il n'est pas nécessaire de poursuivre les essais de neurotoxicité différée. Les résultats équivoques ou non concluants peuvent nécessiter une poursuite de l'étude.

Les résultats doivent être indiqués pour chaque animal, individuellement. En outre, tous les résultats doivent être récapitulés dans un tableau indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux présentant des lésions, des troubles du comportement ou des modifications biochimiques, le type et la gravité de ces lésions ou symptômes, ainsi que le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion ou symptôme aux différents niveaux de gravité.

Les résultats de cette étude doivent être évalués du point de vue de l'incidence, de la gravité et de la corrélation entre les effets comportementaux, biochimiques et histopathologiques et tout autre effet observé dans les lots traités et les lots témoins.

Les résultats numériques seront évalués par des méthodes appropriées et reconnues. Ces méthodes statistiques doivent être choisies lors de la conception de l'étude.

3. **COMPTE RENDU**

PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience:

— souche utilisée,

— nombre d'animaux et âge,

— origine, conditions d'hébergement, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'expérience.

▼B

Conditions expérimentales:

— détails concernant la préparation de la substance à tester, sa stabilité et son homogénéité, s'il y a lieu,

— justification du choix du véhicule,

— détails concernant l'administration de la substance à tester,

— détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau,

— justification du choix de la dose,

— spécification des doses administrées, avec indications détaillées concernant le véhicule, le volume et la forme physique de la substance administrée,

— si les déterminations biochimiques ne sont pas pratiquées 24 et 48 heures après la dernière administration, justification du choix d'autres temps.

Résultats:

— données relatives au poids corporel,

— données concernant la réaction toxique par groupe, y compris la mortalité,

— niveau de dose sans effet néfaste observé,

— nature, gravité et durée des effets cliniques observés (réversibilité éventuelle),

— description détaillée des méthodes biochimiques et de leurs résultats,

— résultats de l'autopsie,

— description détaillée de tous les résultats histopathologiques,

— le cas échéant, traitement statistique des résultats.

Discussion des résultats

Conclusion

4. **RÉFÉRENCES**

Cette méthode reprend la ligne directive 419 de l'OCDE.

▼B

B.39. **ESSAI IN VIVO DE SYNTHÈSE NON PROGRAMMÉE DE L'ADN (UDS) SUR CELLULES HÉPATIQUES DE MAMMIFÈRE**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 486, Essai in vivo de synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur cellules hépatiques de mammifères (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai in vivo de synthèse non programmée de l'ADN (unscheduled DNA synthesis, UDS) sur cellules hépatiques de mammifère est destiné à identifier les substances qui induisent la réparation de l'ADN dans les cellules hépatiques des animaux traités (1, 2, 3, 4).

Cet essai in vivo constitue une méthode d'étude des effets génotoxiques des substances chimiques dans le foie. L'effet mesuré témoigne de l'altération de l'ADN et de la réparation qui en résulte dans les cellules hépatiques. Comme le foie est généralement le principal site du métabolisme des substances absorbées, il constitue un site approprié pour la détermination in vivo des altérations de l'ADN.

Il ne faut pas avoir recours à cet essai s'il est manifeste que la substance d'essai ou un métabolite réactif n'atteindra pas le tissu cible.

La synthèse non programmée de l'ADN (UDS) est mesurée en déterminant l'incorporation de nucléosides marqués dans les cellules qui ne subissent pas une synthèse programmée (phase S) de l'ADN. La technique la plus couramment utilisée est la détermination par autoradiographie de l'incorporation de thymidine marquée au tritium (^{3}H-TdR). On utilise de préférence le foie de rat pour les essais UDS *in vivo*. D'autres tissus peuvent être utilisés mais ne font pas l'objet de cette méthode.

La détection d'une UDS dépend du nombre de bases d'ADN excisées et remplacées au site de l'altération. Ainsi, l'essai UDS est particulièrement utile pour détecter la réparation de longues séquences (20-30 bases) induite par la substance. Par contre, la réparation de courtes séquences (1-3 bases) est détectée avec une sensibilité beaucoup plus faible. En outre, des événements mutagènes peuvent résulter d'une non-réparation, d'une réparation erronée d'altérations de l'ADN ou d'une réplication erronée. L'ampleur de l'UDS ne fournit aucune indication quant à la fidélité du processus de réparation. D'autre part, il est possible qu'un mutagène réagisse avec l'ADN sans que l'altération de celui-ci soit réparée par un processus de réparation par excision. Le fait que l'essai UDS ne fournit pas d'informations spécifiques sur l'activité mutagène est compensé par la sensibilité potentielle de ce critère parce qu'il est mesuré dans la totalité du génome.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DÉFINITIONS

Cellules en réparation: nombre net de grains (NNG) supérieur à une valeur préétablie à justifier par le laboratoire effectuant l'essai.

Nombre net de grains (NNG): mesure quantitative de l'activité UDS de cellules lors d'essais UDS autoradiographiques; calculé en soustrayant du nombre de grains nucléaires (GN) le nombre moyen de grains cytoplasmiques dans des zones cytoplasmiques équivalentes au noyau (GC): NNG = GN -GG. Les NNG sont calculés pour les cellules individuelles, puis regroupés pour les cellules d'une culture, de cultures parallèles, etc.

▼B

Synthèse réparatrice de l'ADN (UDS): synthèse de réparation de l'ADN après excision et élimination d'un fragment d'ADN contenant une région lésée par des substances chimiques ou physiques.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

L'essai UDS in vivo sur cellules hépatiques de mammifère indique une synthèse de réparation de l'ADN après excision et élimination d'un fragment d'ADN contenant une région altérée par des substances chimiques ou physiques. L'essai repose généralement sur l'incorporation de ^{3}H-TdR dans l'ADN de cellules hépatiques qui présentent une faible fréquence de cellules dans la phase S du cycle cellulaire. L'incorporation de ^{3}H-TdR est généralement déterminée par autoradiographie dans la mesure où cette technique n'est pas sensible aux interférences dues aux cellules en phase S comme c'est le cas du comptage en scintillation liquide, par exemple.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.4.1. **Préparations**

1.4.1.1. *Sélection de l'espèce animale*

Le rat est communément utilisé, bien que n'importe quelle espèce de mammifère appropriée puisse être employée. Il convient d'utiliser des animaux adultes, jeunes et sains issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Au début de l'étude, la différence pondérale des animaux doit être minimale et ne pas dépasser ± 20 % du poids moyen de chaque sexe.

1.4.1.2. *Conditions d'encagement et régime alimentaire*

Les conditions générales décrites dans l'introduction générale de la partie B sont appliquées mais le taux d'humidité devrait se situer aux environs de 50-60 %.

1.4.1.3. *Préparation des animaux*

De jeunes adultes sains sont répartis par randomisation entre les groupes des animaux témoins et traités. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effet dû à leur emplacement. Ils sont identifiés individuellement. Ils sont gardés dans leur cage pendant au moins cinq jours avant le début de l'étude, de façon à les acclimater aux conditions du laboratoire.

1.4.1.4. *Substance d'essai/préparation*

Les substances d'essai solides sont préparées par dissolution ou suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis éventuellement diluées avant l'administration aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les domaines du stockage.

1.4.2. **Conditions expérimentales**

1.4.2.1. *Solvant/véhicule*

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas avoir d'effet toxique aux doses utilisées ni présenter de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données faisant état de leur compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux, chaque fois que cela est possible.

▼B

1.4.2.2. *Témoins*

Des témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule) doivent être inclus dans chaque partie indépendante de l'expérience. Les animaux des groupes témoins sont traités exactement comme ceux des groupes traités, mise à part l'administration de la substance d'essai.

Les témoins positifs doivent être *des* substances dont on sait qu'elles produisent une UDS à des niveaux d'exposition supposés conduire à un accroissement détectable par rapport au bruit de fond. Les témoins positifs pour lesquels une activation métabolique est nécessaire doivent être utilisés à des doses qui donnent lieu à une réponse modérée (4). Les doses peuvent être choisies de façon que les effets soient évidents et que l'identité des lames codées ne soit pas révélée immédiatement à l'examinateur. Les substances indiquées dans le tableau ci-dessous sont des exemples de témoins positifs.

Moment de prélèvement	Substance	№ CAS	Nº Einecs
Précoce (2-4 heures)	N-nitrosodiméthylamine	62-75-9	200-249-8
Tardif (12-16 heures)	N-2-fluorénylacétamide (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

D'autres témoins positifs appropriés peuvent être utilisés. Le témoin positif doit être administré par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai.

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Nombre et sexe des animaux**

Il convient d'utiliser un nombre adéquat d'animaux afin de tenir compte de variations interindividuelles de la réponse à l'essai. Il doit y avoir au moins 3 animaux analysables par groupe. Lorsqu'on dispose d'une importante quantité de données historiques, les groupes témoins négatifs et positifs peuvent ne comprendre que 1 ou 2 animaux.

Si, au moment de l'étude, on dispose de données historiques effectuées avec la même espèce et ayant utilisé la même voie d'administration, qui démontrent l'absence de différence importante de toxicité entre sexes, on peut effectuer l'essai avec des animaux d'un seul sexe, de préférence des mâles. Si l'exposition humaine est spécifique du sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, des animaux du sexe approprié doivent être utilisés pour l'essai.

1.5.2. **Modalité de traitement**

Les substances d'essai sont généralement administrées en une seule fois.

1.5.3. **Niveaux de dose**

Normalement, on utilise au moins deux niveaux de dose. La dose la plus élevée est définie comme la dose qui produit des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes, administrées suivant les mêmes modalités, seraient létales. En général, la dose la plus faible est comprise entre la moitié et le quart de la dose la plus forte.

▼B

Les substances possédant une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les mitogènes) peuvent faire exception à ces critères d'établissement de doses et doivent être évaluées cas par cas. Si une étude préliminaire est réalisée afin d'évaluer les niveaux de dose, cette étude doit être effectuée dans le même laboratoire en utilisant la même espèce, la même souche, des animaux du même sexe et la même modalité de traitement que ceux de l'étude principale.

La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans le foie (noyaux pyenotiques, par exemple).

1.5.4. **Test limite**

Si un essai réalisé avec au moins 2 000 mg/kg de poids corporel, en une seule dose ou en deux doses administrées le même jour, n'engendre aucun effet toxique observable et si une génotoxicité est improbable d'après les données relatives à des substances de structure voisine, on peut considérer qu'une étude complète n'est pas nécessaire. Suivant l'importance de l'exposition humaine probable, on peut envisager d'utiliser des doses plus fortes dans l'essai de dose limite.

1.5.5. **Voies d'administration**

La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique *ou d'une* canule d'intubation adaptée. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles peuvent être justifiées. La voie péritonéale n'est toutefois pas recommandée, étant donné qu'elle peut conduire à une exposition directe du foie à la substance d'essai plutôt que par l'intermédiaire du système circulatoire. Le volume maximal de liquide administre en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 2 ml/100 g de poids corporel. Une justification doit être fournie si des volumes plus importants sont administrés. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

1.5.6. **Préparation des cellules hépatiques**

Les cellules hépatiques des animaux traités sont normalement préparées 12-16 heures après le traitement. Un prélèvement supplémentaire effectué plus tôt (normalement 2-4 heures après le traitement) est en général nécessaire, à moins qu'il y ait une réponse manifestement positive après 12-16 heures. Toutefois, d'autres délais de prélèvement peuvent être utilisés s'ils sont justifiés sur la base de données toxicocinétiques.

Les cultures à court terme de cellules hépatiques de mammifère sont habituellement établies en perfusant le foie in situ avec la collagénase et en laissant les cellules fraîchement dissociées se fixer sur une surface appropriée. Les cellules hépatiques des témoins négatifs doivent présenter une viabilité (5) d'au moins 50 pour cent.

1.5.7. **Détermination de l'UDS**

Les cellules hépatiques de mammifère fraîchement isolées sont généralement incubées dans un milieu contenant du ^{3}H-TdR pendant une durée appropriée (3-8 heures, par exemple). A la fin de la période d'incubation, le milieu est enlevé des cellules, qui peuvent ensuite être incubées avec un milieu contenant un excès de thymidine non marquée, afin de réduire la radioactivité non incorporée (*cold chase*). Les cellules sont ensuite rincées, fixées et séchées. Pour les périodes d'incubation plus longues, la *cold chase* n'est pas absolument nécessaire. Les lames sont plongées dans une émulsion autoradiographique, maintenues dans l'obscurité (réfrigérées pendant 7-14 jours, par exemple), développées et colorées. On procède ensuite au comptage des grains d'argent. On prépare deux à trois lames pour chaque animal.

▼B

1.5.8. **Analyse**

Les préparations sur lame doivent contenir un nombre suffisant de cellules de morphologie normale pour qu'une évaluation probante de l'UDS soit possible. Les préparations sont examinées au microscope en vue de la recherche de signes de cytotoxirité manifeste (pyenose, diminution du niveau de marquage radioactif, par exemple).

Les lames doivent être codées avant le comptage des grains. On analyse normalement 100 cellules de chaque animal sur au moins deux lames; l'analyse d'un nombre inférieur à 100 cellules/animal doit être justifié. Le nombre de grains n'est pas déterminé pour les noyaux en phase S, mais la proportion de cellules en phase S peut être enregistrée.

Le niveau d'incorporation de ^{3}H-TdR dans le noyau et le cytoplasme des cellules morphologiquement normales, tel qu'il est mis en évidence par le dépôt de grains d'argent, doit être déterminé à l'aide de méthodes appropriées.

Le nombre de grains est déterminé au niveau du noyau (grains nucléaires, GN) et des zones du cytoplasme équivalentes au noyau (grains cytoplasmiques, GC). Le nombre de GC est déterminé sur la base soit de la région du cytoplasme la plus fortement marquée, soit de la moyenne de deux ou trois régions proches du noyau choisies au hasard. D'autres méthodes de comptage (cellules entières, par exemple) peuvent être utilisées si on peut les justifier (6).

2. **RÉSULTATS**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Les données doivent être indiquées individuellement pour chaque culture. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux. Le nombre net de grains (NNG) doit être déterminé pour chaque cellule, chaque animal, chaque dose et chaque temps de prélèvement en soustrayant le nombre de GC du nombre de GN. Si des «cellules en réparation» sont comptées, les critères pour définir les «cellules en réparation» doivent être justifiés et se fonder sur des données historiques ou sur des témoins négatifs concomitants. Les résultats numériques peuvent être évalués à l'aide de méthodes statistiques. Dans ce cas, il faut choisir et justifier les tests statistiques avant la réalisation de l'étude.

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Exemples de critères permettant de conclure à une réponse positive ou négative:

positive
- i) valeur NNG supérieure à un seuil préétabli justifié sur la base des données historiques du laboratoire, ou
- ii) valeur NNG significativement supérieure à celle du témoin concomitant,

négative
- i) valeur NNG inférieure ou égale au seuil des contrôles historiques, ou
- ii) valeur NNG non significativement supérieure à celle du témoin concomitant.

▼B

Il convient de prendre en considération la pertinence biologique des données (paramètres tels que la variation interindividuelle, la relation dose-réponse et la cytotoxicité). L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas une conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Un résultat positif à l'essai UDS in vivo sur cellules hépatiques de mammifère indique que la substance d'essai induit des altérations de l'ADN dans les cellules hépatiques de mammifère in vivo qui peuvent être réparées par la synthèse non programmée de l'ADN in vitro. Un résultat négatif signifie que, dans les conditions de l'essai, la substance d'essai n'induit pas d'altération de l'ADN détectable par cet essai.

Le fait que la substance d'essai atteint la circulation générale ou spécifiquement le tissu cible (toxicité systémique) devrait être discutée.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Solvant/véhicule:

— justification du choix du véhicule,

— solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience:

— espèce/souche utilisée,

— nombre, âge et sexe des animaux,

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids individuels des animaux au début de l'essai, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart-type dans chaque groupe.

Conditions expérimentales:

— données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule),

— résultats de l'étude de détermination des doses utiles, si elle a été réalisée,

— justification du choix des doses employées,

— détails concernant la préparation de la substance d'essai,

— détails concernant l'administration de la substance d'essai,

— justification du choix de la voie d'administration,

— méthodes pour vérifier que la substance a atteint ta circulation générale ou le tissu cible, le cas échéant,

▼B

— conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai dans l'eau de boisson ou la nourriture en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu,

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau,

— description détaillée des modalités de traitement et de prélèvement,

— méthodes de mesure de la toxicité,

— méthode de préparation et de culture des cellules hépatiques,

— technique autoradiographique utilisée,

— nombre de lames préparées et nombre de cellules analysées,

— critères d'évaluation,

— critères de décision concernant les résultats positifs, négatifs et équivoques.

Résultats:

— valeurs moyennes du nombre de grains nucléaires, du nombre de grains cytoplasmiques et du nombre net de grains pour chaque lame, animal et groupe,

— relation dose-réponse, si possible,

— évaluation statistique, le cas échéant,

— signes de toxicité,

— données sur les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs concomitants,

— données sur les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types),

— nombre de «cellules en réparation», s'il a été déterminé,

— nombre de cellules en phase S, s'il a été déterminé,

— viabilité des cellules.

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.,* 156, pp. 1 — 18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation Res.,* 189, pp. 123 — 133.

(3) Kennelly, J. C, Waters, R., Ashby. J., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M, (eds.), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mulagenicity Testing Report. Part II revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52 — 77.

▼B

(4) Madle. S., Dean. S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C, Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo, *Mutations Res.,* 312, pp. 263 — 285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initital Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the In Vivo/In Vitro DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res. 291.* pp. 21 — 27.

(6) Mirsalis, J. C, Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the In Vivo/In Vitro Hepafocyte HNA Repair Assay, *Environ Mutagen,* 4, pp. 553 — 562.

▼B

B.40. CORROSION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI DE RESISTANCE ÉLECTRIQUE TRANSCUTANÉE (RET)

1. MÉTHODE

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 430 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La corrosion cutanée désigne la survenue de lésions irréversibles de la peau après l'application d'un matériel d'essai [selon la définition du système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH)] (1). La présente méthode propose une évaluation de la corrosivité qui n'est pas réalisée sur des animaux vivants.

Traditionnellement, l'évaluation de la corrosivité cutanée impliquait le recours à des animaux de laboratoire (2). Dans le souci d'éviter les douleurs et les souffrances ainsi infligées aux animaux, la méthode d'essai B.4 a été révisée afin de permettre la détermination de la corrosion cutanée par la mise en œuvre de méthodes de substitution in vitro.

La conduite d'études de pré-validation a néanmoins été une première étape dans la définition d'essais de substitution susceptibles d'être utilisés pour des essais de corrosivité cutanée menés à des fins réglementaires (3). Par la suite, une étude formelle de validation des méthodes in vitro d'évaluation de la corrosion cutanée (4) (5) a été conduite (6) (7) (8). Sur la base des résultats de ces études et d'autres publications, il est maintenant recommandé d'évaluer la corrosivité cutanée in vivo à l'aide des essais suivants (9) (10) (11): l'essai utilisant un modèle de peau humaine (voir méthode d'essai B.40 *bis*) et l'essai de résistance électrique transcutanée (la présente méthode).

Selon une étude de validation et d'autres études publiées, l'essai de résistance électrique transcutanée (RET) sur peau de rat (12) (13) permet de faire la distinction de manière fiable entre substances corrosives et non corrosives pour la peau (5) (9).

L'essai décrit dans cette méthode permet d'identifier les substances et mélanges chimiques corrosifs. Appuyé par d'autres éléments de détermination fondés sur d'autres informations existantes (pH, relations structure-activité, données humaines et/ou animales, par exemple), il permet également d'identifier les substances et mélanges non corrosifs (1) (2) (11) (14). En revanche, il ne fournit pas d'information sur l'irritation cutanée, et contrairement au système général harmonisé de classification (SGH) (1), il ne permet pas non plus la sous-catégorisation des substances corrosives.

Pour une évaluation complète des effets cutanés locaux après une exposition unique, il est recommandé de suivre la démarche expérimentale séquentielle présentée en supplément à la méthode d'essai B.4(2) et proposée dans le système général harmonisé (1). Cette démarche expérimentale prévoit la conduite d'essais in vitro de corrosion cutanée (tel que celui décrit dans la présente méthode) et d'irritation cutanées avant d'envisager des essais sur des animaux vivants.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

Corrosion cutanée in vivo: survenue de lésions irréversibles de la peau. En l'occurrence, il s'agit de nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'une substance d'essai pendant une durée allant jusqu'à quatre heures. Les réactions corrosives se traduisent généralement par des ulcères, des saignements, des croûtes sanguinolentes et, à la fin de la période d'observation, soit à 14 jours, par une décoloration due au blanchissement de la peau, des zones complètes d'alopécie, et des cicatrices. Un examen histopathologique peut être envisagé pour évaluer les lésions douteuses.

Résistance électrique transcutanée (RET): mesure de l'impédance électrique de la peau, exprimée par une valeur de résistance en kilo-Ohms. Il s'agit d'une méthode simple et fiable permettant d'évaluer la fonction de barrière de la peau, par l'enregistrement du passage des ions à travers la peau à l'aide d'un pont de mesure de Wheatstone.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Tableau 1

Substances chimiques de référence

Nom	Nº EINECS	Nº CAS	
Diamino-1,2 propane	201-155-9	78-90-0	Gravement corrosif
Acide acrylique	201-177-9	79-10-7	Gravement corrosif
O-tert. Butylphénol	201-807-2	88-18-6	Corrosif
Hydroxyde de potassium (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Corrosif
Acide sulfurique (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Corrosif
Acide octanoïque (acide caprylique)	204-677-5	124-07-02	Corrosif
4-amino-1,2,4-triazole	209-533-5	584-13-4	Non corrosif
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Non corrosif
Bromure de phénétyle	203-130-8	103-63-9	Non corrosif
Perchloroéthylène	204-825-9	27-18-4	Non corrosif
Acide isostéarique	250-178-0	30399-84-9	Non corrosif
4-(méthylthio)-benzaldéhyde	222-365-7	3446-89-7	Non corrosif

La plupart des substances chimiques données ici proviennent de la liste des substances chimiques sélectionnées par le CEVMA dans son étude de validation internationale (4). Les choix du CEVMA sont fondés sur les critères suivants:

i) nombre égal de substances corrosives et non corrosives;

▼B

ii) substances disponibles dans le commerce et couvrant la plupart des classes chimiques pertinentes;

iii) insertion de substances extrêmement corrosives et moins corrosives, de façon à permettre une distinction basée sur le pouvoir de corrosion;

iv) substances chimiques manipulables en laboratoire sans présenter d'autres risques majeurs que la corrosivité.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Le matériel d'essai est appliqué pour une durée n'excédant pas 24 heures sur la surface épidermique de disques de peau, placés dans un système d'essai à deux compartiments pour lequel les disques de peau font office de séparation entre les compartiments. Ces disques cutanés sont prélevés sur la peau de jeunes rats âgés de 28 à 30 jours et humainement euthanasiés. Les matières corrosives sont identifiées sur la base de leur capacité à provoquer la perte de l'intégrité du stratum corneum normal et de la fonction de barrière, cette perte étant mesurée comme une diminution de la RET en deçà d'une valeur seuil (12). Dans le cas des rats, une valeur de seuil de la RET de 5 kΩ. a été retenue, sur la base de nombreuses données relatives à un large éventail de substances chimiques, desquelles il ressortait que l'immense majorité des valeurs étaient soit très supérieures (souvent > 10 kΩ), soit très inférieures (souvent < 3 kΩ,) à cette valeur de seuil (12). De manière générale, les matériels non corrosifs sur les animaux, mais irritants ou non irritants, ne font pas baisser la RET en dessous de ce seuil. Par ailleurs, l'utilisation d'autres préparations de peau ou d'autres équipements est susceptible de modifier la valeur de seuil, ce qui impose de procéder à une validation supplémentaire.

Une étape de fixation d'un colorant est incorporée dans la procédure d'essai pour confirmer les résultats positifs de la RET présentant des valeurs autour de 5 kΩ. Cette étape de fixation d'un colorant détermine en effet si l'accroissement de la perméabilité ionique est imputable à la destruction physique du stratum corneum. Dans la pratique, la méthode de l'essai RET sur peau de rat prédit très bien la corrosivité in vivo chez le lapin évaluée par la méthode d'essai B.4 (2). A cet égard, il convient de noter que l'essai in vivo sur des lapins est extrêmement prudent concernant la corrosivité et l'irritation cutanées par rapport à l'essai sur modèle de peau humaine (15).

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.5.1. **Animaux**

Les rats sont l'espèce la mieux adaptée pour cet essai dans la mesure où la sensibilité de leur peau aux substances chimiques employées a déjà été démontrée (10). L'âge (au moment du prélèvement de la peau) et la souche utilisée sont des critères déterminants, puisqu'il est essentiel que les follicules pileux soient en phase dormante avant le début de la pousse de la fourrure adulte.

▼B

Les poils du dos et des flancs des jeunes rats (Wistar ou souche comparable) mâles ou femelles, âgés approximativement de 22 jours, sont soigneusement coupés à l'aide d'une petite tondeuse. Les animaux sont ensuite nettoyés soigneusement avec un linge humide, la zone tondue étant plongée dans une solution antibiotique (contenant, par exemple, de la streptomycine, de la pénicilline, du chloramphénicol et de l'amphotéricine à des concentrations efficaces pour inhiber la croissance bactérienne). Les animaux sont lavés une nouvelle fois avec des antibiotiques le troisième ou le quatrième jours après le premier lavage, et doivent ensuite être utilisés dans un délai de 3 jours, lorsque le stratum corneum a récupéré de la tonte.

1.5.2. **Préparation des disques cutanés**

Les animaux, âgés de 28 à 30 jours (cet âge est particulièrement important) sont euthanasiés de façon humaine. On prélève la peau dorso-latérale de chaque animal et on la débarrasse soigneusement du tissu adipeux en excès. Des disques cutanés, d'un diamètre approximatif de 20 mm chacun sont prélevés. La peau peut être stockée avant d'utiliser les disques lorsqu'il est établi que les données de contrôle positives et négatives sont équivalentes à celles obtenues avec de la peau fraîche.

Chaque disque cutané est placé sur l'extrémité d'un tube PTFE (polytétrafluoroéthylène) en veillant à ce que la surface épidermique soit en contact avec le tube. Après avoir ajusté de force un joint torique en caoutchouc sur l'extrémité du tube pour maintenir la peau en place, on coupe le tissu excédentaire. Les dimensions du tube et du joint torique sont indiquées à la Figure 2. Le joint torique en caoutchouc est ensuite soigneusement fixé à l'extrémité du tube PTFE de manière étanche à l'aide de vaseline. Le tube est introduit dans une chambre réceptrice contenant une solution de sulfate de magnésium (154 mM) dans lequel il est maintenu par une pince à ressort (Figure 1). Le disque cutané doit être complètement immergé dans la solution de sulfate de magnésium (MgSO4). Entre 10 et 15 disques cutanés peuvent être prélevés de la peau d'un rat.

Avant le début de l'essai, on mesure, pour chaque peau de rat, la résistance électrique de deux disques cutanés, à titre de contrôle de la qualité. Pour que les autres disques d'une même peau soit valables pour l'essai, il faut que les deux disques donnent des valeurs de résistance supérieures à 10 kΩ. Si la résistance est inférieure à 10 kΩ, les disques restants provenant de la même peau doivent être éliminés.

1.5.3. **Application des substances d'essai et de contrôle**

Pour chaque étude, des substances de contrôle positif et négatif doivent être utilisées parallèlement à la substance d'essai, de façon à garantir la qualité des résultats du modèle expérimental. Dans ce contexte, les disques cutanés employés doivent provenir d'un même animal. Les substances de contrôle positif et négatif recommandées sont respectivement l'acide hydrochlorique 10 M et l'eau distillée.

Les substances d'essai liquides (150 µl) sont appliquées sur la surface épidermique à l'intérieur du tube. Pour l'essai de substances solides, une quantité suffisante du solide est appliquée uniformément sur le disque de peau, de façon à ce que la totalité de la surface de l'épiderme soit couverte. Après avoir ajouté de l'eau désionisée (150 µl) sur les solides, on agite le tube doucement. Afin d'optimiser le contact avec la peau, certains solides doivent être chauffés à 30 °C pour dissoudre la substance d'essai ou être broyés pour obtenir des grains ou une poudre.

▼B

On utilise trois disques cutanés pour chaque substance d'essai. Ces substances sont appliquées pendant 24 heures à une température de 20 à 23 °C, puis éliminées complètement par lavage sous l'eau du robinet à 30 °C maximum.

1.5.4. **Mesures de la RET**

L'impédance de la peau, c'est-à-dire la RET, est mesurée à l'aide d'un pont de mesure de Wheatstone en courant alternatif basse tension (13), présentant les caractéristiques suivantes: tension de 1 à 3 Volts, courant alternatif de forme sinusoïdale ou rectangulaire compris entre 50 et 1000 Hz, et une plage de mesure au moins comprise entre 0,1 et 30 kΩ Le pont de mesure utilisé dans l'étude de validation permettait de mesurer l'inductance, la capacitance et la résistance jusqu'à des valeurs de 2 000 H, 2 000 µF et 2 M respectivement, à des fréquences de 100 Hz ou 1 kHz, en utilisant des valeurs en parallèle ou en série. Pour les besoins de l'essai RET de corrosivité, les mesures sont enregistrées en résistance, à une fréquence de 100 Hz et à l'aide de valeurs en série. Avant la mesure de la résistance électrique, on réduit la tension de surface de la peau en ajoutant un volume suffisant d'éthanol à 70 % pour couvrir l'épiderme. Après quelques secondes, on enlève l'éthanol du tube, puis on hydrate le tissu par l'addition de 3 ml d'une solution de sulfate de magnésium (154 mM). Les électrodes du pont de mesure sont placées de part et d'autre du disque cutané pour prendre la mesure de la résistance en kΩ/disque cutané (Figure 1). Les dimensions des électrodes et la longueur d'électrode en dessous des pinces crocodiles sont indiquées dans la Figure 2. La pince maintenant l'électrode intérieure repose sur la partie supérieure du tube PTFE pendant la mesure de la résistance, afin que la longueur d'électrode immergée dans la solution de sulfate de magnésium reste constante. L'électrode extérieure est introduite dans le compartiment receveur de telle manière qu'elle repose sur le fond de celui-ci. La distance entre la pince à ressort et la partie inférieure du tube PTFE est maintenue constante (Figure 2), cette distance influençant la valeur de résistance obtenue. Par conséquent, la distance entre l'électrode intérieure et le disque cutané doit être constante et minimale (1 à 2 mm).

Il convient de noter que si la valeur de résistance mesurée est supérieure à 20 kΩ, ceci peut être dû au fait que des restes de la substance d'essai couvrent la surface épidermique du disque de peau. On peut essayer de retirer davantage de substance d'essai, par exemple en fermant de façon étanche le tube PTFE avec le pouce revêtu d'un gant et en l'agitant pendant 10 secondes environ. On élimine ensuite la solution de sulfate de magnésium et on répète la mesure de la résistance avec une nouvelle solution de sulfate de magnésium.

Les caractéristiques et dimensions de l'appareil d'essai et de la procédure expérimentale peuvent avoir une incidence sur les valeurs de RET obtenues. Le seuil de corrosivité de 5 kΩ. a été défini sur la base des données obtenues à partir de l'appareil et de la procédure spécifiques décrits dans cette méthode. Avec un autre équipement ou dans des conditions d'essai différentes, les valeurs de seuil et de contrôle peuvent être différentes. Par conséquent, il est nécessaire d'étalonner la méthodologie et la valeur de seuil de résistance en testant différentes substances de référence étalons, choisies parmi celles utilisées dans l'étude de validation (4) (5), ou dans des classes chimiques équivalentes à celles des substances étudiées. Le Tableau 1 présente un ensemble de substances de référence qui conviennent.

▼B

1.5.5. **Méthodes avec fixation d'un colorant**

L'exposition à certains matériels non corrosifs peut entraîner une réduction de la résistance sous la valeur de seuil de 5 kΩ, permettant ainsi le passage d'ions à travers le stratum corneum, ce qui réduit ainsi la résistance électrique (5). Par exemple, les substances organiques neutres et les substances tensio-actives (détergents, émulsifiants et autres agents de surface) peuvent évacuer les lipides de la peau et accroître la perméabilité aux ions de la barrière cutanée. Par conséquent, si les valeurs de RET des substances d'essai sont inférieures à, ou proches de, 5 kΩ, en l'absence de toute lésion visible, une étude de pénétration d'un colorant doit être menée sur les tissus traités et de contrôle, afin de déterminer si ces valeurs de RET résultent d'une perméabilité accrue ou d'une corrosion de la peau (3) (5). S'il s'agit d'une corrosion, autrement dit si le stratum corneum est rompu, le colorant sulforhodamine B appliqué à la surface de la peau pénètre rapidement et teinte les tissus sous-jacents. Ce colorant reste stable au contact d'un large éventail de substances chimiques et n'est pas affecté par la procédure d'extraction décrite ci-après.

1.5.5.1. *Application et élimination du colorant Sulforhodamine B*

Après l'essai de RET, le sulfate de magnésium est évacué du tube et la peau est soigneusement examinée. Si aucune lésion majeure n'est visible, 150 µl d'une dilution à 10 pour cent (p/v) de sulforhodamine B (Acid Red 52; CI. 45100; numéro EINECS 222-529-8; numéro CAS 3520-42-1) dans de l'eau distillée sont appliqués sur la surface épidermique de chaque disque cutané pendant 2 heures. Les disques cutanés sont lavés ensuite sous un jet d'eau courante à la température ambiante pendant environ 10 secondes pour éliminer le colorant excédentaire ou non fixé. Chaque disque cutané est soigneusement enlevé du tube PTFE et placé dans un flacon (par exemple un flacon à scintillation en verre de 20 ml) contenant de l'eau désionisée (8 ml). Les flacons sont agités doucement pendant 5 minutes pour éliminer complètement tout colorant excédentaire ou non fixé. Après avoir répété l'opération de rinçage, on enlève les disques cutané et on les place dans des flacons contenant 5 ml de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 30 pour cent (p/v) dans de l'eau distillée, puis on les incube pendant une nuit à 60 °C.

Après incubation, chaque disque de peau est enlevé et jeté et la solution restante est centrifugée pendant 8 minutes à 21 °C (force centrifuge relative ~175 x g). Un échantillon de 1 ml de surnageant est ensuite dilué dans un rapport de 1 à 5 (v/v) [soit 1 ml + 4 ml] avec du SDS à 30 pour cent (p/v) dans de l'eau distillée. La densité optique (DO) de la solution est mesurée à environ 565 nm.

1.5.5.2. *Calcul de la teneur en colorant*

La teneur de chaque disque en colorant sulforhodamine B est calculée sur la base des valeurs de DO (5) (coefficient d'extinction molaire de la sulforhodamine B à 565 nm = 8,7 × 104; poids moléculaire = 580). La teneur en sulforhodamine B est déterminée pour chaque disque de peau à l'aide d'une courbe étalon appropriée et on calcule ensuite une teneur moyenne en colorant pour les essais répétés.

2. **RÉSULTATS**

Les valeurs de résistance (kΩ) et de teneur moyenne en colorant (µg/disque), le cas échéant, pour le matériel d'essai et pour les contrôles positifs et négatifs doivent être présentées sous forme de tableau (données individuelles et moyennes ± écart-type), y compris les données des essais répétés/répliqués, les valeurs moyennes et individuelles.

▼B

2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les valeurs moyennes de la RET sont acceptées à condition que les valeurs des contrôles positifs et négatifs effectués parallèlement se situent dans les fourchettes acceptables pour la méthode en laboratoire d'essai. Les fourchettes acceptables de valeur de résistance pour la méthodologie et l'appareillage décrits ci-avant sont les suivantes:

Contrôle	Substance	Plage de résistance (kΩ)
Positif	Acide hydrochlorique 10 M	0,5 – 1,0
Négatif	Eau distillée	10 – 25

Les valeurs moyennes de la fixation du colorant sont acceptées à condition que les valeurs des contrôles effectués parallèlement se situent dans la fourchette acceptable pour la méthode. Les fourchettes acceptables de teneur en colorant pour les substances de contrôle proposées pour la méthodologie et l'appareillage décrits ci-avant sont les suivantes:

Contrôle	Substance	Plage de teneur en colorant (µg/disque)
Positif	Acide hydrochlorique 10 M	40 – 100
Négatif	Eau distillée	15 – 35

On considère que la substance d'essai est non corrosive pour la peau:

i) si la valeur moyenne de la RET pour la substance d'essai est supérieure à 5 kΩ, ou

ii) si la valeur moyenne de la RET est inférieure ou égale à 5 kΩ, et

— que le disque cutané ne présente aucune lésion visible, et

— que la teneur moyenne en colorant du disque est bien inférieure à la teneur moyenne en colorant du disque de contrôle positif (acide hydrochlorique 10 M) obtenue parallèlement.

On considère que la substance d'essai est corrosive pour la peau:

i) si la valeur moyenne de la RET est inférieure ou égale à 5 kΩ et si le disque cutané est visiblement lésé, ou

ii) si la valeur moyenne de la RET est inférieure ou égale à 5 kΩ, et

— que le disque cutané ne présente aucune lésion visible, et

— que la teneur moyenne en colorant du disque est bien inférieure à la teneur moyenne en colorant du disque de contrôle positif (acide hydrochlorique 10 M) obtenue parallèlement.

▼B

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir au moins les informations suivantes:

Substances d'essai et de contrôle:

— nom(s) chimique(s), tels que le nom IUPAC ou CAS, et le cas échéant le numéro CAS;

— pureté et composition de la substance ou de la préparation [en pourcentage(s) en poids] et état physique;

— propriétés physico-chimiques (telles que l'état physique, le pH, la stabilité, l'hydrosolubilité) utiles pour la conduite de l'étude;

— le cas échéant, traitement des substances d'essai et de contrôle avant l'essai (par exemple, chauffage, réduction en poudre);

— stabilité (si connue)

Animaux d'essai:

— souche et sexe

— âge au moment du prélèvement de peau

— source, conditions d'hébergement, alimentation, etc.

— détails de la préparation de la peau

Conditions d'essai:

— courbes d'étalonnage de l'appareil d'essai;

— courbes d'étalonnage des performances de l'essai de fixation d'un colorant;

— détails de la procédure d'essai utilisée pour les mesures de la RET;

— détails de la procédure d'essai utilisée pour l'évaluation de la fixation d'un colorant, le cas échéant;

— description de toute modification de la procédure d'essai description des critères d'évaluation utilisés.

Résultats:

— présentation sous forme de tableau des valeurs de RET et des résultats de l'essai de fixation d'un colorant (le cas échéant), pour chaque animal et chaque échantillon de peau

— description de tous les effets observés

Discussion des résultats

Conclusions

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. Série de l'OCDE sur les essais et évaluations, numéro 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

▼B

(2) Méthode d'essai B.4. Toxicité aiguë: irritation/corrosion cutanée.

(3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219-255.

(4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic, in Vitro 12, 471-482.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic, in Vitro 12, 483- 524.

(6) OCDE (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.

(7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem. J.H., Bruner. L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder. R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski. D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.

(8) CEVMA (Comité de coordination interagences sur la validation des méthodes alternatives). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf

(9) CEVMA (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(10) CEVMA (Comité de coordination interagences sur la validation des méthodes alternatives). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/episbrd.pdf.

(11) OCDE (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st - 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

(12) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986). An in vitro skin corrosivity test — modificationsand validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507-512.

▼B

(13) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test in vitro: results of an inter-laboratory trial. Toxic, in Vitro 6, 191-194.

(14) Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.

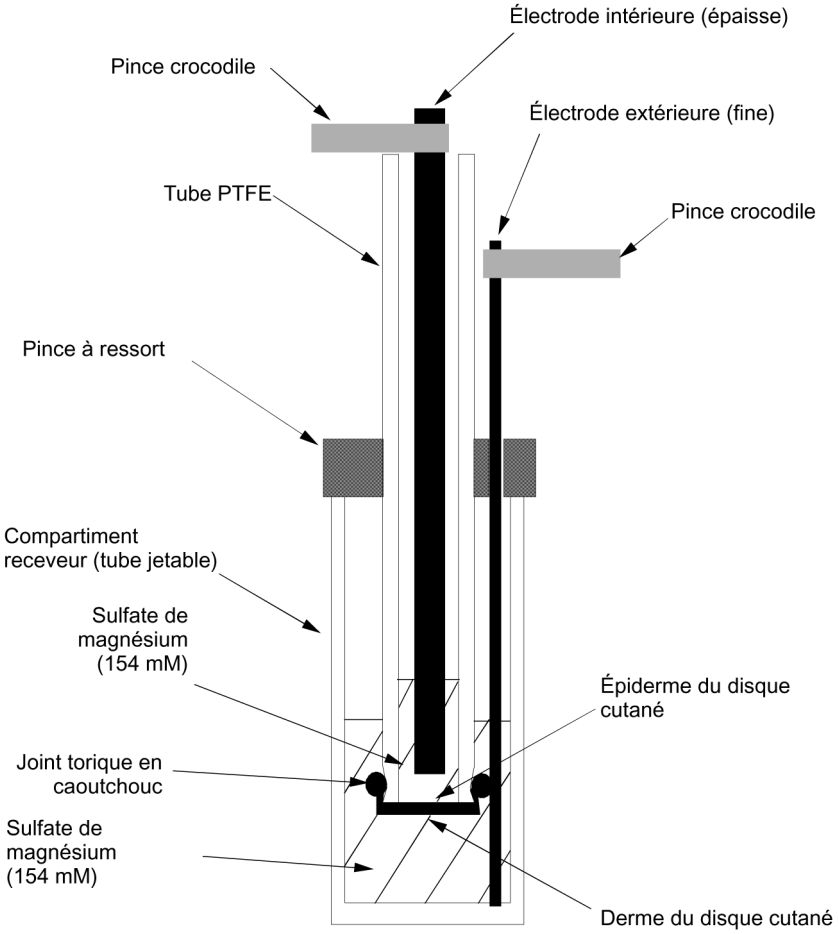
(15) Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, 845-852.

(16) Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988). An In Vitro model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. Toxic, in Vitro. 2, 7-17.

▼B

Figure 1

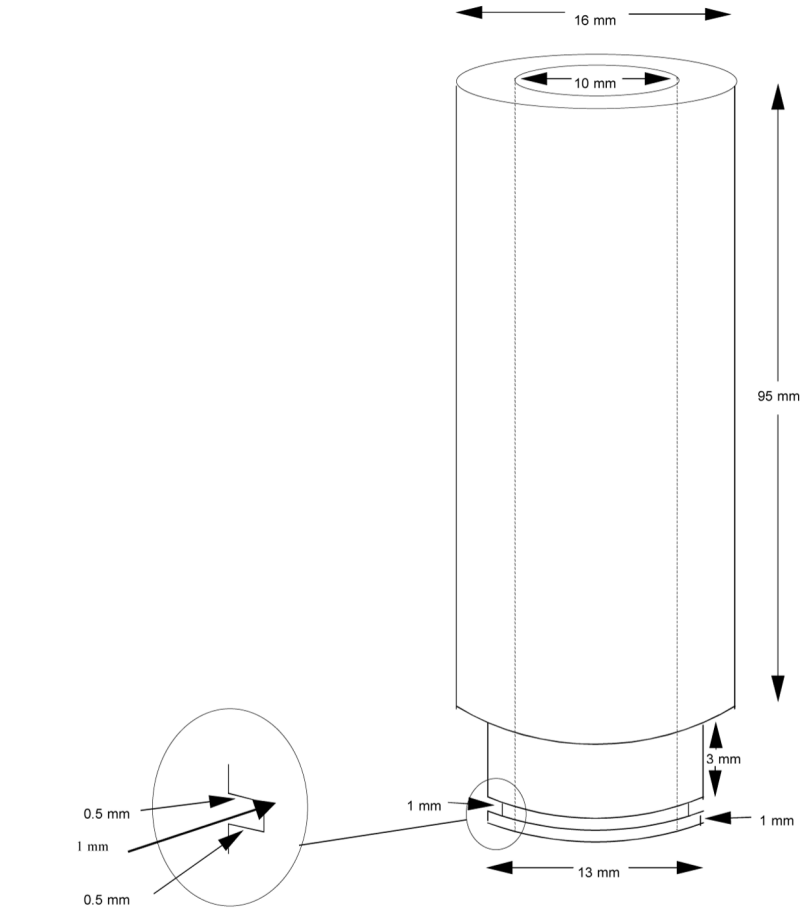
Appareil pour l'essai de RET sur peau de rat

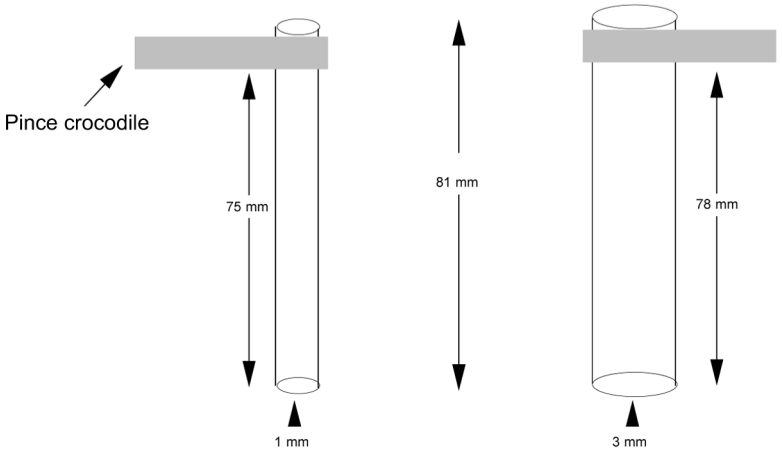


▼B

Figure 2

Dimensions du tube PFTE (polytétrafluoroéthylène), des tubes receveurs et des électrodes utilisés





▼B

Facteurs importants pour l'appareil ci-dessus:

— diamètre intérieur du tube PTFE,

— longueur des électrodes par rapport au tube PTFE et au tube receveur: le disque cutané ne doit pas être en contact avec les électrodes, et une longueur standard d'électrode doit être en contact avec la solution de sulfate de magnésium,

— quantité de solution de sulfate de magnésium dans le tube receveur: la profondeur de liquide, par rapport au niveau dans le tube PFTE, doit être telle qu'indiquée dans la figure 1,

— fixation du disque cutané sur le tube PFTE: la résistance électrique doit être véritablement une mesure des propriétés de la peau.

▼B

B.40 bis. **CORROSION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI SUR MODÈLE DE PEAU HUMAINE**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 431 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La corrosion cutanée désigne la survenue de lésions irréversibles de la peau après application d'un matériel d'essai [selon la définition du système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH)] (1). La présente méthode d'essai ne nécessite pas l'utilisation d'animaux vivants ou de tissus animaux pour l'évaluation la corrosivité cutanée.

Traditionnellement, l'évaluation de la corrosivité cutanée impliquait le recours à des animaux de laboratoire (2). Dans le souci d'éviter les douleurs et les souffrances ainsi infligées aux animaux, la méthode d'essai B.4 a été révisée afin de permettre la détermination de la corrosion cutanée par la mise en œuvre de méthodes de substitution in vitro.

La conduite d'études de pré-validation a néanmoins été une première étape dans la définition d'essais de substitution susceptibles d'être utilisés pour des essais de corrosivité cutanée menés à des fins réglementaires (3). Par la suite, une étude formelle de validation des méthodes in vitro d'évaluation de la corrosion cutanée (4)(5) a été conduite (6) (7) (8). Sur la base des résultats de ces études et d'autres publications (9), il est maintenant recommandé d'évaluer la corrosivité cutanée in vivo à l'aide des essais suivants (10) (11) (12) (13): l'essai sur modèle de peau humaine (la présente méthode) et l'essai de résistance électrique transcutanée (voir méthode d'essai B.40).

Selon les études de validation, les essais sur modèles de peau humaine (3)(4)(5)(9) permettent de faire la distinction de manière fiable entre substances corrosives et non corrosives pour la peau. Le protocole d'essai peut aussi fournir des indications permettant de distinguer les substances extrêmement corrosives pour la peau de celles qui le sont moins.

L'essai décrit dans cette méthode permet d'identifier les substances et mélanges chimiques corrosifs. Appuyé par d'autres éléments de détermination fondés sur d'autres informations existantes (pH, relations structure-activité, données humaines et/ou animales, par exemple), il permet également d'identifier les substances et mélanges non corrosifs (1) (2) (13) (14). En revanche, il ne fournit pas d'information sur l'irritation cutanée, et contrairement au système général harmonisé de classification (SGH) (1), il ne permet pas non plus la sous-catégorisation des substances corrosives.

Pour une évaluation complète des effets cutanés locaux après une exposition unique, il est recommandé de suivre la démarche expérimentale séquentielle présentée en supplément à la méthode d'essai B.4 (2) et proposée dans le système général harmonisé (SGH) (1). Cette démarche expérimentale prévoit la conduite d'essais in vitro de corrosion cutanée (tel que celui décrit dans la présente méthode) et d'irritation cutanées avant d'envisager des essais sur des animaux vivants.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

Corrosion cutanée in vivo: survenue de lésions irréversibles de la peau. En l'occurrence, il s'agit de nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'une substance d'essai pendant une durée allant jusqu'à quatre heures. Les réactions corrosives se traduisent généralement par des ulcères, des saignements, des croûtes sanguinolentes et, à la fin de la période d'observation, soit à 14 jours, par une décoloration due au blanchissement de la peau, des zones complètes d'alopécie, et des cicatrices. Un examen histopathologique peut être envisagé pour évaluer les lésions douteuses.

Viabilité cellulaire: le paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire (par exemple, capacité des déshydrogénases mitochondriales cellulaires à réduire le colorant vital MTT), qui, selon l'effet mesuré et le protocole utilisé pour l'essai, est en corrélation avec le nombre total et/ou la vitalité des cellules.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Tableau 1

Substances chimiques de référence

Nom	Nº EINECS	Nº CAS	
Diamino-1,2 propane	201-155-9	78-90-0	Gravement corrosif
Acide acrylique	201-177-9	79-10-7	Gravement corrosif
O-tert. butylphénol	201-807-2	88-18-6	Corrosif
Hydroxyde de potassium (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Corrosif
Acide sulfurique (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Corrosif
Acide octanoïque (acide caprylique)	204-677-5	124-07-02	Corrosif
4-amino-1,2,4-triazole	209-533-5	584-13-4	Non corrosif
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Non corrosif
Bromure de phénétyle	203-130-8	103-63-9	Non corrosif
Perchloroéthylène	204-825-9	27-18-4	Non corrosif
Acide isostéarique	250-178-0	30399-84-9	Non corrosif
4-(méthylthio)-benzaldéhyde	222-365-7	3446-89-7	Non corrosif

La plupart des substances chimiques données ici proviennent de la liste des substances chimiques sélectionnées par le CEVMA dans son étude de validation internationale (4). Les choix du CEVMA sont fondés sur les critères suivants:

(i) nombre égal de substances corrosives et non corrosives;

(ii) substances disponibles dans le commerce et couvrant la plupart des classes chimiques pertinentes;

(iii) insertion de substances extrêmement corrosives et moins corrosives, de façon à permettre une distinction sur la base du pouvoir de corrosion;

▼B

(iv) substances chimiques manipulables en laboratoire sans présenter d'autres risques majeurs que la corrosivité.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance d'essai est généralement appliquée sur un modèle tridimensionnel de peau humaine, comprenant au moins un épiderme reconstitué avec un stratum corneum fonctionnel. Les matières corrosives sont identifiées sur la base de leur aptitude à réduire la viabilité cellulaire [déterminée, par exemple, à l'aide de l'essai de réduction du MTT (15)] en dessous de valeurs seuils définies pour des périodes d'exposition déterminées. Le principe de l'essai sur modèle de peau humaine s'appuie sur l'hypothèse selon laquelle les substances chimiques corrosives sont capables de pénétrer dans le stratum corneum par diffusion ou érosion, et sont suffisamment cytotoxiques pour les couches cellulaires sous-jacentes.

1.4.1. **Procédure**

1.4.1.1. *Modèles de peau humaine*

Les modèles de peau humaine peuvent être constitués pour l'étude, obtenus dans le commerce (par exemple, les modèles EpiDerm™ et EPISKIN™) (16) (17) (18) (19), ou encore mis au point et constitués dans le laboratoire d'essai (20) (21). Il est entendu que l'utilisation de la peau humaine est soumise à des conditions et considérations d'éthique admises d'ordre national et international. Tout nouveau modèle doit être validé (au moins dans la mesure indiquée au point 1.4.1.1.2). Les modèles de peau humaine utilisés pour cet essai doivent répondre aux conditions et critères suivants:

1.4.1.1.1 Conditions générales applicables au modèle:

L'épithélium doit être constitué à partir de kératinocytes humains. Le modèle doit avoir un stratum corneum fonctionnel avec plusieurs couches sous-jacente de cellules épithéliales vivantes, et comporter le cas échéant une couche stromale. Le stratum corneum doit comporter plusieurs couches, avec un profil lipidique suffisant pour assurer une fonction de barrière offrant une résistance à la pénétration rapide des marqueurs cytotoxiques. Par ailleurs, il est essentiel que le modèle présente des propriétés d'isolement afin que la substance d'essai ne puisse pas contourner le stratum corneum pour pénétrer dans les tissus vivants. En effet, une telle possibilité de contournement diminue la qualité de la modélisation de l'exposition de la peau. Enfin, le modèle de peau ne doit présenter aucune forme de contamination bactérienne (y compris par le mycoplasme) ou mycosique.

1.4.1.1.2 Conditions applicables au modèle fonctionnel:

L'amplitude de la viabilité cellulaire est généralement mesurée par le niveau MTT, ou autres colorants vitaux métaboliquement transformés. Dans ces cas, la densité optique (DO) du colorant (solubilisé) extrait du tissu de contrôle négatif doit être au moins 20 fois supérieure à la DO du solvant d'extraction seul [pour une présentation, voir la référence (22)]. Le tissu de contrôle négatif doit être stable en culture (c'est-à-dire qu'il doit présenter des mesures de viabilité comparables) pendant la durée de la période d'exposition. Le stratum corneum doit être suffisamment solide pour résister à la pénétration rapide de certains produits chimiques marqueurs cytotoxiques (par exemple, Triton X-100 à 1 %). Cette propriété peut être évaluée en fonction du temps d'exposition nécessaire pour réduire de moitié la viabilité cellulaire (TE_{50}) (par exemple, pour les modèles EpiDerm™ et EPISKIN™, cette période est > 2 heures). Par ailleurs, le tissu doit pouvoir être reproduit dans le temps et, de préférence, par différents laboratoires. Enfin, utilisé dans le protocole d'essai choisi, il doit permettre de prévoir le potentiel corrosif des substance chimiques de référence (voir le Tableau 1).

▼B

1.4.1.2. *Application des substances d'essai et de contrôle*

Deux tissus (répliques) sont utilisées pour chaque traitement (c'est-à-dire chaque durée d'exposition), y compris les contrôles. Pour les substances liquides, il faut appliquer une quantité suffisante de substance d'essai pour couvrir uniformément la surface cutanée (25 µl/cm^2 au minimum). Pour les substances solides, il faut appliquer une quantité suffisante de substance d'essai pour couvrir régulièrement la peau et ensuite l'humidifier avec de l'eau désionisée ou distillée pour assurer un bon contact avec la peau; si nécessaire, les substances solides doivent être réduites en poudre avant leur application. La méthode d'application doit convenir à la substance chimique mise à l'essai (5). À la fin de la période d'exposition, la surface cutanée doit être nettoyée avec soin afin d'éliminer la substance d'essai à l'aide d'une une solution tampon appropriée ou de NaCl à 0,9 pour cent.

Pour chaque étude, des contrôles positifs et négatifs doivent être utilisés parallèlement à la substance d'essai, de façon à garantir la qualité des résultats du modèle expérimental. Pour cet essai, les substances suggérées pour les contrôles positifs sont l'acide acétique glacial ou l'hydroxyde de potassium 8 N, et pour les contrôles négatifs, l'eau ou une solution NaCl à 0,9 pour cent.

1.4.1.3. *Mesures de la viabilité cellulaire*

Seules les méthodes quantitatives, validées peuvent être utilisées pour mesurer la viabilité cellulaire. En outre, la mesure de la viabilité doit être compatible avec une application sur un tissu tridimensionnel. La fixation de colorant non spécifique ne doit pas interférer avec la mesure de la viabilité. Par conséquent, les colorants dont la fixation utilise une protéine et ceux qui ne passent pas par une conversion métabolique (par exemple, le rouge neutre) sont à proscrire. L'essai le plus fréquemment employé est l'essai de réduction du MTT [Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bleu de thiazole; numéro EINECS: 206-069-5, numéro CAS 298-93-1)], qui donne des résultats précis et reproductibles (5), mais d'autres peuvent aussi être utilisés. L'échantillon de peau est placé dans une solution MTT à la concentration appropriée (par exemple, 0,3 - 1 mg/ml) à la température d'incubation voulue et pour une durée de 3 heures. Le précipité bleu de formazan est ensuite extrait à l'aide d'un solvant (isopropanol), puis on mesure la concentration du formazan en déterminant sa DO à une longueur d'onde comprise entre 540 et 595 nm.

L'action chimique de la substance d'essai sur le colorant vital est susceptible d'imiter celle du métabolisme cellulaire et, partant, de conduire à estimation erronée de la viabilité. Il a été montré que cela survient lorsque la substance d'essai n'est pas complètement éliminée par rinçage (9). Si la substance d'essai agit directement sur colorant vital, des contrôles supplémentaires doivent être pratiqués pour détecter et corriger les interférences de la substance avec la mesure de viabilité (9) (23).

2. **RÉSULTATS**

Pour chaque tissu, les valeurs de DO et les pourcentages calculés de viabilité cellulaire obtenus pour chaque substance d'essai, ainsi que pour les contrôles positifs et négatifs, sont présentés sous forme de tableau, y compris les données des essais répétés, le cas échéant les valeurs moyennes et individuelles.

▼B

2.1. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

La valeur de la DO du contrôle négatif représente une viabilité cellulaire arbitrairement fixée à 100 pour cent. Par conséquent, les valeurs de la DO obtenues pour chaque échantillon d'essai peuvent être utilisées pour calculer un pourcentage de viabilité par rapport au contrôle négatif. La valeur seuil du pourcentage de viabilité cellulaire qui établit la distinction entre les matières corrosives et les matières non corrosives (ou entre différentes classes de substances corrosives), ou encore la ou les procédures statistiques utilisées pour évaluer les résultats et identifier les substances corrosives, doivent être clairement définies et documentées. De même, il doit être démontré qu'elles sont appropriées. De manière générale, ces valeurs de seuil sont établies au cours de la phase d'optimisation de l'essai, testées dans une phase de pré-validation, puis confirmées ensuite dans une étude de validation. A titre d'exemple, l'évaluation de la corrosivité associée au modèle EpiDerm™ est la suivante (9):

La substance d'essai est considérée comme étant corrosive pour la peau:

(i) si la viabilité après 3 minutes d'exposition est inférieure à 50 pour cent, ou

(ii) si la viabilité après 3 minutes d'exposition est supérieure ou égale à 50 pour cent, et la viabilité après une heure d'exposition inférieure à 15 pour cent.

La substance d'essai est considérée comme étant non corrosive pour la peau:

(i) si la viabilité après 3 minutes d'exposition est supérieure ou égale à 50 pour cent, et la viabilité après une heure d'exposition supérieure ou égale à 15 pour cent.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir au moins les informations suivantes:

Substances d'essai et de contrôle:

— nom(s) chimique(s), tels que le nom IUPAC ou CAS, et le cas échéant le numéro CAS;

— pureté et composition de la substance ou la préparation (en pourcentage(s) en poids);

— propriétés physico-chimiques (telles que l'état physique, le pH, la stabilité, l'hydrosolubilité) utiles pour la conduite de l'étude:

— le cas échéant, traitement des substances d'essai et de contrôle avant l'essai (par exemple, chauffage, réduction en poudre);

— stabilité (si connue)

Justification du choix du modèle de peau et du protocole utilisé.

Conditions d'essai:

— système cellulaire utilisé

— information sur l'étalonnage du dispositif utilisé pour la mesure de la viabilité cellulaire (un spectrophotomètre, par exemple)

▼B

— information complète à l'appui du modèle spécifique de peau humaine, et notamment sa validité

— détails de la procédure d'essai utilisée

— doses d'essai utilisées

— description de toute modification éventuelle de la procédure d'essai

— référence aux données historiques du modèle

— description des critères d'évaluation utilisés

Résultats:

— présentation sous forme de tableau des résultats de chaque échantillon d'essai

— description des autres effets observés.

Discussion des résultats

Conclusions

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) OCDE (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. Série de l'OCDE sur les essais et évaluations, numéro 33, ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001 doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

(2) Méthode d'essai B.4. Toxicité aiguë: irritation/corrosion cutanée.

(3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23, 219-255.

(4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. In Vitro 12, 471-482.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxic.* In Vitro 12, 483-524.

(6) OCDE (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.

(7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.

(8) CEVMA (Comité de coordination interagences sur la validation des méthodes alternatives). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

▼B

(9) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C, Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C, Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, pp. 371-401.

(10) CEVMA (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(11) CEVMA (2000). ECVAM News & Views. ATLA 28, 365-67.

(12) CEVMA (Comité de coordination interagences sur la validation des méthodes alternatives) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/episjird.pdf.

(13) OCDE (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st - 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

(14) Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.

(15) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity asssays. J.Immunol. Meth. 65, 55-63.

(16) Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. In Vitro 8, 889-891.

(17) Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, 211 -225.

(18) Tinois E, Gaetani Q, Gayraud B, Dupont D, Rougier A, Pouradier DX (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In In vitro Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach: 133-140

(19) Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, Thivolet J (1991). In vitro and post — transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193: 310-319

(20) Parentau, NX., Bilbo, P., Molte, C J., Mason, V.S., and Rosenberg, H. (1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, 163-171.

(21) Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, NX. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8. 747-756.

▼B

(22) Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, SJ. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, 69- 84.

(23) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne', C, Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A. (2001). A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxic. *In Vitro* 15, 57-93.

▼B

B.41. **ESSAI DE PHOTOTOXICITE IN VITRO 3T3 NRU**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 432 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La phototoxicité est définie comme un effet toxique dû à l'application d'une substance sur le corps, qui est soit déclenché ou accentué (et visible à des niveaux de dose faibles) après une exposition ultérieure à la lumière, soit provoqué par l'irradiation de la peau après administration d'une substance par voie systémique.

Le test de phototoxicité in vitro 3T3 NRU permet de déterminer le potentiel phototoxique d'une substance d'essai induit par l'excitation du produit chimique après exposition à la lumière. Cet essai évalue la réduction relative de la viabilité des cellules exposées au produit chimique, en présence ou en l'absence de lumière. Les substances identifiées par cet essai sont susceptibles d'être phototoxiques in vivo après administration systémique et diffusion dans la peau, ou après application topique.

Des effets phototoxiques ont été signalés pour de nombreux types de produits chimiques (1) (2) (3) (4). Le point commun entre ces derniers est leur capacité à absorber l'énergie lumineuse dans la plage de la lumière solaire. D'après la première loi de photochimie (loi de Grotthaus-Draper), la photoréaction nécessite l'absorption d'un nombre suffisant de quanta de lumière. Aussi convient-il, avant d'envisager un essai biologique, de déterminer le spectre d'absorption UV/lumière visible du produit chimique à tester suivant la ligne directrice 101 de l'OCDE. Si le coefficient d'extinction/d'absorption molaire est inférieur à 10 litres × mol^{-1} × cm^{-1}, le produit chimique n'a pas de potentiel photoréactif et il est inutile de le soumettre à l'essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU ou à tout autre test biologique visant à détecter des effets photochimiques indésirables (1) (5). Voir également l'annexe 1.

Les résultats de l'essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU récemment évalué (6) (7) (8) (9) ont été comparés aux effets de phototoxicité aiguë in vivo chez les animaux et chez les humains, et l'essai s'est révélé fiable pour la prévision de ces effets. L'essai n'est pas conçu pour prévoir d'autres effets nocifs susceptibles de résulter de l'action combinée d'un produit chimique et de la lumière, tels que la photogénotoxicité, la photo-allergie, et la photocancérogénicité, et il ne permet pas non plus d'évaluer le pouvoir phototoxique. Par ailleurs, cet essai n'est pas conçu pour prendre en compte les mécanismes indirects de la phototoxicité, les effets des métabolites de la substance d'essai, ou les effets des mélanges.

Alors que l'utilisation de systèmes d'activation métabolique est nécessaire en règle générale pour tous les tests in vitro de prédiction du potentiel génotoxique ou cancérogène, dans le cas de la phototoxicologie, on ne dispose jusqu'à présent que de rares exemples de produits chimiques qui nécessitent une transformation métabolique pour agir comme une phototoxine in vivo ou in vitro. Par conséquent, il ne paraît pas utile ni scientifiquement fondé de réaliser le présent essai en présence d'un système d'activation métabolique.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

Irradiance: intensité du rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, mesurée en W/m^2 ou en mW/cm^2.

Dose de lumière: quantité (= intensité × temps) de rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, exprimée en Joules (= W × s) par unité de surface, par exemple, J/m^2 ou J/cm^2.

Bandes de longueurs d'ondes de la lumière UV: les désignations recommandées par la CIE (Commission internationale de l'éclairage) sont: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) et UVC (100-280 nm). D'autres désignations sont également utilisées; la limite entre UVB et UVA est souvent placée à 320 nm, et les UVA peuvent être subdivisés en UV-A1 et UV-A2 avec une limite à environ 340 nm.

Viabilité cellulaire: paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire (par exemple, absorption du colorant vital rouge neutre dans les lysosomes cellulaires), qui, en fonction de l'effet mesuré et du type de test utilisé, correspond au nombre total et/ou à la vitalité des cellules.

Viabilité cellulaire relative: viabilité cellulaire exprimée par rapport aux témoins négatifs (solvant) qui ont été prélevés tout ou long de la procédure (soit +Irr soit -Irr), mais non traités par un produit chimique.

PIF (Photo Irritation Factor — Facteur de photo-irritation): facteur obtenu en comparant deux concentrations cytotoxiques efficaces (CE_{50}) de la substance chimique d'essai, obtenues en absence (-Irr) ou en présence (+Irr) d'une irradiation non cytotoxique par un rayonnement UVA/visible.

CE_{50}: concentration de la substance chimique d'essai à laquelle la viabilité cellulaire est réduite de 50 pour cent.

MPE (Mean Photo Effect — Photo-effet moyen): mesure dérivée d'une analyse mathématique du tracé de deux courbes concentration-effet obtenues avec (+Irr) ou sans (-Irr) irradiation non cytotoxique par un rayonnement UVA/visible.

Phototoxicité: réaction toxique aiguë apparaissant après une première exposition de la peau à certains produits chimiques et exposition subséquente à la lumière, ou déclenchée par l'irradiation de la peau après administration systémique d'un produit chimique.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Le test de phototoxicité in vitro 3T3 NRU repose sur la comparaison de la cytotoxicité d'une substance chimique avec et sans exposition à une dose non cytotoxique de lumière solaire simulée. Dans cet essai, la cytotoxicité est exprimée comme la diminution, en fonction de la concentration, de la fixation du colorant vital rouge neutre [Neutral Red — NR] 24 heures après traitement par le produit chimique mis à l'essai et irradiation (10). Le rouge neutre est un colorant cationique faible qui pénètre facilement dans les membranes cellulaires par non-diffusion, et s'accumule au niveau intracellulaire dans les lysosomes. L'altération de la surface cellulaire de la membrane lysosomale sensible entraîne une fragilité lysosomale et d'autres modifications qui deviennent graduellement irréversibles. Ces modifications induites par l'action de xénobiotiques entraînent une diminution de la fixation du rouge neutre, sur la base de laquelle on peut distinguer les cellules vivantes, des cellules mortes ou abîmées.

▼B

Des cellules Balb/c 3T3 sont maintenues en culture pendant 24 heures jusqu'à formation de monocouches. Pour chaque substance chimique à tester, deux plaques à 96 puits sont alors préincubées pendant 1 heure avec 8 concentrations distinctes de la substance chimique. Ensuite, l'une des deux plaques est exposée à la dose d'irradiation non cytotoxique la plus élevée, tandis que l'autre plaque est maintenue à l'obscurité. Dans les deux plaques, le milieu de traitement est ensuite remplacé par un milieu de culture et, après une nouvelle période d'incubation de 24 heures, la viabilité cellulaire est déterminée par le test de fixation du rouge neutre (Neutral Red Uptake — NRU). La viabilité cellulaire relative, exprimée sous forme d'un pourcentage des témoins de solvant non traités, est calculée pour chaque concentration d'essai. Afin de prévoir le potentiel phototoxique, les réponses aux concentrations obtenues en présence et en absence d'irradiation sont comparées, généralement au niveau CE_{50}, c'est-à-dire la concentration inhibant la viabilité cellulaire de 50 pour cent par rapport aux témoins non traités.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1 **Préparations**

1.4.1.1 *Cellules*

Une lignée permanente de cellules de fibroblaste de souris, Balb/c 3T3, clone 31, provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginie, Etats-Unis), ou de l'ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, Royaume-Uni) a été utilisée dans l'étude de validation et il est donc recommandé que les cellules proviennent d'un dépositaire de cellules bien qualifié. D'autres cellules ou lignées cellulaires peuvent aussi donner de bons résultats avec le même protocole d'essai si les conditions de culture sont adaptées aux besoins spécifiques des cellules. Il convient toutefois d'en démontrer l'équivalence.

Les cellules doivent être régulièrement contrôlées pour vérifier l'absence de contamination par des mycoplasmes, et ne doivent être utilisées que si aucun n'est trouvé (11).

Il importe de contrôler régulièrement la sensibilité aux UV des cellules Balb/c 3T3 selon la procédure de contrôle qualité décrite dans la présente méthode. Dans la mesure où la sensibilité aux UVA des cellules peut augmenter avec le nombre de passages, il convient d'utiliser des cellules Balb/c 3T3 ayant subi le moins de passages possibles, de préférence moins de 100 (voir point 1.4.2.2.2 et annexe 2).

1.4.1.2. *Milieux et conditions de culture*

Des milieux de culture et des conditions d'incubation appropriés doivent être utilisés pour le passage systématique des cellules et pendant la procédure d'essai. Par exemple, pour les cellules Balb/c 3T3, le milieu de culture est du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) enrichi avec 10 pour cent de sérum de veau nouveau-né, de glutamine (4mM), de pénicilline (100 UI) et de streptomycine (100 µg/ml), et incubé à 37 ºC en atmosphère humidifiée, avec une teneur en CO_2 de 5 à 7,5 pour cent selon le tampon (voir point 1.4.1.4, second paragraphe). Il est particulièrement important que les conditions de culture cellulaire permettent de maintenir la durée du cycle cellulaire dans les limites normales historiques des cellules ou de la lignée cellulaire utilisées.

1.4.1.3 *Préparation des cultures*

Des cellules provenant de cultures mères congelées sont mises en culture à une densité appropriée dans le milieu de culture, et sont repiquées au moins une fois avant d'être utilisées pour le test de phototoxicité in vitro 3T3 NRU.

▼B

Pour le test de phototoxicité, le milieu de culture est ensemencé avec une densité de cellules telle que les cultures n'arrivent pas à confluence avant la fin de l'essai, c'est-à-dire au moment où la viabilité cellulaire est déterminée, 48 heures après la mise en culture des cellules. Pour les cellules Balb/c 3T3 cultivées sur des plaques à 96 puits, la densité cellulaire recommandée est de 1×10^4 cellules par puits.

Pour chaque substance chimique testée, les cellules sont mises en culture de manière identique sur deux plaques à 96 puits distinctes, qui sont utilisées parallèlement pendant toute la procédure d'essai, dans les mêmes conditions de culture, sauf pendant la période où l'une des plaques est irradiée (+ Irr) et l'autre maintenue à l'obscurité (- Irr).

1.4.1.4 *Préparation de la substance d'essai*

Les substances chimiques de l'essai doivent être fraîchement préparées, juste avant utilisation, à moins que les données de stabilité ne démontrent qu'elles sont conservables. Il est recommandé de procéder à la manipulation des substances chimiques et au traitement initial des cellules dans des conditions d'éclairage permettant d'éviter la photoactivation ou la dégradation de la substance d'essai avant irradiation.

Les substances chimiques de l'essai doivent être dissoutes dans des solutions salines tamponnées, par exemple, solution saline équilibrée de Earl (Earl's Balanced Salt Solution — EBSS) ou d'autres solutions tamponnées physiologiquement équilibrées, exemptes de constituants protéiques qui absorbent la lumière (par exemple, indicateurs pH colorés et vitamines), afin d'éviter les interférences lors de l'irradiation. Sachant que, pendant l'irradiation, les cellules sont maintenues pendant 50 minutes environ en dehors de l'incubateur CO_2, des précautions doivent être prises pour éviter l'alcalinisation. Avec des solutions faiblement tamponnées, telles que l'EBSS, il convient alors d'incuber les cellules à 7,5 pour cent de CO_2. Si les cellules sont incubées à 5 pour de CO_2 seulement, un tampon plus fort doit être utilisé.

Les substances chimiques ayant une solubilité limitée dans l'eau doivent être dissoutes dans des solvants appropriés. Si un solvant est utilisé, il doit être présent à un volume constant dans toutes les cultures, c'est-à-dire dans les témoins négatifs (solvant) et dans toutes les concentrations de la substance chimique d'essai, et être en outre non cytotoxique à la concentration utilisée. Les concentrations de la substance chimique doivent être sélectionnées de façon à éviter les précipités ou les solutions troubles.

Les solvants recommandés sont le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'éthanol (EtOH). D'autres solvants de faible cytotoxicité peuvent convenir, mais leurs propriétés spécifiques doivent être évaluées avant utilisation, notamment les risques de réaction avec la substance chimique d'essai, l'atténuation de l'effet phototoxique, les propriétés de fixation des radicaux, et/ou la stabilité du produit chimique dans le solvant.

Si nécessaire, on peut recourir à un mélangeur Vortex et/ou à la sonication et/ou à un chauffage à des températures appropriées pour faciliter la solubilisation, à moins qu'une telle manipulation n'affecte la stabilité de la substance chimique.

▼B

1.4.1.5 *Conditions d'irradiation*

1.4.1.5.1 Source de lumière

Le choix d'une source de lumière et d'un filtrage appropriés est le facteur déterminant dans les essais de phototoxicité. Les domaines des UVA et de la lumière visible sont généralement associés à des réactions phototoxiques in vivo (3) (12), tandis que les UVB sont moins pertinents, mais très cytotoxiques, avec une cytotoxicité qui augmente d'un facteur 1 000 entre 313 et 280 nm (13). Parmi les critères présidant au choix de la source de lumière appropriée, il est essentiel que la source de lumière émette des longueurs d'onde absorbées par la substance chimique d'essai et que la dose de lumière (pouvant être obtenue dans un délai d'exposition raisonnable) soit suffisante pour détecter les substances photocytotoxiques connues. En outre, les longueurs d'onde et les doses employées ne doivent pas trop endommager le système d'essai, par exemple par l'émission de chaleur (domaine infrarouge).

La lumière solaire simulée par des simulateurs solaires est considérée comme la source optimale de lumière artificielle. La distribution du pouvoir d'irradiation du simulateur solaire filtré doit être proche de celle de la lumière du jour extérieure donnée dans le document (14). Des arcs au xénon ou des arcs aux halogénures de métal-mercure (dopé) peuvent être utilisés comme simulateurs solaires (15). Ces derniers ont l'avantage d'émettre moins de chaleur et d'être moins chers, mais ils reproduisent moins bien la lumière solaire que les simulateurs utilisant des arcs au xénon. Dans la mesure où tous les simulateurs solaires émettent d'importantes quantités d'UVB, ils doivent être équipés de filtres adéquats pour atténuer les longueurs d'onde UVB hautement cytotoxiques. Dans la mesure où les matériaux plastiques utilisés pour les cultures cellulaires contiennent des stabilisateurs UV, le spectre doit être mesuré à travers le même type de plaques à 96 puits que celui employé dans l'essai. Abstraction faite des mesures prises pour atténuer une part du spectre par filtration, ou des effets de filtre inévitables liés aux appareils, le spectre enregistré sous ces filtres ne doit pas dévier de la norme de lumière du jour extérieure (14). Les documents (8) (16) donnent un exemple de distribution de l'irradiance spectrale du simulateur solaire équipé de filtres qui a été utilisé dans l'étude de validation du test in vitro 3T3 NRU. Voir également la Figure 1 de l'annexe 2.

1.4.1.5.2. Dosimétrie

L'intensité de lumière (irradiance) doit être régulièrement contrôlée avant chaque essai de phototoxicité, à l'aide d'un radiomètre UV à large bande approprié. L'intensité doit être mesurée à travers le même type de plaques à 96 puits que celui employé dans l'essai. Le radiomètre UV doit avoir été étalonné par rapport à la source. Les performances du radiomètre UV doivent être contrôlées. À cet effet, on recommande l'utilisation d'un second radiomètre UV de référence, du même type et étalonné de la même façon. Dans l'idéal, à intervalles plus grands, il conviendrait d'utiliser un spectroradiomètre pour mesurer l'irradiance spectrale de la source de lumière filtrée et pour vérifier l'étalonnage du radiomètre UV à large bande.

Une dose de 5 J/cm^2 (dans la plage des UVA) est non cytotoxique pour les cellules Balb/c 3T3 et suffisamment puissante pour exciter les substances chimiques et déclencher des réactions phototoxiques (6) (17). Par exemple, pour obtenir 5 J/cm^2 dans un délai de 50 minutes, l'irradiance a été réglée à 1,7 mW/cm^2. Voir la Figure 2 de l'annexe 2. En cas d'utilisation d'une autre lignée cellulaire ou d'une source de lumière différente, il peut s'avérer nécessaire d'ajuster la dose d'irradiation en choisissant une dose qui ne soit pas nocive pour les cellules tout en étant suffisante pour exciter les phototoxines standard. La durée de l'exposition à la lumière se calcule de la façon suivante:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{irradiation dose } (J/cm^2) \times 1000}{\text{irradiance } (mW/cm^2) \times 60} \qquad (1\ \text{J} = 1\ \text{Wsec})$$

1.4.2 **Conditions d'essai**

1.4.2.1 *Concentrations de la substance d'essai*

Les plages de concentrations du produit chimique testé en présence (+Irr) et en absence (-Irr) de lumière doivent être déterminées de manière adéquate lors d'expériences préalables. Il peut être utile d'évaluer la solubilité au début puis après un délai de 60 minutes (ou à la durée employée dans l'essai), dans la mesure où celle-ci peut varier avec le temps ou au cours de l'exposition. Pour éviter toute toxicité induite par des conditions de culture inappropriées ou des substances chimiques hautement acides ou alcalines, il faut que le pH des cultures cellulaires, auxquelles la substance d'essai a été ajoutée, soit dans une plage comprise entre 6,5 et 7,8.

La concentration la plus élevée de la substance d'essai doit être dans les conditions d'essai physiologiques, par exemple le stress pH ou osmotique doit être évité. Selon la substance d'essai, il peut s'avérer nécessaire d'envisager d'autres propriétés physico-chimiques comme facteurs limitant la concentration d'essai la plus élevée. Pour les substances relativement insolubles, mais non toxiques à des concentrations allant jusqu'au point de saturation, il y a lieu de procéder à des essais pour déterminer la concentration la plus élevée qui puisse être atteinte. De manière générale, il y a lieu d'éviter les effets de précipités de la substance chimique à toutes les concentrations d'essai. La concentration maximale d'une substance d'essai ne doit pas dépasser 1 000 μg/ml, et l'osmolarité ne doit pas dépasser 10 milliosmoles. Il convient d'utiliser une série de dilutions en progression géométrique comprenant 8 concentrations de la substance d'essai avec un facteur de dilution constant (voir point 2.1, second paragraphe).

Si les informations provenant d'expériences préalables établissent qu'une substance chimique n'est pas cytotoxique jusqu'à la concentration limite dans l'obscurité (-Irr), mais se révèle hautement cytotoxique exposée à la lumière (+Irr), les plages de concentrations à choisir pour l'expérience (+Irr) peuvent être différentes de celles utilisées pour l'expérience (-Irr), de façon à garantir une qualité adéquate des résultats.

1.4.2.2 *Contrôles/Témoins*

1.4.2.2.1. Sensibilité des cellules aux radiations, données historiques:

la sensibilité des cellules à la source lumineuse doit être régulièrement contrôlée (tous les cinq passages environ), par évaluation de leur viabilité après une exposition à des doses croissantes d'irradiation. Pour cette évaluation, plusieurs doses d'irradiation doivent être utilisées, y compris des niveaux significativement supérieurs à ceux de l'essai de phototoxicité 3T3 NRU. La méthode la plus simple pour quantifier ces doses consiste à mesurer les UV à la source. Les cellules sont mises en culture à la densité utilisée dans l'essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU. Elles sont irradiées le jour suivant, et la viabilité cellulaire est déterminée un jour plus tard à l'aide du test NRU. Il faut alors que la dose non cytotoxique la plus élevée (par exemple, 5 J/cm^2 [UVA] dans l'étude de validation) soit suffisante pour classer correctement les substances de référence (Tableau 1).

▼B

1.4.2.2.2. Sensibilité aux radiations, contrôle de l'essai en cours:

l'essai répond aux critères de qualité si les témoins de contrôle négatifs (solvant) irradiés ont une viabilité supérieure ou égale à 80 pour cent de celle des témoins de contrôle négatifs non irradiés.

1.4.2.2.3. Viabilité des témoins de solvant

la densité optique absolue (OD_{540} NRU), mesurée dans l'extrait NR des témoins de solvant indique si les 1×10^4 cellules mises en culture par puits se sont développées avec un temps de doublement normal pendant les deux jours de l'essai. Un essai répond aux critères d'acceptation si la densité optique moyenne OD_{540} NRU des témoins non traités est > 0,4 (c'est-à-dire approximativement vingt fois l'absorbance de fond du solvant).

1.4.2.2.4 Témoin positif:

Pour chaque essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU réalisé, un produit chimique phototoxique connu doit être testé concurremment. La chlorpromazine (CPZ) est recommandée. Dans le cas de la CPZ testée selon le protocole standard dans le test de phototoxicité in vitro 3T3 NRU, les critères d'acceptation suivants ont été définis: CPZ irradiée (+Irr): CE_{50} = 0,1 à 2,0 µg/ml; CPZ non irradiée (-Irr): CE_{50} = 7,0 à 90,0 µg/ml. Le facteur de photo-irritation (PIF) doit être > 6. Les données historiques du témoin positif doivent être suivies.

À la place de la CPZ, d'autres produits chimiques phototoxiques convenant à la classe chimique ou aux caractéristiques de solubilité de la substance chimique à tester, peuvent aussi être utilisés en tant que témoins positifs parallèles.

1.4.3 **Mode opératoire (6) (7) (8) (16) (17):**

1.4.3.1 *Premier jour:*

Verser 100 µl de milieu de culture dans les puits périphériques d'une plaque de microtitrage de culture tissulaire à 96 puits (= essais à blanc). Dans les puits restants, verser 100 µl d'une suspension cellulaire de 1×10^5 cellules/ml en milieu de culture, (= 1×10^4 cellules/puits). Préparer deux plaques pour chaque série des concentrations de la substance à tester, ainsi que pour les témoins négatifs (de solvant) et positifs.

Incuber les cellules pendant 24 heures (voir point 1.4.1.2) jusqu'à formation d'une monocouche semi-confluente. Cette période d'incubation permet la récupération et l'adhérence des cellules, et leur croissance exponentielle.

1.4.3.2 *Deuxième jour:*

Après incubation, décanter le milieu de culture pour le séparer des cellules et laver délicatement avec 150µl de la solution tamponnée utilisée pour l'incubation. Ajouter 100 µl de la solution tamponnée contenant la concentration appropriée de la substance chimique à tester, ou uniquement du solvant (témoin négatif). Appliquer 8 concentrations distinctes de la substance chimique à tester. Incuber les cellules avec la substance chimique à tester dans l'obscurité pendant 60 minutes (voir points 1.4.1.2 et 1.4.1.4, second paragraphe).

Sur les deux plaques préparées pour chaque série de concentrations, ainsi que pour les témoins, une plaque est sélectionnée, généralement au hasard, pour la détermination de la cytotoxicité (-Irr) (par exemple, la plaque témoin), et l'autre (la plaque de traitement) pour la détermination de la photocytotoxicité (+Irr).

▼B

Pour réaliser la partie (+Irr) de l'essai, irradier les cellules à température ambiante pendant 50 minutes environ à travers le couvercle de la plaque à 96 puits, à la dose maximale de radiations non cytotoxique (voir également annexe 2). Conserver les plaques identiques non irradiées (-Irr) à température ambiante dans une boîte obscure pendant 50 minutes (= durée de l'exposition à la lumière).

Décanter la solution d'essai et laver deux fois avec 150 µl de la solution tamponnée utilisée pour l'incubation, mais ne contenant pas la substance d'essai. Remplacer le tampon par le milieu de culture et incuber (voir le point 1.4.1.2) jusqu'au lendemain (18-22 heures).

1.4.3.3 *Troisième jour:*

1.4.3.3.1 Évaluation microscopique

Examiner les cellules au microscope à contraste de phase. Noter la croissance, la morphologie et l'intégrité de la monocouche. Les changements morphologiques et les effets sur la croissance cellulaire doivent être enregistrés.

1.4.3.3.2 Test de fixation du rouge neutre

Laver les cellules avec 150 µl de la solution tamponnée préchauffée. Éliminer la solution de lavage en tapotant légèrement. Ajouter 100 µl d'un rouge neutre (3-amino-7-diméthylamino-2-méthylphénazine chlorhydrate, numéro EINECS 209-035-8; numéro CAS 553-24-2; CI. 50040) à 50 µg/ml dans un milieu sans sérum (16) et incuber comme décrit au point 1.4.1.2., pendant 3 heures. Après incubation, éliminer le milieu NR et laver les cellules avec 150 µl du tampon. Décanter et évacuer complètement le tampon en excès par absorption ou centrifugation.

Ajouter exactement 150 µl de solution de désorption NR (solution fraîchement préparée de 49 parts d'eau + 50 parts d'éthanol + 1 part d'acide acétique).

Passer rapidement la plaque de microtitrage à l'agitateur pendant 10 minutes, jusqu'à ce que le NR soit extrait des cellules et forme une solution homogène.

Mesurer la densité optique de l'extrait de NR à 540 nm dans un spectrophotomètre en utilisant les essais à blanc comme référence. Sauvegarder les données dans un format de fichier électronique approprié en vue d'une analyse ultérieure.

2. RÉSULTATS

2.1. QUALITÉ ET QUANTITÉ DES DONNÉES

Les données d'essai doivent permettre une analyse significative des courbes concentration-effet obtenues avec et sans irradiation, et si possible de la concentration de la substance d'essai à laquelle la viabilité cellulaire est réduite de moitié (CE_{50}). Si on constate une cytotoxicité, il y a lieu d'ajuster à la fois la gamme des concentrations et l'intervalle entre chaque concentration, afin qu'il y ait concordance entre la courbe et les données expérimentales.

Pour les résultats clairement positifs ou clairement négatifs (voir point 2.3), l'expérience principale, étayée par une ou plusieurs expériences préliminaires de détermination des gammes de concentrations, est généralement suffisante.

▼B

Les tests qui donnent des résultats équivoques, limites ou incertains doivent être vérifiés par un essai supplémentaire (voir également point 2.4, second paragraphe). Si cet essai s'avère nécessaire, il peut être utile de faire varier les conditions expérimentales, et notamment la plage ou l'espacement des concentrations, le temps de préincubation, et le temps d'exposition à l'irradiation. Une réduction de cette durée d'exposition peut présenter un intérêt pour les produits chimiques instables dans l'eau.

2.2. ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Pour procéder à l'évaluation des données, il peut être nécessaire de calculer un facteur de photo-irritation (PIF) ou un photo-effet moyen (MPE).

Pour le calcul des mesures de photocytotoxicité (voir ci-après), l'ensemble des valeurs discrètes de concentration-effet doit être déterminé par une courbe concentration-effet continue appropriée (modèle). On fait généralement concorder la courbe aux données en appliquant une méthode de régression non linéaire (18). Pour évaluer l'influence de la variabilité des données sur la courbe ajustée, il est recommandé d'employer une procédure de type «bootstrap».

On calcule un facteur de photo-irritation (PIF) à l'aide de la formule suivante:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

S'il n'est pas possible de calculer une CE_{50} en présence ou en l'absence de lumière, il ne sera pas possible de déterminer un PIF pour la substance d'essai. Le photo-effet moyen (MPE) est une mesure basée sur une comparaison des courbes concentration-effet complètes (19). Il correspond à la moyenne pondérée d'un ensemble représentatif de valeurs du photo-effet:

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Le photo-effet PEc à une concentration C est défini comme le produit de la réponse-effet RE_C et de la dose-effet DE_C, soit $PE_C = RE_C \times DE_C$. La réponse-effet RE_C correspond à la différence entre les réponses observées en absence et en présence de lumière, soit $RE_C = R_C$ (-Irr) — R_C (+Irr). La dose-effet est donnée par la formule suivante

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

où C* représente la concentration équivalence, c'est-à-dire la concentration à laquelle la réponse +Irr est équivalente à la réponse -Irr à la concentration C. S'il n'est pas possible de déterminer C* parce que les valeurs de la courbe +Irr sont systématiquement supérieures ou inférieures à RC (-Irr), la dose-effet est fixée à 1. Les facteurs de pondération w_1 sont donnés par la valeur la plus élevée, soit $w_i = MAX \{R_i (+Irr), R_i (-Irr)\}$. La grille de concentration C_i est choisie de façon à ce que le même nombre de points figure dans chaque intervalle de concentration défini par les valeurs de concentration utilisées dans l'expérience. Le calcul du MPE est limité par la valeur de concentration maximale à laquelle au moins une des deux courbes montre une valeur de réponse d'au moins 10 pour cent. Si cette concentration maximale est supérieure à la concentration la plus élevée utilisée dans l'expérience +Irr, la partie résiduelle de la courbe +Irr est ajustée à la valeur de réponse «0». La substance chimique est ensuite classée ou non comme étant phototoxique, selon que la valeur MPE est supérieure ou non à une valeur de seuil correctement choisie ($MPE_C = 0,15$).

▼B

Un logiciel de calcul du PIF et du MPE est disponible (20).

2.3. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Sur la base de l'étude de validation (8), une substance d'essai dont le PIF est < 2 ou le MPE < 0,1 ne présente «aucune phototoxicité». Un PIF > 2 et < 5 ou un MPE > 0,1 et < 0,15 indique une «phototoxicité probable» et un PIF > 5 ou un MPE > 0,15 indique une «phototoxicité».

Pour les laboratoires qui entreprennent cet essai pour la première fois, il est préconisé de procéder à un essai sur les substances de référence données dans le Tableau 1, avant d'entreprendre l'évaluation phototoxique de substances d'essai. Les valeurs PIF ou MPE doivent être proches des valeurs données dans le tableau 1.

Tableau 1

Nom de la substance chimique	Nº EINECS	Nº CAS	PIF	MPE	Pic d'absorption	Solvant (1)
Amiodarone chlorhydrate	243-293-2	[19774-82-4]	>3,25	0,27 - 0,54	242 nm 300 nm (épaulement)	éthanol
Chlorpromazine chlorhydrate	200-701-3	[69-09-0]	>14,4	0,33 - 0,63	309 nm	éthanol
Norfloxacine	274-614-4	[70458-96-7]	>71,6	0,34 - 0,90	316 nm	acétonitrile
Anthracène	204-371-1	[120-12-7]	>18,5	0,19 - 0,81	356 nm	acétonitrile
Protoporphyrine IX, disodium	256-815-9	[50865-01-5]	>45,3	0,54 - 0,74	402 nm	éthanol
L — Histidine		[7006-35-1]	pas de PIF	0,05 - 0,10	211 nm	eau
Hexachlorophene	200-733-8	[70-30-4]	1,1 - 1,7	0,00 - 0,05	299 nm 317nm (épaulement)	éthanol
Sulfate de sodium et de dodécyle	205-788-1	[151-21-3]	1,0 - 1,9	0,00 - 0,05	pas d'absorption	eau

(1) Solvant utilisé pour mesurer l'absorption.

2.4. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Si des effets phototoxiques ne sont observés qu'à la concentration d'essai maximale (en particulier pour les substances d'essai solubles dans l'eau), d'autres investigations peuvent s'avérer nécessaires pour évaluer les risques. Il peut s'agir notamment d'étudier l'absorption cutanées et l'accumulation du produit chimique dans la peau, et/ou de soumettre le produit à un autre type d'essai, en recourant par exemple à des essais in vitro sur peau humaine ou animale, ou sur modèle de peau.

▼B

En revanche, si aucune toxicité n'a été mise en évidence (+Irr et -Irr) et si la solubilité faible du produit dans l'eau a limité les concentrations d'essai, il faut peut-être s'interroger sur l'adéquation du système d'essai pour la substance à tester, et envisager un essai de confirmation avec un autre modèle.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir au minimum les informations suivantes:

Substance d'essai:

— données d'identification, nom générique commun et numéros IUPAC et CAS si connus

— nature physique et pureté

— propriétés physico-chimiques importantes pour la réalisation de l'étude

— spectre d'absorption UV/lumière visible

— stabilité et photostabilité si connues

Solvant:

— justification du choix du solvant

— solubilité de la substance d'essai dans le solvant

— pourcentage de solvant présent dans le milieu de traitement

Cellules:

— type et provenance des cellules

— absence de mycoplasmes

— nombre de passages cellulaires, si connu

— sensibilité des cellules aux radiations, déterminée avec l'appareil d'irradiation utilisé dans l'essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU.

Conditions expérimentales (1) *incubation avant et après traitement:*

— type et composition du milieu de culture

— conditions d'incubation (concentration de CO_2, température, humidité)

— durée de l'incubation (avant traitement et après traitement)

Conditions expérimentales (2) *traitement par la substance chimique:*

— justification du choix des concentrations de substance d'essai utilisées, en présence et en absence de rayonnement

— en cas de solubilité limitée du produit chimique et d'absence de cytotoxicité, justification de la concentration maximale utilisée

— type et composition du milieu de traitement (solution saline tamponnée)

— durée du traitement chimique.

Conditions expérimentales (3) *Irradiation:*

— justification de la source de lumière utilisée

▼B

— fabricant et type de source de lumière et de radiomètre

— caractéristiques d'irradiance spectrale de la source de lumière

— caractéristiques de transmission/absorption du (des) filtre(s) utilisé(s)

— caractéristiques du radiomètre et modalités d'étalonnage

— distance entre la source de lumière et le système d'essai

— irradiance UVA à cette distance, exprimée en mW/cm^2

— durée de l'exposition UV/lumière visible

— dose d'UVA (irradiance × temps), exprimée en J/cm^2

— température appliquée aux cultures cellulaires durant l'irradiation et aux cultures cellulaires maintenues concurremment dans l'obscurité.

Conditions expérimentales (4) *test NRU:*

— composition du milieu de traitement NR

— durée de l'incubation dans NR

— conditions d'incubation (concentration de CO^2, température, humidité)

— d'extraction du NR (agent d'extraction, durée)

— longueur d'ondes utilisée pour la lecture spectrophotométrique de la densité optique du NR

— seconde longueur d'ondes (référence), le cas échéant

— contenu de l'échantillon destiné à l'essai à blanc du spectrophotomètre, le cas échéant.

Résultats:

— viabilité cellulaire obtenue pour chaque concentration de la substance d'essai, exprimée en pour cent de la viabilité moyenne des témoins de solvant

— courbes de concentration-effet (concentration de la substance chimique — viabilité cellulaire relative) obtenues dans les expériences +Irr et -Irr parallèles

— analyse des courbes concentration-effet: si possible, calcul/détermination des CE_{50} (+Irr) et CE_{50} (-Irr)

— comparaison des deux courbes concentration-effet obtenues en présence et en l'absence de rayonnement, soit par le calcul du facteur de photo-irritation (PIF), soit par le calcul du photo-effet moyen (MPE)

— critères d'acceptation de l'essai, témoin négatif (solvant) simultané:

— viabilité absolue (densité optique de l'extrait de NR) des cellules irradiées et des cellules non irradiées

— données historiques sur les témoins négatif et de solvant, moyennes et écarts types

— critères d'acceptation de l'essai, témoin positif simultané:

▼B

— CE_{50} (+Irr) et CE_{50} (-Irr) et PIF/MPE du produit chimique témoin positif

— données historiques sur le produit chimique témoin positif: CE_{50} (+Irr) et CE_{50} (-Irr) et PIF/MPE moyennes et écarts types.

Discussion des résultats

Conclusions

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Lovell W.W. (1993). A scheme for in vitro screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7, p. 95-102.

(2) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In «Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry» Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam, p. XI-XXXV.

(3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). In vitro phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, p. 314-348.

(4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In «The science of Photobiology» Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p. 79-110.

(5) OECD (1997). Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No7 «Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water» Environment Directorate, OECD, Paris.

(6) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, p. 793-796.

(7) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an in vitro test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, p. 7-8.

(8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA In vitro phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, p. 305-327.

(9) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

(10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24 p. 119-124.

(11) Hay, R.J. (1988). The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, p. 225-237.

▼B

(12) Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In «Dermatotoxicology», edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p. 515-530.

(13) Tyrrell, R.M., Pidoux, M. (1987). Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, p. 1825-1829.

(14) ISO 10977. (1993). Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.

(15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No 90, Vienna, 1993, ISBN 3900734275

(16) ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998, p. 18.

(17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the in vitro 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, p. 679-708.

(18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, p. 127-138.

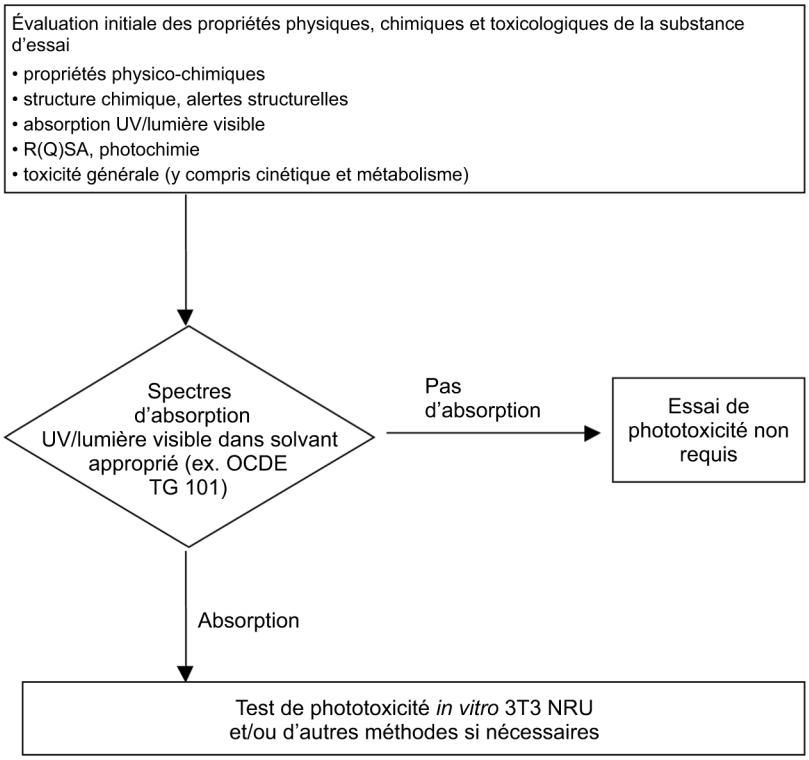
(19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of in vitro phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the in vivo phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, p. 445-462.

(20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

ANNEXE 1

Rôle de l'essai de phototoxicité 3T3 NRU dans une approche séquentielle des essais de phototoxicité des substances chimiques

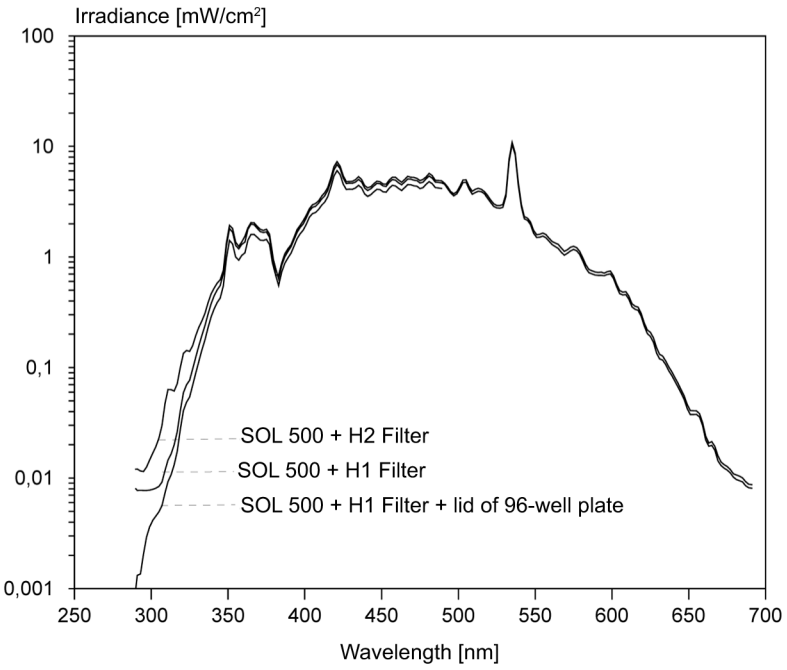


▼B

ANNEXE 2

Figure 1

Distribution spectrale énergétique d'un simulateur solaire équipé de filtres



(voir point 1.4.1.5, second paragraphe)

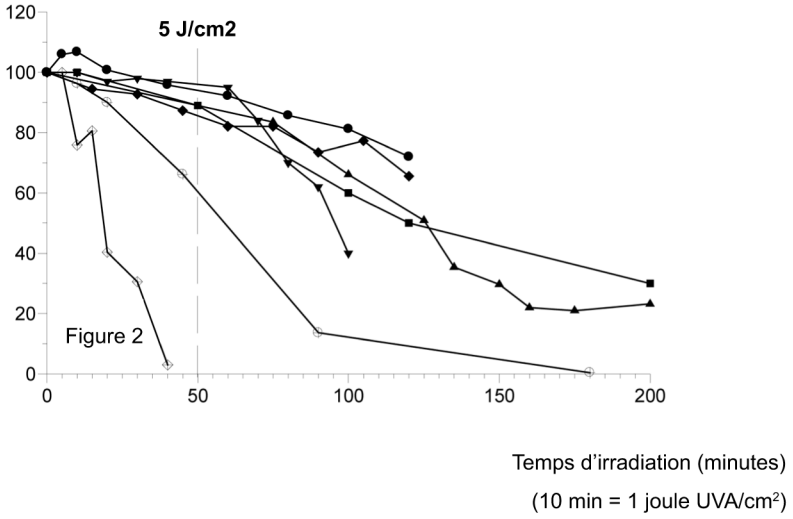
La figure 1 donne un exemple de distribution acceptable de l'énergie spectrale d'un simulateur solaire équipé de filtres. Elle correspond à la source aux halogénures de métaux dopés utilisée dans l'essai de validation du test 3T3 NRU (6) (8) (17). Cette figure fait apparaître l'effet des deux filtres distincts, ainsi que l'effet de filtration de la plaque à 96 puits. Le filtre H2 est utilisé uniquement avec les systèmes d'essai qui peuvent supporter une quantité plus importante d'UVB (essai sur modèle de peau et essai de photo-hémolyse des globules rouges). Dans l'essai 3T3 NRU, le filtre H1 a été utilisé. La figure montre que l'effet de filtration supplémentaire de la plaque est principalement observé dans la plage des UVB, laissant néanmoins suffisamment d'UVB dans le spectre d'irradiation pour exciter les substances chimiques qui absorbent généralement la lumière dans la plage des UVB, telles que l'amiodarone (voir le tableau 1).

▼B

Figure 2

Sensibilité des cellules Balb/c 3T3 à l'irradiation (mesurée dans la plage des UVA)

Viabilité cellulaire (% de fixation du rouge neutre des témoins dans l'obscurité)



Temps d'irradiation (minutes) (10 min = 1 joule UVA/cm^2)

(voir point 1.4.1.5.2, second paragraphe, et points 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Sensibilité des cellules Balb/c 3T3 à l'irradiation avec le simulateur solaire utilisé dans l'essai de validation du test de phototoxicité 3T3 NRU, mesurée dans la plage des UVA. La figure montre les résultats obtenus dans sept laboratoires différents au cours de l'étude de prévalidation (1). Les deux courbes avec des symboles transparents ont été obtenues avec des cellules âgées (nombre de passages élevés) qu'il a fallu remplacer par de nouvelles cellules, tandis que les courbes aux symboles pleins sont associées à des cellules montrant une tolérance acceptable à l'irradiation.

C'est à partir de ces données qu'on a dérivé la dose maximale d'irradiation non cytotoxique de 5 J/cm^2 (ligne discontinue verticale). La ligne de pointillés horizontale montre en outre l'effet maximal d'irradiation acceptable (point 1.4.2.2).

▼M3

B.42. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES

INTRODUCTION

1. Les lignes directrices (LD) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques et les méthodes d'essai de l'Union européenne qui sont fondées sur celles-ci sont régulièrement révisées à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La méthode d'essai initiale visant à déterminer la sensibilisation cutanée chez la souris, c'est-à-dire l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL; LD 429 de l'OCDE, chapitre B.42 de la présente annexe), a été adoptée antérieurement (1). Les détails de la validation de l'ELGL et une synthèse des travaux qui y sont associés ont été publiés (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). La révision de l'ELGL s'appuie sur l'évaluation de l'expérience acquise et des données scientifiques (12). Il s'agit de la deuxième méthode d'essai permettant d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée de substances chimiques (substances et mélanges) chez les animaux. L'autre méthode d'essai (LD 406 de l'OCDE, chapitre B.6 de la présente annexe) fait appel à des essais sur cobayes, notamment l'essai de maximisation sur le cobaye et l'essai de Buehler (13). L'ELGL présente un avantage par rapport au chapitre B.6 et à la LD 406 de l'OCDE (13) en termes de bien-être des animaux. Cette mise à jour de la méthode d'essai sur l'ELGL comprend une série de normes de performance (appendice 1) pouvant servir à évaluer l'état de validation des méthodes d'essai modifiées et/ou nouvelles, dont le fonctionnement et le mécanisme sont similaires à ceux de l'ELGL, conformément aux principes énoncés dans le document d'orientation n° 34 de l'OCDE (14).

2. L'ELGL s'intéresse à la phase d'induction de la sensibilisation cutanée et livre des données quantitatives permettant d'évaluer la relation dose-effet. Il convient de noter que les sensibilisants légers/modérés recommandés comme témoins positifs (TP) pour les essais sur cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13) conviennent également à l'ELGL (6) (8) (15). La présente méthode d'essai décrit également une approche simplifiée de l'ELGL (ELGLs) optionnelle, qui pourrait nécessiter jusqu'à 40 % d'animaux en moins (16) (17) (18). Cet essai simplifié pourrait être utilisé en cas de besoin réglementaire de confirmer les prévisions négatives concernant le pouvoir de sensibilisation cutanée, à condition de rester en conformité avec toutes les autres dispositions du protocole ELGL décrit dans la présente méthode d'essai. La prédiction d'un résultat négatif s'appuie sur toutes les informations disponibles, comme cela est décrit au paragraphe 4. Tout recours à l'approche ELGL simplifiée est préalablement justifié, avec le détail des raisons scientifiques étayant ce choix. Si, en dépit des prévisions, l'ELGL simplifié donne une réponse positive ou équivoque, des essais supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires pour interpréter ou clarifier le résultat. L'ELGLs ne convient pas pour identifier les substances d'essai sensibilisantes pour la peau lorsque des données sur la relation dose-effet sont nécessaires, comme pour la sous-catégorisation conformément au règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, et à la classification du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques de l'Organisation des Nations-Unies.

DÉFINITIONS

3. Les définitions utilisées sont données à l'appendice 2.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

4. L'ELGL constitue une méthode de remplacement pour identifier les substances et mélanges chimiques susceptibles d'exercer une action sensibilisante sur la peau. Cela n'implique pas que l'ELGL doive systématiquement remplacer les essais sur cobayes (B.6, LD 406 de l'OCDE) (14) mais plutôt qu'il s'agit d'un outil d'une qualité égale pouvant se substituer à ces essais, et dont les résultats positifs ou négatifs n'ont généralement plus besoin de confirmation supplémentaire. Avant de procéder à l'essai, le laboratoire rassemble toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, à savoir son identité et sa structure chimiques, ses propriétés physico-chimiques, les résultats de tous les autres essais de toxicité in

▼M3

vitro et in vivo, et les données toxicologiques sur des analogues de structure. Ces informations servent à déterminer s'il est pertinent d'appliquer la méthode ELGL avec la substance considérée, étant donné l'incompatibilité de certains types de substances chimiques avec l'ELGL (voir paragraphe 5), et aident à choisir les doses appropriées.

5. La méthode ELGL, mise en œuvre in vivo, ne met donc pas un terme à l'utilisation d'animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. Elle est néanmoins susceptible de réduire le nombre d'animaux requis à ces fins. En outre, l'ELGL propose un raffinement important (réduction du stress et de la douleur) de l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. L'ELGL se fonde sur les réactions immunologiques induites par les produits chimiques pendant la phase d'induction de la sensibilisation. Contrairement aux essais sur cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13), l'ELGL ne s'appuie pas sur le déclenchement de réactions d'hypersensibilité cutanée par une exposition de déclenchement. De plus, l'ELGL ne requiert aucun adjuvant, contrairement à l'essai de maximisation sur le cobaye (13). C'est pourquoi l'ELGL réduit la souffrance et le stress chez les animaux. Malgré les avantages de l'ELGL par rapport au chapitre B.6 et à la LD 406 de l'OCDE, certaines limites peuvent imposer de privilégier l'utilisation du chapitre B.6 ou de la LD 406 de l'OCDE (13) [par exemple, résultats faussement négatifs avec certains métaux, résultats faussement positifs avec certaines substances irritantes pour la peau, en particulier des tensioactifs (19) (20), ou solubilité de la substance d'essai]. De surcroît, certaines substances chimiques ou familles de substances comprenant des groupements fonctionnels dont il est démontré qu'ils peuvent être des facteurs de confusion (21) peuvent aussi imposer le recours aux essais avec cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13). Par ailleurs, en examinant la base de données de validation, limitée et essentiellement constituée de formulations de pesticides, on observe que l'ELGL donne plus de résultats positifs que l'essai sur cobayes pour ces types de substances (22). Concernant les formulations, il est cependant envisageable de tester des substances similaires aux effets connus en tant que substances étalons, afin de prouver que l'ELGL est efficace (voir paragraphe 16). Dans ces limites, l'ELGL est applicable à toute substance qui ne présente pas de propriétés susceptibles d'affecter la précision de l'essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. L'ELGL repose sur le principe que les sensibilisants induisent une prolifération de lymphocytes dans les ganglions lymphatiques drainant le site de l'application de la substance d'essai. Cette prolifération est proportionnelle à la dose appliquée et à la puissance de l'allergène, et permet d'obtenir facilement une mesure quantitative de la sensibilisation. Pour mesurer la prolifération, on compare la prolifération moyenne de chaque groupe d'essai à la prolifération moyenne du groupe témoin traité avec le véhicule (TV). On calcule le quotient de la prolifération moyenne dans chaque groupe traité sur celle du TV, pour obtenir l'indice de stimulation (IS); si cette valeur est supérieure ou égale à 3, il est justifié de classer la substance d'essai comme substance ayant un pouvoir de sensibilisation cutanée. Les procédures décrites ici mesurent la prolifération cellulaire dans les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage à l'aide d'un marquage radioactif in vivo. Il est toutefois possible de faire appel à d'autres paramètres pour évaluer le nombre de cellules en prolifération, à condition de respecter strictement les normes de performance (appendice 1).

▼M3

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Choix des espèces animales

7. L'espèce retenue pour cet essai est la souris. On utilise de jeunes femelles adultes, nullipares et non gravides, de souche CBA/Ca ou CBA/J. Au début de l'étude, les animaux sont âgés de 8 à 12 semaines et affichent une variation de poids minime entre eux n'excédant pas 20 % du poids moyen. Il est aussi possible d'utiliser d'autres souches ainsi que des mâles s'il existe suffisamment d'informations démontrant l'absence de différences significatives entre les souches et/ou les sexes en ce qui concerne la réaction à l'ELGL.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

8. Les souris sont hébergées par groupes (23), sauf si une raison scientifique pertinente exige un encagement individuel. La température de l'animalerie est maintenue à 22 °C ± 3 °C. L'humidité relative atteint au moins 30 % et de préférence ne dépasse pas 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit maintenue aux alentours de 50-60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux peuvent être alimentés par un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété.

Préparation des animaux

9. Les animaux sont sélectionnés au hasard, marqués pour permettre leur identification individuelle (mais jamais sur l'oreille) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours avant le commencement du traitement afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Avant de commencer le traitement, on examine tous les animaux pour vérifier qu'ils ne présentent pas de lésions cutanées observables.

Préparation des solutions d'essai

10. Les substances et mélanges chimiques solides sont dissouts ou dispersés dans des solvants/véhicules puis dilués, s'il y a lieu, avant d'être appliqués sur l'oreille des souris. Les substances et mélanges chimiques liquides peuvent être appliqués purs ou préalablement dilués. Les substances et mélanges chimiques insolubles, comme ceux que l'on rencontre généralement dans les dispositifs médicaux, sont soumis à une extraction forcée à l'aide d'un solvant approprié pour faire ressortir tous les composants extractibles qu'il est possible d'évaluer, avant l'application sur l'oreille des souris. Les substances d'essai sont préparées chaque jour à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'elles peuvent être stockées.

Contrôle de la fiabilité

11. Les témoins positifs (TP) servent à démontrer le bon fonctionnement de l'essai en répondant de manière adéquate et reproductible à une substance d'essai sensibilisante pour lequel l'ordre de grandeur des effets est bien connu. Il est recommandé d'inclure un TP concurrent puisqu'il démontre la capacité du laboratoire à mener chaque essai correctement, et permet d'évaluer la comparabilité et la reproductibilité intra- et interlaboratoires. Par ailleurs, dans la mesure où certaines autorités réglementaires exigent un TP dans chaque essai, les expérimentateurs sont encouragés à consulter les autorités concernées avant de mener l'ELGL. De même, le recours systématique à un TP concurrent est recommandé pour éviter d'avoir à réaliser des essais supplémentaires sur animaux, ce qui est parfois exigé lorsqu'un laboratoire se réfère à un TP testé périodiquement (voir paragraphe 12). Le TP doit réagir positivement à l'ELGL pour un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de stimulation de plus. Le TP doit réagir positivement à l'ELGL pour un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de

▼M3

stimulation de plus de 3 points par rapport au groupe témoin négatif (TN). La dose de TP est choisie de manière à ne pas entraîner d'irritation cutanée excessive ou de toxicité systémique, l'induction devant être reproductible sans être exagérée (un IS > 20 est considéré comme excessif, par exemple). Les substances utilisées en priorité comme TP sont l'hexyl cinnamaldéhyde à 25 % (Nº CAS [Chemical Abstracts Service] 101-86-0) dans un mélange acétone/huile d'olive (4:1, v/v), ainsi que le mercaptobenzothiazole (Nº CAS 149-30-4) à 5 % dans le N,N-diméthylformamide (voir appendice 1, tableau 1). Dans certains cas, d'autres substances d'essai répondant aux critères susmentionnés pourront être employées comme témoins positifs, à condition que ce choix soit correctement justifié.

12. Si l'inclusion d'un groupe TP concurrent demeure recommandée, dans certaines circonstances des essais périodiques (c'est-à-dire à intervalles ≤ 6 mois) du TP peuvent convenir pour des laboratoires menant régulièrement (c'est-à-dire au moins une fois par mois) des ELGL et disposant d'une base de données de référence montrant que le laboratoire est apte à obtenir des résultats précis et reproductibles avec les TP. La capacité d'un laboratoire à mener l'ELGL est efficacement démontrée quand le TP déclenche des résultats positifs cohérents à l'issue d'un minimum de 10 essais indépendants étalés sur une période raisonnable (c'est-à-dire inférieure à un an).

13. Il convient d'inclure un groupe TP concurrent à chaque fois que le protocole de l'ELGL est modifié (par exemple si des modifications interviennent au niveau du personnel qualifié, des composés et/ou réactifs utilisés pour la méthode d'essai, de l'équipement mis en œuvre ou de la source d'animaux d'expérience), et ces changements sont documentés dans les rapports de laboratoire. Il faudra tenir compte de l'impact de ces changements sur la validité des données de la base historique pour décider de l'opportunité d'établir une nouvelle base de données afin d'évaluer la cohérence des résultats relatifs au TP.

14. Les investigateurs gardent à l'esprit que faire une étude de TP périodiquement plutôt que systématiquement comme concurrent pèse sur la précision et l'acceptabilité des résultats négatifs obtenus à l'issue d'un essai sans TP concurrent réalisé dans l'intervalle entre chaque essai périodique du TP. Par exemple, si un essai périodique du TP donne un faux négatif, l'ensemble des résultats négatifs obtenus avec la substance d'essai depuis le dernier essai de TP valable pourront être remis en question. Il faut donc soigneusement considérer les implications de telles retombées avant de décider si les TP seront des concurrents systématiques ou s'ils feront l'objet d'essais périodiques. Par ailleurs, le nombre d'animaux du groupe TP concurrent est réduit si cela se justifie du point de vue scientifique et si le laboratoire démontre, en s'appuyant sur ses propres données historiques, que l'on peut utiliser moins de souris (12).

15. Quoique le témoin positif doive être testé dans un véhicule déclenchant un effet constant (par exemple acétone/huile d'olive (4:1, v/v)], certaines situations réglementaires nécessitent aussi l'essai d'un véhicule moins courant (mélange cliniquement ou chimiquement pertinent) (24). Si le TP concurrent est testé avec un véhicule différent de celui de la substance d'essai, il convient de mettre en place un essai témoin indépendant pour le véhicule du TP.

16. Lorsqu'il s'agit d'évaluer des substances d'essai appartenant à une classe chimique particulière ou donnant des résultats situés dans une certaine fourchette, des substances étalons peuvent s'avérer utiles pour montrer que la méthode d'essai fonctionne correctement et permet de détecter le pouvoir de sensibilisation cutanée de ces types de substances. Les substances étalons présentent les propriétés suivantes:

— similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances d'essai à tester,

— caractéristiques physiques et chimiques connues,

— données connues provenant de l'ELGL,

— données connues provenant d'autres modèles animaux et/ou de l'être humain.

▼M3

MODE OPÉRATOIRE

Nombre d'animaux et doses

17. On utilise au moins quatre animaux par groupe de dose, et un minimum de trois concentrations de la substance d'essai, ainsi qu'un groupe témoin négatif concurrent ne recevant que le véhicule de cette substance d'essai et un témoin positif (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-14). On peut envisager de tester différentes doses du témoin positif, en particulier quand celui-ci ne fait l'objet que d'essais périodiques. Mis à part l'absence de traitement par la substance d'essai, les animaux des groupes témoins sont manipulés et traités de la même manière que les animaux des groupes d'essai.

18. La sélection des doses et du véhicule suit les recommandations données dans les références (3) et (5). Des doses successives sont normalement choisies dans une série de concentrations appropriée telle que 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. Le choix de la série utilisée fait l'objet d'une justification scientifique. Le cas échéant, toutes les informations existantes d'ordre toxicologique (par exemple sur la toxicité aiguë et l'irritation cutanée), structural et physico-chimique sur la substance d'essai en question (et/ou des analogues de structure) sont prises en compte pour choisir les trois concentrations successives de manière que la plus élevée d'entre elles offre une exposition maximale tout en évitant la toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive (3) (25). En l'absence de telles informations, un essai préliminaire peut s'avérer nécessaire (voir paragraphes 21-24).

19. Le véhicule ne doit pas perturber ou introduire un biais dans les résultats du test. Il est choisi de manière à optimiser la solubilité pour obtenir la concentration la plus élevée possible dans la préparation d'une solution/suspension adaptée à l'application de la substance d'essai. Les véhicules recommandés sont le mélange acétone/huile d'olive (4:1, v/v), le N,N-diméthylformamide, la méthyléthylcétone, le propylène glycol et le diméthylsulfoxyde (19) mais d'autres véhicules pourront également être utilisés à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. Certaines situations réclameront un témoin supplémentaire, à savoir un solvant qui se justifie sur le plan clinique ou le mélange dans lequel la substance d'essai est commercialisée. L'expérimentateur veillera tout particulièrement à ce que les substances d'essai hydrophiles soient incorporées à un véhicule qui mouille la peau et ne ruisselle pas immédiatement, ce qui peut nécessiter l'ajout de solubilisants appropriés (par exemple Pluronic® L92 à 1 %). Il convient donc d'éviter les véhicules totalement aqueux.

20. Le traitement des ganglions lymphatiques de chaque souris permet d'évaluer la variabilité entre individus et de comparer statistiquement les réponses induites par la substance d'essai et par le véhicule témoin (voir paragraphe 35). En outre, il est envisageable de réduire le nombre d'animaux du groupe TP en se fondant sur des données individuelles (12). Du reste, certaines autorités réglementaires exigent la collecte de données pour chaque animal. D'autres autorités sont toutefois susceptibles d'accepter des données par groupe d'animaux, auquel cas le choix d'un relevé des résultats par animal ou par groupe est laissé à la discrétion des expérimentateurs.

Essai préliminaire

21. En l'absence d'informations permettant d'estimer la concentration d'essai maximale (voir paragraphe 18), il convient d'effectuer un essai préliminaire afin de déterminer le niveau des doses adaptées à l'ELGL. Cet essai préliminaire aide à quantifier la dose maximale à mettre en œuvre dans l'ELGL lorsqu'on ne dispose pas d'informations sur la concentration induisant une toxicité systémique (voir paragraphe 24) et/ou une irritation cutanée locale excessive (voir paragraphe 23). Cette concentration maximum de la substance d'essai est de 100 % pour les liquides, ou la plus élevée possible pour les solides et suspensions.

▼M3

22. Les conditions de l'essai préliminaire sont les mêmes que celles de l'ELGL, à ceci près qu'il n'y a pas d'évaluation de la prolifération dans les ganglions lymphatiques et que l'on peut inclure moins d'animaux par groupe de dose. En effet, on suggère d'utiliser seulement un à deux individus par groupe de dose. Il convient d'examiner toutes les souris quotidiennement afin de déceler d'éventuels signes cliniques de toxicité systémique ou d'irritation locale sur le site d'application. Les poids corporels sont consignés préalablement à l'essai et juste avant la fin (sixième jour). On examine les deux oreilles de chaque souris pour détecter la présence d'un éventuel érythème, le résultat étant noté conformément à l'échelle figurant dans le tableau 1 (25). L'épaisseur de l'oreille est mesurée à l'aide d'une jauge d'épaisseur (par exemple micromètre numérique ou jauge d'épaisseur Peacock Dial) le premier jour (avant toute application), le troisième jour (environ 48 heures après la première dose) et le sixième jour. De plus, le sixième jour, cette épaisseur peut être déterminée à partir du poids d'un échantillon d'oreille, prélevé après l'euthanasie des animaux. Les irritations cutanées locales excessives se traduisent par une cotation de l'érythème ≥ 3 et/ou un épaississement de l'oreille d'au moins 25 %, quel que soit le jour de la mesure (26) (27). La dose maximale choisie pour l'ELGL principal est la dose immédiatement inférieure dans la série de concentrations utilisée pour l'essai préliminaire (voir paragraphe 18) qui n'induit pas une toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive.

Tableau 1

Cotation de l'érythème

Observation	Résultat
Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarre empêchant la cotation de l'érythème	4

23. Outre un épaississement de l'oreille de 25 % (26) (27), toute augmentation statistiquement significative de l'épaisseur de l'oreille chez les souris traitées par rapport aux individus témoins permet aussi d'identifier les produits irritants dans l'ELGL (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Cependant, les augmentations statistiquement significatives inférieures à 25 % ne sont pas systématiquement associées à une irritation excessive (30) (32) (33) (34).

24. Les observations cliniques suivantes peuvent indiquer une toxicité systémique (35) (36) dans le cadre d'une évaluation intégrée, et ainsi permettre d'estimer la dose maximale à utiliser dans l'ELGL principal: modifications des fonctions nerveuses (par exemple, piloérection, ataxie, tremblements et convulsions); changements du comportement (par exemple, agressivité, activités de toilettage modifiées, changement marqué d'intensité de l'activité); troubles respiratoires (en termes de fréquence et d'intensité de la respiration, sous forme de dyspnée, halètements ou râles), et modifications de la consommation d'aliments et d'eau. En outre, l'évaluation prendra en compte les éléments suivants: signes de léthargie et/ou absence de réceptivité, et tout signe clinique autre qu'une douleur ou un stress légers et passagers; baisse du poids corporel > 5 % entre le premier et le sixième jour; mortalité. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés (37).

▼M3

Programme expérimental de l'étude principale

25. Le programme expérimental se déroule comme suit:

— *Premier jour:* Mesurer et consigner le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Appliquer 25 µl d'une dilution adaptée de la substance d'essai, du véhicule seul ou du TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15) au dos de chaque oreille.

— *Deuxième et troisième jours:* Répéter la procédure d'application pratiquée le premier jour.

— *Quatrième et cinquième jours:* Aucun traitement.

— *Sixième jour:* Noter le poids de chaque animal. Injecter 250 µl d'une solution tampon phosphate stérile [phosphate-buffered saline] (PBS) contenant 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) de (^{3}H)-méthylthymidine dans la veine caudale de toutes les souris traitées et témoins. Il est également possible d'injecter 250 µL de PBS stérile contenant 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) de ^{125}I-iododésoxyuridine et de la fluorodésoxyuridine à 10^{-5} M dans la veine caudale de toutes les souris. Euthanasier les animaux cinq heures (5 h) plus tard. Exciser les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage de chaque oreille de souris, puis placer ceux d'un même individu dans une solution de PBS (approche par animal), ou placer tous les ganglions lymphatiques d'un même groupe de traitement dans la même solution PBS (approche par groupe). Les détails et diagrammes relatifs à l'identification et à la dissection des ganglions lymphatiques sont présentés dans la référence (12). Pour approfondir le suivi de la réponse cutanée locale dans l'essai principal, des paramètres supplémentaires comme la cotation de l'érythème auriculaire ou les mesures de l'épaisseur de l'oreille (obtenues à l'aide d'une jauge d'épaisseur ou par pesée d'échantillons d'oreilles après nécropsie) peuvent être inclus dans le protocole d'étude.

Préparation des suspensions cellulaires

26. Pour l'approche par animal comme pour l'approche par groupe, les cellules de ganglions lymphatiques (CGL) excisés bilatéralement sont dispersées par le biais d'une désagrégation mécanique douce à travers un tamis en acier inoxydable à 200 microns, ou de toute autre technique acceptable pour obtenir une suspension unicellulaire. Les CGL sont lavées deux fois avec un excès de PBS et l'ADN précipite par l'action d'acide trichloracétique à 5 % à 4 °C pendant 18 heures (3). Les granules sont soit remis en suspension dans 1 mL d'acide trichloracétique et transférés dans des flacons à scintillation contenant 10 mL de scintillateur liquide pour le comptage des ^{3}H, soit transférés directement dans des tubes de comptage gamma pour le comptage de ^{125}I.

Détermination de la prolifération cellulaire (radioactivité incorporée)

27. L'incorporation de la ^{3}H-méthylthymidine se mesure par comptage à β-scintillation en désintégrations par minute (DPM). L'incorporation de ^{125}I-iododésoxyuridine, mesurée par comptage de ^{125}I, s'exprime également en DPM. En fonction de l'approche adoptée, l'incorporation s'exprimera en DPM/souris (approche par animal) ou en DPM/groupe de traitement (approche par groupe).

ELGL simplifié (ELGLs)

28. Si la réglementation demande de confirmer les prévisions négatives quant au pouvoir de sensibilisation cutanée, il est possible de mettre en œuvre l'ELGLs (16) (17) (18), qui requiert moins d'animaux, à condition de rester en conformité avec toutes les autres dispositions du protocole ELGL décrit dans la présente méthode d'essai. Tout recours à l'approche ELGL simplifiée doit être préalablement justifié, avec le détail des raisons scientifiques étayant ce choix. Si l'ELGLs donne une réponse positive ou équivoque, des essais supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires pour interpréter ou clarifier le résultat.

▼M3

29. La seule différence entre les méthodes ELGL et ELGLs est la réduction du nombre de groupes de dose; c'est pourquoi l'ELGLs ne livre pas d'informations sur la relation dose-effet. Par voie de conséquence, l'ELGLs ne saurait être appliqué lorsque des données sont nécessaires en la matière. Tout comme pour la méthode ELGL utilisant plusieurs doses, la concentration maximale de substance d'essai choisie pour l'ELGLs correspond à la concentration maximale n'induisant pas de toxicité systémique manifeste et/ou d'irritation cutanée locale excessive chez la souris (voir paragraphe 18).

OBSERVATIONS

Observations cliniques

30. Au moins une fois par jour, l'expérimentateur examinera attentivement chaque souris afin de déceler d'éventuels signes cliniques, se traduisant par une irritation locale sur le site d'application ou une toxicité systémique. Toutes les observations sont systématiquement consignées pour chaque souris. Les programmes de suivi intègrent les critères permettant d'identifier rapidement les souris montrant des signes de toxicité systémique, d'irritation cutanée locale excessive ou de corrosion de la peau, afin qu'elles puissent être euthanasiées (37).

Poids corporels

31. Comme indiqué au paragraphe 25, le poids corporel de chaque animal est mesuré au début de l'essai et au moment programmé pour l'euthanasie.

CALCUL DES RÉSULTATS

32. Les résultats obtenus pour chaque groupe de traitement sont exprimés par un indice de stimulation (IS). Pour l'approche par animal, cet IS s'obtient en divisant la moyenne des DPM/souris dans chaque groupe ayant reçu la substance d'essai ou le TP par la moyenne des DPM/souris dans le groupe témoin traité avec le solvant/véhicule. L'indice de stimulation moyen pour les témoins traités avec le véhicule est alors égal à 1. Pour l'approche par groupe, l'IS s'obtient en divisant l'incorporation du produit radiomarqué dans chaque groupe de traitement par l'incorporation observée dans le groupe témoin traité avec le solvant/véhicule: on obtient alors un IS moyen.

33. Un résultat est considéré comme positif lorsque l'indice de stimulation est supérieur ou égal à 3. Toutefois, l'intensité de la relation dose-effet, la signification statistique et la cohérence des réponses obtenues avec le solvant/véhicule et le TP constituent autant de facteurs pour décider si un résultat limite est jugé positif (4) (5) (6).

34. Pour clarifier les résultats, diverses propriétés de la substance d'essai sont prises en compte, parmi lesquelles une éventuelle analogie structurelle avec des sensibilisants cutanés connus, le déclenchement d'une irritation cutanée excessive chez la souris, et la nature de la relation dose-effet observée. Ces considérations, ainsi que d'autres, sont examinées en détail dans un autre document (7).

35. Le relevé des données radioactives pour chaque souris permet de déterminer statistiquement l'existence et l'importance d'une relation dose-effet dans les résultats. Tout traitement statistique peut comprendre une évaluation de la relation dose-effet ainsi que des comparaisons des groupes d'essai convenablement adaptées (par exemple comparaison par paires des groupes de dose avec le groupe solvant/véhicule témoin concurrent). Les analyses statistiques peuvent notamment inclure une régression linéaire ou le test de Williams pour étudier la fonction dose-effet, ainsi que le test de Dunnett pour les comparaisons par paires. Pour choisir une méthode appropriée d'analyse statistique, le chercheur doit être conscient du risque d'inégalité des variances et d'autres problèmes connexes qui pourraient nécessiter une transformation des données ou une analyse statistique non paramétrique. Quoi qu'il en soit, l'investigateur peut être amené à calculer les indices de stimulation et effectuer les traitements statistiques avec ou sans certains points de données (parfois appelés «valeurs aberrantes»).

▼M3

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

36. Les résultats sont récapitulés sous forme de tableau. Avec l'approche par animal, indiquer les DPM relevées pour chaque individu, la moyenne des DPM/souris du groupe, la marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) et l'indice de stimulation moyen pour chaque groupe de dose par rapport au groupe solvant/véhicule témoin concurrent. Avec l'approche par groupe, indiquer la moyenne et la médiane des DPM ainsi que la moyenne des IS de chaque groupe de dose par rapport au groupe solvant/véhicule témoin concurrent.

Rapport d'essai

37. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Substance d'essai et substances témoins:

— données d'identification (par exemple numéro CAS et numéros CE, le cas échéant; source; pureté; impuretés connues; numéro de lot),

— état physique et propriétés physico-chimiques (par exemple volatilité, stabilité, solubilité),

— s'il s'agit d'un mélange: composition et pourcentages relatifs des constituants.

Solvant/véhicule:

— données d'identification (pureté; concentration, s'il y a lieu; volume utilisé),

— justification du choix du véhicule.

Animaux d'essai:

— source des souris CBA,

— état microbiologique des animaux, s'il est connu,

— nombre et âge des animaux,

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Conditions d'essai:

— détails concernant la préparation et l'application de la substance d'essai,

— justification du choix des doses (y compris résultats de l'essai préliminaire, le cas échéant),

— concentrations utilisées pour le véhicule et la substance d'essai, et quantité totale de substance d'essai appliquée,

— détails concernant la nourriture et la qualité de l'eau (y compris type et source de nourriture, et provenance de l'eau),

— détails concernant le programme de traitement et d'échantillonnage,

— méthodes de détermination de la toxicité,

— critères de décision concernant les études positives ou négatives,

— détails concernant tout écart par rapport au protocole et explication de la manière dont l'écart modifie la conception de l'essai et ses résultats.

Vérification de la fiabilité:

— résumé des résultats du dernier test de fiabilité, notamment informations sur la substance d'essai, sa concentration et le véhicule utilisé,

— résultats du laboratoire pour le TP concurrent et/ou historique ainsi que pour le TN concurrent,

▼M3

— en l'absence d'un TP concurrent, date et rapport de laboratoire du dernier essai périodique du TP, et rapport détaillant les résultats historiques du TP spécifiques au laboratoire de manière à justifier pourquoi aucun TP concurrent n'a été mis en œuvre.

Résultats:

— poids corporel de chaque souris au début du traitement et au moment programmé pour l'euthanasie; moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) pour chaque groupe de dose,

— moment du déclenchement des effets et signes de toxicité, y compris l'irritation cutanée sur le site d'administration, pour chaque animal,

— tableau des DPM et IS pour chaque souris (approche par animal) ou moyenne et médiane des DPM et IS (approche par groupe) pour chaque groupe de traitement,

— moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) des DPM/souris pour chaque groupe de dose, et résultats de l'analyse des valeurs aberrantes au sein de chacun d'eux en cas d'approche par animal,

— indices de stimulation obtenus, et détermination appropriée de la variabilité prenant en compte les variations entre animaux à la fois dans les groupes ayant reçu la substance d'essai et dans les groupes témoins, en cas d'approche par groupe,

— relation dose-effet,

— analyses statistiques, s'il y a lieu.

Discussion des résultats:

— bref commentaire sur les résultats, analyse de la relation dose-effet et analyses statistiques, s'il y a lieu, et conclusion quant au fait de savoir si la substance d'essai doit être considérée comme un sensibilisant cutané.

BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (2002), Sensibilisation cutanée: essai des ganglions lymphatiques locaux, Ligne directrice n° 429, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

2. Kimber, I., et Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, Food Chem. Toxicol., 30, 165-169.

3. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. et Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, Toxicol., 93, 13-31.

4. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. et Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, J. Toxicol. Environ. Health, 53, 563-79.

5. Chamberlain, M., et Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.

6. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I., et Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.

7. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., et Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.

▼M3

8. Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, Toxicol., 146, 49-59.

9. Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, Reg. Toxicol. Pharmacol, 34(3): 258-273.

10. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, Reg. Toxicol. Pharmacol, 34(3), 274-286.

11. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, Reg. Toxicol. Pharmacol, 34(3): 249-257.

12. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

13. OCDE (1992), Sensibilisation de la peau, Ligne directrice nº 406, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

14. OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Série sur les essais et évaluations nº 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

15. Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A., et Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, J. Appl. Toxicol., 18, 281-284.

16. Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y., et Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? Contact Dermatitis, 54, 181-185.

17. ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, Avril 2007. Disponible à l'adresse suivante: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

18. ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report, The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

19. ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

▼M3

20. Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. et Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

21. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. et Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

22. ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report, Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

23. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7e édition. Washington, DC: National Academies Press.

24. McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71-89.

25. OCDE (2002), Effet irritant/corrosif aigu sur la peau, Ligne directrice nº 404, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html

26. Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. et DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96 (S-1), 235.

27. ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

28. Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S., et Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

29. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. et Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83-94.

30. Woolhiser, M.R., Hayes, B.B., et Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, Toxicol. Meth., 8, 245-256.

31. Hayes, B.B., et Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, Drug. Chem. Toxicol., 22, 491-506.

32. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. et Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round, Toxicol., 212, 60-68.

33. Vohr, H.W., and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

34. Patterson, R.M., Noga, E. et Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

35. OCDE (1987), Toxicité cutanée aiguë, Ligne directrice nº 402, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

▼**M3**

36. ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

37. OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Série sur les essais et évaluations nº 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

▼M3

Appendice 1

Normes de performance pour l'évaluation des méthodes d'ELGL similaires ou modifiées proposées pour les essais de sensibilisation cutanée

INTRODUCTION

1. L'objectif des normes de performance est d'indiquer sur quelles bases évaluer la précision et la fiabilité de nouvelles méthodes d'essai vis-à-vis d'objectifs définis, que ces méthodes soient protégées ou non (par des droits d'auteur, une marque déposée ou un enregistrement). Conçues à partir de méthodes d'essai validées et acceptées, ces normes peuvent également servir à évaluer la précision et la fiabilité de méthodes analogues (aussi appelées «répliques d'essais») fondées sur des principes scientifiques similaires et permettant de quantifier ou prévoir le même effet biologique ou toxique (14).

2. Avant d'adopter des méthodes modifiées, c'est-à-dire des améliorations proposées d'une méthode d'essai approuvée, il convient de déterminer quel peut être l'effet des modifications envisagées sur les performances de l'essai, et dans quelle mesure ces modifications influent sur les informations disponibles pour les autres éléments du processus de validation. En fonction du nombre et de la nature des changements proposés, des données générées et des documents justificatifs associés, le processus de validation est le même que pour un nouvel essai ou, le cas échéant, limité à une évaluation de la fiabilité et de la pertinence sur la base des normes de performance établies (14).

3. La fiabilité et la précision des méthodes similaires ou modifiées proposées dans la présente méthode d'essai sont évaluées à l'aide de produits chimiques représentant l'éventail complet des résultats de l'ELGL. Afin d'éviter toute utilisation injustifiée d'animaux, il est fortement conseillé aux concepteurs de modèles de contacter les autorités appropriées avant d'entamer les études de validation conformément aux normes de performance et orientations fournies dans la présente méthode d'essai.

4. Ces normes de performance, qui sont fondées sur les normes harmonisées émanant du comité de coordination interagences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) aux États-Unis, du Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM) et du Centre japonais pour la validation des méthodes alternatives (JaCVAM) (12), permettent d'évaluer la validité de versions de l'ELGL similaires ou modifiées. Les normes de performance comprennent les éléments essentiels de la méthode d'essai, les produits chimiques de référence recommandés, et les minima requis en termes de précision et de fiabilité.

I. **Éléments essentiels de la méthode d'essai**

5. Pour s'assurer qu'une méthode d'ELGL similaire ou modifiée est fonctionnellement et structurellement similaire à l'ELGL et qu'elle mesure le même effet biologique, il convient d'inclure les éléments suivants dans le protocole d'essai:

— la substance d'essai est appliquée localement sur les deux oreilles de la souris,

— la prolifération des lymphocytes est quantifiée dans les ganglions lymphatiques qui drainent le site de l'application de la substance d'essai,

— la prolifération des lymphocytes est mesurée pendant la phase d'induction de la sensibilisation cutanée,

▼M3

— la dose maximale choisie pour la substance d'essai est la concentration maximale ne provoquant pas de toxicité systémique et/ou d'irritation cutanée locale excessive chez la souris. Pour les produits chimiques de référence positifs, la dose maximale doit être supérieure ou égale aux CE3 de l'ELGL pour les produits chimiques de référence correspondants (voir tableau 1) sans pour autant induire de toxicité systémique et/ou d'irritation cutanée locale excessive chez la souris,

— chaque étude comprend un véhicule témoin concurrent et, s'il y a lieu, un témoin positif concurrent,

— chaque groupe de dose comprend au moins quatre animaux,

— les données peuvent être collectées par animal ou par groupe d'animaux.

En cas de non-respect d'un de ces critères, les présentes normes de performance ne permettent pas de valider les méthodes similaires ou modifiées.

II. **Liste minimale de produits chimiques de référence**

6. On trouve dans les normes de performance harmonisées émanant du Comité de coordination interagences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) aux États-Unis, du Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM) et du Centre japonais pour la validation des méthodes alternatives (JaCVAM) (12) un minimum de 18 produits chimiques de référence à utiliser, auxquelles s'ajoutent quatre autres substances de référence facultatives. Ces quatre substances donnent des faux positifs ou faux négatifs avec l'ELGL, ce qui n'arrive pas avec les essais sur l'homme ou le cobaye (chapitre B.6 ou LD 406 de l'OCDE) (13), et permet de démontrer une performance supérieure ou égale à celle de l'ELGL. Le choix de ces produits chimiques s'appuie sur les critères suivants:

— la liste de produits chimiques de référence représente, d'une part, les types de substances dont on teste généralement le pouvoir de sensibilisation cutanée et, d'autre part, l'éventail des effets détectables ou prévisibles par l'ELGL,

— ces substances présentent des structures chimiques bien définies,

— des données ELGL provenant d'essais sur cobayes (d'après le chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13) et (si possible) sur l'homme sont disponibles pour chaque substance, et

— ces substances sont disponibles dans le commerce.

La liste des produits chimiques de référence recommandés est présentée dans le tableau 1. Les études utilisant les produits chimiques de référence proposés sont mises en œuvre avec le véhicule correspondant indiqué sur la liste du tableau 1. Si l'une des substances de référence de la liste n'est pas disponible, il est possible de recourir à d'autres substances répondant aux critères de sélection susmentionnés, en justifiant la démarche de manière appropriée.

▼M3

Tableau 1

Produits chimiques de référence recommandés pour les normes de performance ELGL

Numéro	Produit chimique (1)	Nº CAS	État	Véh (2)	CE3 % (3)	N (4)	0,5 x CE3 - 2,0 x CE3	Fourchette des CE3 mesurées	ELGL vs. cobaye	ELGL vs. homme
1	5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one (CMI)/2-méthyl-4-isothiazolin-3-one (MI) (5)	26172-55-4/ 2682-20-4	Liq	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AHO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-phénylènediamine	106-50-3	Sol	AHO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	chlorure de cobalt	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	isoeugénol	97-54-1	Liq	AHO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-mercaptobenzothiazole	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	citral	5392-40-5	Liq	AHO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AHO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	eugénol	97-53-0	Liq	AHO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	benzoate de phényle	93-99-2	Sol	AHO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	alcool cinnamique	104-54-1	Sol	AHO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	imidazolidinylurée	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	méthacrylate de méthyle	80-62-6	Liq	AHO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	chlorobenzène	108-90-7	Liq	AHO	25	1	n.a.	n.a.	–/–	–/ (*)
15	isopropanol	67-63-0	Liq	AHO	50	1	n.a.	n.a.	–/–	–/+

▼M3

Numéro	Produit chimique (1)	Nº CAS	État	Véh (2)	CE3 % (3)	N (4)	0,5 x CE3 - 2,0 x CE3	Fourchette des CE3 mesurées	ELGL vs. cobaye	ELGL vs. homme
16	acide lactique	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	n.a.	n.a.	–/–	–/ (*)
17	salicylate de méthyle	119-36-8	Liq	AHO	20	9	n.a.	n.a.	–/–	–/–
18	acide salicylique	69-72-7	Sol	AHO	25	1	n.a.	n.a.	–/–	–/–
Substances facultatives démontrant une amélioration des performances par rapport à l'ELGL										
19	sodium lauryl sulfate	151-21-3	Sol	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	diméthacrylate d'éthylène glycol	97-90-5	Liq	MEC	28	1	14-56	NC	+/–	+/+
21	xylène	1330-20-7	Liq	AHO	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/–
22	chlorure de nickel	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	n.a.	n.a.	–/+	–/+

Abréviations: AHO = acétone/huile d'olive (4:1, v/v); Nº CAS = Numéro attribué par le Chemical Abstracts Service; DMF = N,N-diméthylformamide; DMSO = diméthylsulfoxyde; DNCB = 2,4-dinitrochlorobenzène; CE3 = concentration estimée nécessaire pour produire un indice de stimulation de 3; cobaye = résultats obtenus sur cobayes (d'après B.6 ou la LD 406 de l'OCDE) (13); HCA = hexyl cinnamaldéhyde; Liq = liquide; ELGL = résultats sur murins de l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (d'après B.42 ou la LD 429 de l'OCDE) (1); MEC = méthyléthylcétone; n.a. = non applicable puisque l'indice de stimulation est inférieur à 3; NC = non calculée puisque les données proviennent d'une seule étude; Sol = solide; Véh = véhicule d'essai.

(*) Supposé non sensibilisant chez l'homme, dans la mesure où: on ne repère aucun résultat d'essai clinique épicutané; le produit n'est pas compris dans les kits de test épicutané des allergènes; on ne trouve aucun rapport de cas faisant état d'une sensibilisation chez l'homme.

(**) Données sur cobayes indisponibles.

(1) Les produits chimiques sont préparés chaque jour à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'on peut les stocker.

(2) En raison de l'impact éventuel des différents véhicules sur la performance de l'ELGL, il convient d'utiliser le véhicule recommandé pour chaque produit chimique de référence (24) (32).

(3) Il s'agit d'une valeur moyenne lorsque plusieurs CE3 sont disponibles. Pour les substances négatives (indice de stimulation < 3), la concentration maximale de l'essai est fournie.

(4) Nombre d'études ELGL dont découlent les données.

(5) Disponible dans le commerce sous forme de Kathon CG (Nº CAS 55965-84-9), un mélange de CMI et MI à 3:1. Les concentrations relatives de ces composés sont situées entre 1,1 % et 1,25 % pour la CMI, 0,3 % et 0,45 % pour la MI. Les composés inactifs sont des sels de magnésium (21,5 % à 24 %) et le nitrate de cuivre (0,15 % à 0,17 %), le reste de la formulation étant constitué de 74 % à 77 % d'eau. Le Kathon CG est disponible chez Sigma-Aldrich et Rohm and Haas (devenu Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Normes de fiabilité et de précision**

7. La précision d'une méthode d'ELGL similaire ou modifiée se doit d'égaler au moins les minima des normes ELGL dans le cadre d'une évaluation effectuée à l'aide des 18 produits chimiques de référence au minimum à utiliser. La méthode d'essai modifiée ou nouvelle devrait permettre de classer correctement les substances comme étant positives ou négatives. Cependant, elle ne devrait pas forcément permettre de classer comme il convient l'ensemble des 18 produits chimiques de référence au minimum à utiliser. Si, par exemple, l'un des sensibilisants légers est mal classé, l'essai pourra toutefois être considéré comme présentant des performances équivalentes à condition de fournir les raisons expliquant cette conclusion erronée, ainsi que des données supplémentaires pertinentes (par exemple des résultats corrects obtenus pour d'autres substances dont les propriétés physiques, chimiques et sensibilisantes sont analogues à celles du produit chimique de référence). Dans ces conditions, la validation d'une telle méthode d'ELGL modifiée ou nouvelle fera l'objet d'un examen au cas par cas.

Reproductibilité intralaboratoire

8. La reproductibilité intralaboratoire d'une méthode d'ELGL modifiée ou nouvelle est déterminée à l'aide d'un sensibilisant bien caractérisé par ELGL. En conséquence, les normes de performance de l'ELGL s'appuient sur la variabilité des résultats obtenus lors d'essais répétés avec de l'hexyl cinnamaldéhyde (HCA). La reproductibilité intralaboratoire est évaluée par comparaison des concentrations estimées minimales (CEm) obtenues avec l'HCA lors de quatre essais répétés à intervalles d'une semaine au moins. Cette reproductibilité intralaboratoire est jugée acceptable lorsqu'un laboratoire parvient à obtenir des CEm situées entre 5 % et 20 % pour chaque essai avec l'HCA, ce qui correspond à 0,5-2,0 fois la CE3 moyenne spécifiée pour l'HCA (10 %) dans l'ELGL (voir tableau 1).

Reproductibilité interlaboratoires

9. La reproductibilité interlaboratoires d'une méthode d'ELGL modifiée ou nouvelle est déterminée à l'aide de deux sensibilisants bien caractérisés par ELGL. Les normes ELGL s'appuient sur la variabilité des résultats d'essais effectués sur l'HCA et le 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) dans différents laboratoires. Les CEm respectives découlent d'études individuelles menées dans au moins trois laboratoires séparés. La reproductibilité interlaboratoires est jugée acceptable lorsque chaque laboratoire obtient des CEm situées entre 5 % et 20 % pour chaque essai avec l'HCA et entre 0,025 % et 0,1 % pour le DNCB, ce qui correspond à 0,5-2,0 fois la CE3 moyenne spécifiée respectivement pour l'HCA (10 %) et le DCNB (0,05 %) dans l'ELGL (voir tableau 1).

▼M3

Appendice 2

Définitions

Assurance qualité: procédé de gestion dans lequel le respect des normes d'essai, des obligations du laboratoire et des procédures d'enregistrement des données, ainsi que la précision du transfert des données, sont évalués par des personnes indépendantes de celles qui réalisent les essais.

Concentration estimée minimale (CEm): concentration estimée d'une substance d'essai nécessaire pour produire un indice de stimulation indiquant une réponse positive.

Concentration estimée trois (CE3): concentration estimée d'une substance d'essai nécessaire pour produire une réponse correspondant à un indice de stimulation égal à trois.

Faux négatif: substance d'essai identifiée à tort comme négative ou inactive à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait positive ou active (14).

Faux positif: substance d'essai identifiée à tort comme positive ou active à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait négative ou inactive (14).

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoires (14).

Indice de stimulation (IS): paramètre d'évaluation du potentiel de sensibilisation cutanée d'une substance d'essai, calculé comme le quotient de la prolifération mesurée dans les groupes traités sur celle du groupe témoin concurrent recevant le véhicule.

Méthode d'essai protégée: méthode d'essai dont la fabrication et la distribution sont protégées par des brevets, droits d'auteur, marques, etc.

Méthode d'essai validée: méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés (14).

Normes de performance: normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée, structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent: i) les éléments essentiels de la méthode d'essai; ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée; et iii) les niveaux de précision et de fiabilité, similaires à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (14).

Pertinence: description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (14).

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (14).

Produits chimiques de référence: produits chimiques choisis pour être utilisés dans le processus de validation, dont les réponses dans le système d'essai de référence in vitro ou in vivo ou sur l'espèce d'intérêt sont déjà connues. Ils doivent être représentatifs des classes de produits chimiques auxquelles il est prévu d'appliquer la méthode d'essai, et couvrir la gamme complète des réponses attendues des produits chimiques pour lesquels elle est conçue, qu'elles soient fortes, faibles ou négatives. Les différentes étapes du processus de validation, ainsi que différentes méthodes d'essai et utilisations d'essais, peuvent exiger des groupes de produits chimiques de référence différents (14).

▼**M3**

Réplique d'essai: méthode d'essai structurellement et fonctionnellement similaire à une méthode de référence validée et acceptée. Une telle méthode d'essai peut éventuellement faire l'objet d'une validation accélérée. Synonyme de méthode d'essai similaire (14).

Reproductibilité interlaboratoires: mesure du degré auquel différents laboratoires qualifiés qui emploient le même protocole et testent les mêmes substances d'essai peuvent produire des résultats similaires en termes de qualité et de quantité. La reproductibilité interlaboratoires est déterminée au cours des processus de prévalidation et de validation, et indique dans quelle mesure un essai peut être transféré sans problème entre laboratoires. On parle aussi de reproductibilité entre laboratoires (14).

Reproductibilité intralaboratoire: détermination du degré auquel divers membres du personnel qualifié d'un même laboratoire réussissent à obtenir des résultats identiques en ayant recours à un protocole spécifique à des moments différents. On parle aussi de reproductibilité au sein du laboratoire (14).

Risque: éventualité d'un effet indésirable sur la santé ou l'environnement. L'effet indésirable se manifeste uniquement lorsque le niveau d'exposition est suffisant.

Sensibilisation cutanée: processus immunologique résultant de l'exposition topique d'un sujet sensible à un allergène chimique inducteur, et qui se traduit par une réaction immunologique cutanée pouvant entraîner le développement d'une sensibilisation de contact.

Substance d'essai (également dénommée substance chimique d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

Substance étalon: substance sensibilisante ou non sensibilisante utilisée comme référence pour comparer les effets d'une substance d'essai. Une substance étalon doit posséder les propriétés suivantes: i) provenir d'une ou de plusieurs sources régulières et fiables; ii) présenter une similitude structurale et fonctionnelle avec la classe des substances testées; iii) posséder des caractéristiques physico-chimiques connues; iv) être accompagnée de données confirmant ses effets connus; et v) avoir une puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

Valeur aberrante: une valeur aberrante est une valeur observée qui diffère nettement des autres valeurs dans un échantillon aléatoire d'une population.

▼B

B.43. **ÉTUDE DE NEUROTOXICITÉ CHEZ LES RONGEURS**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 424 (1997) de l'OCDE.

Cette méthode d'essai a été conçue dans le but de recueillir des données permettant de confirmer ou de mieux caractériser la neurotoxicité potentielle d'une substance pour des animaux adultes. Elle peut être utilisée en association avec d'autres méthodes d'essai dans le cadre d'études de toxicité à dose répétée ou seule, en tant qu'étude indépendante. Il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE sur les stratégies d'essais en matière de neurotoxicité (1). Cette recommandation est particulièrement importante lorsqu'on envisage de s'écarter des observations et des protocoles d'essai préconisés dans cette méthode. Le document d'orientation est également utile pour choisir un protocole d'essai adapté à un cas spécifique.

L'évaluation de la neurotoxicité développementale n'est pas l'objet de la présente méthode.

1.1. INTRODUCTION

Dans l'évaluation des propriétés toxiques d'un produit chimique, il est important de prendre en considération la possibilité d'effets neurotoxiques. La méthode d'essai concernant la toxicité systémique à dose répétée permet déjà un premier tri des substances potentiellement neurotoxiques. La présente méthode peut être utilisée pour obtenir des informations complémentaires sur les effets neurotoxiques observés dans les études de toxicité systémique à dose répétée, et éventuellement pour confirmer ces effets. Cependant, la neurotoxicité potentielle de substances appartenant à certaines catégories pourra être évaluée de façon plus appropriée en appliquant directement la présente méthode, sans recueillir au préalable les indications qui peuvent être fournies par les études de toxicité systémique à dose répétée. Ce sera notamment le cas lorsque:

— des signes de neurotoxicité ou des lésions neuropathologiques sont observés dans des études de toxicité autres que des études de toxicité systémique à dose répétée, ou

— lorsque les substances présentent des similitudes de structure ou ont d'autres caractéristiques en commun avec des substances neurotoxiques connues.

Cette méthode peut aussi être utile dans d'autres cas; voir référence (1) pour plus de détails.

Cette méthode a été conçue de manière à pouvoir être adaptée, en fonction des besoins spécifiques, aussi bien pour confirmer la neurotoxicité histopathologique d'une substance chimique ou sa neurotoxicité sur le plan du comportement que pour caractériser et quantifier les neurotoxiques.

▼B

Autrefois, la neurotoxicité était assimilée à une forme de neuropathie englobant des lésions neuropathologiques ou des dysfonctionnements neurologiques tels que apoplexie, paralysie ou tremblements. Bien que la neuropathie soit une manifestation importante de la neurotoxicité, il apparaît aujourd'hui clairement qu'il existe de nombreux autres signes de toxicité pour le système nerveux (par exemple, perte de la coordination motrice, déficits sensoriels, diminution de la faculté d'apprentissage et de la mémoire) qui ne sont pas toujours mis en évidence par les études neuropathologiques ou autres.

La présente méthode d'essai de neurotoxicité vise à détecter, chez les rongeurs adultes, les effets importants sur le comportement et les effets neuropathologiques. Bien que des effets sur le comportement, même s'ils ne sont pas accompagnés de changements morphologiques, puissent révéler un impact néfaste sur l'organisme, les changements de comportement ne sont pas tous spécifiques du système nerveux. Par conséquent, tout changement observé doit être évalué par rapport aux données histopathologiques, hématologiques ou biochimiques correspondantes et aux résultats d'autres études de toxicité systémique. Les essais préconisés par la présente méthode pour caractériser et quantifier les réponses neurotoxiques comprennent des procédures histopathologiques et des procédures spécifiquement axées sur le comportement, qui pourront être étayées par des études électrophysiologiques et/ou biochimiques (1) (2) (3) (4).

Les agents neurotoxiques peuvent agir sur différentes cibles dans le système nerveux, et cela par différents mécanismes. Comme il est impossible de concevoir une seule série d'essais permettant d'évaluer de manière approfondie le potentiel neurotoxique de toutes les substances, il peut s'avérer nécessaire de mettre en œuvre d'autres essais in vivo ou in vitro spécifiques du type de neurotoxicité observé ou escompté.

La présente méthode d'essai peut également servir, en association avec le document d'orientation de l'OCDE sur les stratégies et les méthodes d'essais en matière de neurotoxicité, à concevoir des études destinées à mieux caractériser la relation dose-effet ou à en améliorer la sensibilité, en vue d'obtenir une meilleure estimation de la concentration sans effet nocif observé ou de mettre en évidence les dangers connus ou suspectés de la substance. On peut ainsi concevoir des études pour identifier et évaluer le ou les mécanisme(s) neurotoxiques ou pour compléter des données déjà fournies par l'application de protocoles de base d'observations du comportement et d'observations neuropathologiques. Lors de ces études, il est inutile de chercher à obtenir en double des données qui seraient de toute façon obtenues en suivant les protocoles préconisés par cette méthode, si ces données sont déjà disponibles et ne sont pas nécessaires pour l'interprétation des résultats de l'étude.

Les informations recueillies dans cette étude de neurotoxicité, qu'elle soit réalisée de façon indépendante ou couplée à d'autres études, permettent de:

— déterminer si les effets de la substance chimique sur le système nerveux sont permanents ou réversibles,

— mieux caractériser les altérations du système nerveux qui sont liées à l'exposition à la substance et faciliter la compréhension du mécanisme sous-jacent,

▼B

— déterminer les relations entre dose et effet et entre temps et effet afin de pouvoir estimer la concentration sans effet nocif observé (laquelle pourra servir à établir les critères de sécurité de la substance).

Dans cette méthode, la substance d'essai est administrée par voie orale. Si d'autres voies, comme la voie dermique ou l'inhalation, paraissent plus appropriées, des modifications des procédures recommandées s'imposent. Le choix de la voie d'administration est dicté par les circonstances de l'exposition humaine et par les informations toxicologiques ou cinétiques disponibles.

1.2. DÉFINITIONS

Effet nocif: toute altération par rapport à une situation de référence, qui est due au traitement et qui diminue l'aptitude d'un organisme à survivre, à se reproduire ou à s'adapter à l'environnement.

Dose: la quantité de substance d'essai administrée. La dose s'exprime en poids (g, mg) de substance d'essai ou en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience (par exemple mg/kg) ou en concentration dans le régime (ppm).

Dosage: un terme général qui comprend la dose, la fréquence et la durée de l'administration.

Neurotoxicité: une altération de la structure ou de la fonction du système nerveux qui est la conséquence d'une exposition à un agent chimique, biologique ou physique.

Agent neurotoxique: tout agent chimique, biologique ou physique capable d'induire une neurotoxicité.

CSENO: concentration maximale dans effet nocif observé, c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif imputable au traitement n'est observé.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance à tester est administrée par voie orale à différents niveaux de dose à plusieurs groupes de rongeurs. L'administration se fait généralement à doses répétées sur une période qui peut être de 28 jours, de 90 jours (étude subchronique) ou d'une année ou plus (étude chronique). Les procédures décrites dans cette méthode peuvent également être appliquées dans le cas d'une étude de neurotoxicité aiguë. Les animaux sont soumis à l'essai afin de détecter ou de caractériser des anomalies de comportement ou d'ordre neurologique. Au cours de chaque période d'observation, différents aspects du comportement qui pourraient être indicatifs d'une atteinte neurotoxique sont évalués. À la fin de l'essai, une partie des animaux de chaque groupe et de chaque sexe sont perfusés in situ et des coupes du cerveau, de la moelle épinière et des nerfs périphériques sont préparées et examinées.

Lorsque l'étude est conduite de façon indépendante pour dépister une neurotoxicité ou caractériser des effets neurotoxiques, les animaux de chaque groupe qui ne sont pas utilisés pour la perfusion et l'examen histopathologique (voir tableau 1) peuvent servir pour des examens du comportement et des examens neuropathologiques, neurochimiques ou électrophysiologiques qui permettent de compléter les données recueillies dans les observations de base préconisées par la présente méthode (1). Ces examens complémentaires peuvent être particulièrement utiles lorsque des observations empiriques ou des effets escomptés laissent prévoir un type spécifique de neurotoxicité ou une cible spécifique pour cette neurotoxicité. Une autre possibilité est d'utiliser les animaux restants dans des évaluations telles que celles qui sont préconisées par les méthodes d'essai de toxicité à doses répétées chez les rongeurs.

▼B

Lorsque les procédures de la présente méthode d'essai sont combinées avec celles d'autres méthodes, il faut prévoir un nombre suffisant d'animaux pour pouvoir effectuer les observations requises par les deux études.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Choix de l'espèce animale**

Le rat est l'espèce préférée, mais d'autres espèces de rongeurs peuvent être utilisées moyennant justification du choix. Il convient de recourir aux souches couramment utilisées en laboratoire. Les animaux doivent être adultes, jeunes et sains. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. L'administration des doses doit débuter aussitôt après le sevrage, de préférence avant que les animaux n'atteignent l'âge de six semaines et en tout état de cause avant neuf semaines. Cependant, lorsque la présente étude est couplée à d'autres études, cette limite d'âge peut faire l'objet d'un ajustement. Au début de l'étude, les variations de poids entre animaux ne doivent pas dépasser plus ou moins 20 % du poids moyen des animaux du même sexe. Si une étude de toxicité orale à dose répétée de faible durée est réalisée en tant qu'essai préliminaire avant une étude à long terme, il faut utiliser des animaux de même souche et de même provenance dans les deux études.

1.4.2. **Conditions d'hébergement et d'alimentation**

La température du local des animaux d'expérience doit être de 22 °C (± 3 °C). L'humidité relative doit atteindre au moins 30 % et rester de préférence inférieure à 70 %, mais en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. On appliquera un éclairage artificiel alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les bruits forts intermittents doivent être réduits au minimum. Pour l'alimentation des animaux, on pourra utiliser la nourriture classique de laboratoire avec de l'eau potable à satiété. Le choix du régime peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai lorsqu'elle est administrée dans la nourriture. Les animaux peuvent être placés dans des cages soit individuellement, soit par petits groupes du même sexe.

1.4.3. **Préparation des animaux**

Des animaux jeunes et sains sont choisis au hasard pour être répartis entre les groupes de contrôle et de traitement. Les cages sont disposées de manière à minimiser les effets possibles dus à l'agencement des cages. Les animaux sont marqués individuellement afin de permettre leur identification. Ils sont maintenus dans les cages pendant cinq jours au moins avant le début de l'étude pour leur permettre de s'acclimater aux conditions du laboratoire.

1.4.4. **Voies d'administration et préparation des doses**

Dans cette méthode, la substance d'essai est administrée par voie orale. La substance à tester peut être administrée par gavage ou en capsules ou incorporée dans la nourriture ou l'eau de boisson. D'autres voies d'administration (par exemple voie dermique ou inhalation) peuvent être utilisées, mais nécessiteront le cas échéant des modifications du mode opératoire. Le choix de la voie d'administration est dicté par les circonstances de l'exposition humaine et par les informations toxicologiques ou cinétiques disponibles. Le choix de la voie d'administration ainsi que les éventuelles modifications du mode opératoire doivent être justifiés.

▼B

Si nécessaire, la substance d'essai peut être dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il est recommandé de privilégier les solutions ou suspensions aqueuses. À défaut, on peut utiliser une solution dans l'huile (huile de maïs, par exemple) et, en dernier recours, une solution dans d'autres véhicules. Lorsque le véhicule n'est pas aqueux, il faut en connaître les propriétés toxiques. D'autres caractéristiques du véhicule peuvent avoir de l'importance, notamment des éventuels effets sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai, pouvant agir sur les propriétés toxiques de celle-ci, et des effets sur la consommation de nourriture ou d'eau ou sur l'état nutritionnel des animaux.

1.5. MODE OPÉRATOIRE

1.5.1. **Nombre et sexe des animaux**

Lorsqu'il s'agit d'une étude indépendante, il faut utiliser au moins vingt animaux (dix femelles et dix mâles) dans chaque groupe de traitement et dans chaque groupe témoin pour les observations cliniques et fonctionnelles. À la fin de l'étude, au moins cinq mâles et cinq femelles sont prélevés parmi ces dix mâles et ces dix femelles pour être perfusés in situ et soumis à un examen neurohistopathologique. Lorsque dans un groupe de dosage, les observations visant à détecter les effets neurotoxiques ne sont réalisées que sur un nombre limité d'animaux, il convient que ces animaux fassent partie de ceux qui seront choisis pour être perfusés. Si l'étude est combinée avec une étude de toxicité à doses répétées, le nombre des animaux doit être suffisant pour que les objectifs des deux études puissent être atteints. Le tableau 1 donne les nombres minimaux d'animaux par groupe pour différentes combinaisons d'études. S'il est prévu de sacrifier des animaux avant le terme de l'étude ou de constituer des groupes pour observer la réversibilité des effets, leur persistance ou l'apparition différée d'effets toxiques après traitement, ou si des observations complémentaires sont envisagées, il faut augmenter le nombre d'animaux pour s'assurer que le nombre requis pour les observations et les examens histopathologiques sera disponible.

1.5.2. **Groupes de traitement et groupes témoins**

En règle générale, on doit disposer d'au moins trois groupes d'animaux traités et d'un groupe témoin. Cependant, s'il ressort de l'évaluation d'autres données qu'aucun effet n'est à attendre d'une administration répétée à la dose de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, on peut procéder à un essai limite. Si l'on ne dispose pas de données adéquates, on peut mener une étude préliminaire visant à délimiter la gamme des niveaux de doses à utiliser. À l'exception de l'exposition à la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités exactement de la même manière que les animaux des groupes de traitement. Si la substance à tester est incorporée dans un véhicule, le groupe témoin doit en recevoir un volume égal au plus grand volume utilisé dans les groupes de traitement.

1.5.3. **Contrôle de la fiabilité**

Le laboratoire chargé de l'étude doit présenter des données attestant de sa capacité à réaliser l'étude et prouvant la sensibilité des méthodes employées. Ces données doivent constituer une preuve évidente de la faculté du laboratoire à détecter et, le cas échéant, à quantifier les changements observés pour les différents critères d'évaluation, notamment réactions neurovégétatives, réactivité sensorielle, force de préhension et activité motrice. Les références 2 à 9 contiennent des informations sur les substances qui provoquent différents types de réponses neurotoxiques et qui peuvent servir de témoins positifs. Des données antérieures peuvent également être utilisées à condition que les principaux éléments des procédures expérimentales soient restés les mêmes. Des mises à jour périodiques de ce type de données sont recommandées. Chaque fois que le laboratoire modifie un élément essentiel du mode opératoire ou des méthodes employées, de nouvelles données doivent être réunies pour démontrer que la sensibilité des procédures est maintenue.

▼B

1.5.4. **Choix des doses**

Les niveaux de dose doivent être choisis en fonction des données disponibles concernant la toxicité et la toxico-cinétique de la substance d'essai ou de substances apparentées. La dose la plus élevée est choisie dans le but de provoquer des effets neurotoxiques ou des effets de toxicité systémique manifeste. Il faut ensuite choisir une série de doses décroissantes de façon à mettre en évidence une éventuelle relation dose-effet et l'absence d'effets nocifs observables au niveau de la dose la plus faible (CSENO). En principe, les niveaux de doses doivent être choisis de telle manière que l'on puisse distinguer les effets neurotoxiques primaires des effets liés à la toxicité systémique. Deux à trois intervalles entre niveaux successifs représentent fréquemment la meilleure solution et il est souvent préférable d'ajouter un quatrième groupe d'essai plutôt que de fixer des intervalles trop espacés (par exemple dépassant un facteur dix) entre les niveaux de dose. Lorsque des estimations réalistes de l'exposition humaine existent, il faut en tenir compte.

1.5.5. **Essai limite**

Si une étude réalisée à une dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour selon la méthode décrite ci-dessus ne provoque aucun effet toxique observable, et que d'après les données obtenues pour des composés de structure analogue il est peu probable que la substance testée soit toxique, on peut considérer qu'il est inutile d'effectuer une étude complète sur trois niveaux de dose. En fonction de l'exposition humaine escomptée, il pourra s'avérer nécessaire d'administrer une dose plus forte par voie orale pour l'essai limite. Pour les autres voies d'administration, comme l'inhalation ou l'application cutanée, ce sont souvent les propriétés physiques et chimiques de la substance qui déterminent le niveau d'exposition maximal. Dans le cas d'une étude orale aiguë, la dose de l'essai limite doit être au moins 2 000 mg/kg.

1.5.6. **Administration des doses**

La substance à tester est administrée aux animaux quotidiennement, sept jours par semaine, sur une période d'au moins 28 jours. L'administration à raison de cinq jours par semaine ou l'adoption d'une période d'exposition plus courte demandent à être justifiées. Lorsque la substance est administrée par gavage, les animaux doivent recevoir une dose unique introduite au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel. Toutefois, dans le cas d'une solution aqueuse, il est possible d'utiliser jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Exception faite pour les substances irritantes ou corrosives, qui donneraient normalement lieu à des effets fortement amplifiés à des concentrations plus élevées, il convient de minimiser les variations du volume administré en ajustant la concentration de façon à maintenir un volume constant à tous les niveaux de dose.

Lorsque la substance est administrée dans la nourriture ou l'eau de boisson, il importe que les quantités de substance utilisées ne modifient pas les bilans nutritionnels ou hydriques normaux. Lorsque la substance est administrée dans la nourriture, deux possibilités sont offertes: soit le maintien d'une concentration constante (exprimée en ppm), soit le maintien d'un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal. L'option choisie doit être précisée. Lorsque la substance est administrée par gavage, la dose doit être administrée chaque jour à la même heure et la quantité doit être ajustée de manière à maintenir un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'un essai à dose répétée sert d'étude préliminaire à une étude à long terme, il faut appliquer le même régime alimentaire dans les deux études. Pour les études de toxicité aiguë, si la dose ne peut être administrée en une seule fois, il est possible de la fractionner sur période n'excédant pas 24 heures.

▼B

1.6. OBSERVATIONS

1.6.1. **Fréquence des observations et essais**

Dans les études à doses répétées la période d'observation doit s'étendre sur toute la période de traitement. Dans les études de toxicité aiguë, les observations sont poursuivies pendant 14 jours après le traitement. Les animaux de groupes satellites (qui ne sont pas exposés pendant une certaine période après le traitement) sont observés également pendant 14 jours.

Les observations doivent être suffisamment fréquentes pour favoriser la détection de toute anomalie de comportement ou d'ordre neurologique. Les observations se font de préférence aux mêmes moments chaque jour, en tenant compte de la période au cours de laquelle les effets escomptés du traitement seront les plus marqués. Le tableau 2 récapitule la fréquence des observations cliniques et des tests fonctionnels. Si des données de cinétique et autres, obtenues dans des études antérieures, indiquent que d'autres moments de la journée sont plus propices aux observations, essais ou observations après traitement, il y a lieu d'adopter un échéancier différent afin de recueillir le plus d'informations possible. Les modifications de l'échéancier doivent être justifiées.

1.6.1.1. *Surveillance de l'état de santé général et relevés de mortalité/morbidité*

Tous les animaux font l'objet d'un examen minutieux au moins une fois par jour pour vérifier leur état de santé, et des relevés de la morbidité et de la mortalité sont effectués au moins deux fois par jour.

1.6.1.2. *Observations cliniques détaillées*

Tous les animaux choisis pour être soumis à un examen clinique approfondi (voir tableau 1) subissent cet examen une fois avant la première exposition (pour permettre des comparaisons sur un même individu) et à divers intervalles par la suite, en fonction de la durée de l'étude (voir tableau 2). Les groupes satellites destinés à l'observation de la réversibilité des effets sont examinés à la fin de la période de récupération. Ces examens doivent être effectués hors de la cage habituelle, sur une aire standard. Les résultats doivent être soigneusement consignés, de préférence à l'aide de systèmes de cotation utilisant des critères ou d'échelles de cotation, pour chaque mesure effectuée. Les critères ou échelles employés doivent être explicitement définis par le laboratoire. Il faut s'efforcer de minimiser les variations des conditions d'essai (mis à part celles qui sont liées au traitement) et prendre les dispositions nécessaires pour que les examens soient effectués par des observateurs expérimentés n'ayant pas connaissance du traitement administré.

Il est recommandé de procéder de manière structurée en appliquant systématiquement, pour chaque animal et à chaque moment d'observation, des critères bien définis. Les données utilisées pour définir le niveau normal doivent être présentées. Tous les signes observés doivent être consignés. L'ampleur des signes observés est également consignée chaque fois que cela est possible. Les observations cliniques devraient notamment porter sur les modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des membranes muqueuses, l'apparition de sécrétions et d'excrétions et de réactions neurovégétatives (sécrétion de larmes, horripilation, variation du diamètre pupillaire, rythme respiratoire inhabituel, respiration par la bouche, tous signes inhabituels de miction ou défécation, urine décolorée, par exemple).

▼B

Il convient également de consigner toute réaction inhabituelle en ce qui concerne la position du corps, le niveau d'activité (par exemple exploration accrue ou diminuée de l'aire standard) et la coordination des mouvements. Il convient également de consigner les modifications dans la démarche (dandinement, ataxie, par exemple), dans la posture (dos arrondi, par exemple) et la réaction à la manipulation, au placement et autres stimuli, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, les convulsions et tremblements, les comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou les comportements bizarres (par exemple, tendance à mordre, léchage excessif, automutilation, marche à reculons, vocalisation) ou l'agressivité.

1.6.1.3. *Tests fonctionnels*

Comme dans le cas des observations cliniques, les tests fonctionnels sont réalisés sur tous les animaux sélectionnés à cet effet (voir tableau 1) une fois avant l'exposition et fréquemment ensuite. La fréquence des tests fonctionnels dépend également de la durée de l'étude (voir tableau 2). En plus des périodes d'observation stipulées dans le tableau 2, des observations fonctionnelles sont réalisées sur des groupes satellites aussi près que possible du sacrifice final. Les tests fonctionnels explorent notamment la réactivité sensorielle à divers stimuli [par exemple, stimuli auditifs, visuels et proprioceptifs (5) (6) (7)], la force de préhension (8) et l'activité motrice (9). Cette dernière doit être mesurée à l'aide d'un dispositif automatique pouvant détecter aussi bien les hausses que les baisses d'activité. Si un autre système défini est utilisé, il doit être quantitatif et de sensibilité et de fiabilité démontrées. Chaque dispositif doit être testé afin de garantir sa fiabilité au cours du temps et la cohérence des résultats d'un dispositif à l'autre. On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. En l'absence d'informations sur le potentiel neurotoxique (par exemple, informations sur la relation structure-activité, données épidémiologiques, autres études toxicologiques), il convient d'envisager des tests plus spécialisés d'exploration des fonctions sensorielles et motrices ou de la mémoire et de la faculté d'apprentissage. La référence (1) fournit de plus amples informations sur les tests plus spécialisés et leur utilisation.

Exceptionnellement, les animaux qui montrent des signes de toxicité marqués qui risqueraient de fausser considérablement les résultats du test fonctionnel peuvent ne pas être soumis à ce test. La décision d'écarter des animaux d'un test fonctionnel doit être justifiée.

1.6.2. **Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau**

Dans les études allant jusqu'à 90 jours, tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. Il faut également mesurer la quantité de nourriture consommée (ou d'eau consommée, lorsque la substance est administrée par cette voie), au moins une fois par semaine. Dans les études à long terme, tous les animaux sont pesés au moins une fois par semaine pendant les treize premières semaines et au moins une fois toutes les quatre semaines par la suite. La quantité de nourriture consommée (ou d'eau, si la substance est administrée par cette voie) doit être mesurée au moins une fois par semaine pendant les treize premières semaines et à peu près tous les trois mois par la suite, à moins qu'une détérioration de l'état général ou un amaigrissement n'imposent d'autres conditions.

▼B

1.6.3. **Ophtalmologie**

Dans les études de plus de 28 jours, un examen ophtalmologique à l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un autre appareil approprié doit être effectué avant l'administration de la substance et au terme de l'étude. Cet examen est effectué de préférence sur tous les animaux et en tout état de cause au moins sur ceux du groupe ayant reçu la dose la plus forte ainsi que sur les animaux des groupes témoins. Si des altérations sont détectées dans les yeux, ou si des signes cliniques y incitent, l'examen est étendu à tous les animaux. Dans les études à long terme, un examen ophtalmologique est prévu après treize semaines. Des examens ophtalmologiques ne sont pas nécessaires si les informations pertinentes ont déjà été fournies par d'autres études de durée similaire réalisées à des doses comparables.

1.6.4. **Hématologie et biochimie clinique**

Lorsque l'étude de neurotoxicité est conduite en combinaison avec une étude de toxicité systémique à doses répétées, les examens hématologiques et les déterminations de biochimie clinique doivent être effectués comme prescrit par la méthode correspondante de l'étude de toxicité systémique. Les échantillons sont à prélever de telle façon que les effets possibles sur le comportement neurologique soient réduits au minimum.

1.6.5. **Histopathologie**

L'examen neuropathologique doit être conçu dans le but de compléter et d'approfondir les observations faites pendant la phase in vivo de l'étude. Les tissus d'au moins cinq animaux de chaque sexe et de chaque groupe (voir le tableau 1 et le paragraphe suivant) doivent être fixés in situ à l'aide des techniques de perfusion et de fixation usuelles (voir le chapitre 5 de la référence 3 et le chapitre 50 de la référence 4). Tout changement important observable doit être consigné. S'il s'agit d'une étude indépendante, réalisée pour dépister une neurotoxicité ou pour caractériser des effets neurotoxiques, les animaux restants peuvent être utilisés pour des examens spécifiques du comportement neurologique (10) (11), des examens neuropathologiques (10) (11) (12) (13), neurochimiques (10) (11) (14) (15) ou électrophysiologiques (10) (11) (16) (17) pouvant éventuellement compléter les procédures et examens décrits ici, ou bien venir s'ajouter aux animaux soumis à l'examen histopathologique. Ces procédures complémentaires sont particulièrement utiles lorsque, à la suite d'observations empiriques ou sur la base des effets escomptés, on peut s'attendre à un type spécifique de neurotoxicité ou à une cible spécifique de celle-ci (2) (3). Ces animaux restants peuvent également servir dans les évaluations pathologiques de routine qui sont décrites dans la méthode à doses répétées.

Les échantillons de tissus sont colorés par une méthode usuelle, par exemple par de l'hématoxyline et de l'éosine, inclus dans de la paraffine et examinés sous le microscope. Si des signes de neuropathie périphérique sont observés ou en cas de suspicion de tels effets, il conviendra d'examiner des échantillons de tissu nerveux périphérique inclus dans du plastique. Certains signes cliniques peuvent également inciter à l'examen d'autres sites ou à l'utilisation de méthodes de coloration spéciales. Les références (3) et (4) fournissent des indications sur les sites supplémentaires à examiner. Des colorants spéciaux peuvent aussi être utiles pour mettre en évidence des types spécifiques d'altérations pathologiques (18).

▼B

Un examen histologique doit être réalisé sur des coupes représentatives du système nerveux central et périphérique (voir le chapitre 5 de la référence 3 et le chapitre 50 de la référence 4). Les sites examinés doivent normalement comprendre le cerveau antérieur, le centre des hémisphères cérébraux, comprenant une coupe de l'hippocampe, le cerveau central, le cervelet, la protubérance annulaire, le bulbe rachidien, l'œil avec le nerf optique et la rétine, la moelle épinière et les renflements cervicaux et lombaires, les ganglions de la chaîne dorsale, les fibres de la chaîne dorsale et ventrale, le nerf sciatique proximal, le nerf tibial proximal (au genou) et les ramifications du nerf tibial aux muscles du mollet. Les sections de la moelle épinière et des nerfs périphériques doivent comprendre des coupes transversales et longitudinales. Il faut accorder une attention particulière à la vascularisation du système nerveux. Un échantillon de muscles squelettiques, en particulier du mollet, devrait également être examiné. Une attention particulière devrait être accordée aux régions à structure cellulaire et fibreuse du système nerveux central et périphérique, qui sont connues pour être particulièrement sujettes aux attaques neurotoxiques.

Les références (3) et (4) fournissent des informations sur les altérations neuropathologiques typiquement liées aux expositions à une substance neurotoxique. Il est recommandé de procéder par étapes pour l'examen des échantillons de tissus, en comparant d'abord des coupes du groupe ayant reçu la forte dose avec des coupes du groupe témoin. Si aucune altération neuropathologique n'est constatée dans les échantillons de ces groupes, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'analyse. Si des altérations neuropathologiques apparaissent dans le groupe traité à la forte dose, il faut alors examiner successivement des échantillons de tous les tissus potentiellement affectés des groupes traités à la dose intermédiaire et à la dose faible.

Si l'examen qualitatif met en évidence des signes d'altérations neuropathologiques, il convient de procéder à un second examen de toutes les régions du système nerveux qui présentent ces altérations. Dans tous les groupes de dosage, il convient de réaliser des coupes de toutes les régions potentiellement affectées, qui seront ensuite codées, puis examinées à l'aveugle dans un ordre aléatoire. La fréquence et la gravité de chaque lésion sont consignées. Quand toutes les régions de tous les groupes ont été cotées, le code est cassé et une analyse statistique est faite afin de déterminer la relation dose-réponse. Il faut donner la description des différents degrés de gravité de chaque lésion.

Les résultats de l'examen neuropathologique doivent être évalués à la lumière des observations et déterminations fonctionnelles, ainsi que des résultats des études de toxicité systémique réalisées sur la substance.

2. RÉSULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Il faut présenter les résultats relatifs à chaque individu. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux montrant pour chaque groupe d'essai ou groupe témoin le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts ou euthanasiés au cours de l'essai, le moment de chaque décès ou sacrifice, le nombre d'animaux manifestant des signes de toxicité, une description de ces signes, y compris le moment de leur apparition, leur durée, leur type et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, le type de ces dernières et leur gravité.

▼B

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats de l'étude doivent être évalués sur les plans de la fréquence, de la gravité et de la corrélation des effets neuropathologiques et de comportement (le cas échéant, neurochimiques et électrophysiologiques si des examens supplémentaires ont été pratiqués) avec d'autres effets nocifs observés. Dans la mesure du possible, les résultats numériques devraient être évalués au moyen d'une méthode statistique adéquate et communément acceptée. Les méthodes statistiques doivent être choisies au moment de la conception de l'étude.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit comporter les informations ci-après:

Substance d'essai:

— nature physique (y compris isomérisation, pureté et propriétés physico-chimiques),

— données permettant l'identification.

Véhicule (le cas échéant):

— justification du choix du véhicule.

Animaux d'expérience:

— espèce/souche utilisée,

— nombre, âge et sexe des animaux,

— source, conditions d'encagement, acclimatation, alimentation, etc.,

— source, conditions d'encagement, acclimatation, alimentation, etc.

Conditions de l'essai:

— description détaillée de la formulation de la substance à tester et/ou de la préparation alimentaire, concentration atteinte, stabilité et homogénéité de la préparation,

— précisions sur les doses administrées, le véhicule, le volume et la forme physique du mélange administré,

— précisions sur le mode d'administration de la substance à tester,

— justification du choix des niveaux de dose,

— justification du choix de la voie et de! a durée d'exposition,

— conversion de la concentration (en ppm) de la substance à tester dans la nourriture ou dans l'eau de boisson en dose (en mg/kg de poids corporel/jour), le cas échéant,

— précisions sur la qualité des aliments et de l'eau.

Procédures d'observation et d'essais:

— précisions sur l'affectation des animaux de chaque groupe aux sous-groupes de perfusion,

— précisions sur les systèmes de cotation, les critères et les échelles utilisés pour chaque détermination lors des observations cliniques détaillées,

▼B

— précisions sur les tests fonctionnels d'exploration de la réactivité sensorielle à divers stimuli (par exemple stimuli auditifs, visuels et proprioceptifs); précisions sur l'évaluation de la force de préhension; précisions sur l'évaluation de l'activité motrice (y compris détails sur les dispositifs automatiques de détection de l'activité) et sur les autres procédures,

— précisions sur les examens ophtalmologiques et, le cas échéant, hématologiques et sur les tests de biochimie clinique, avec indication des valeurs de référence,

— précisions sur les procédures spécifiques de recherche des modifications du comportement et des altérations neuropathologiques, neurochimiques et électrophysiologiques.

Résultats:

— poids corporel/variations du poids corporel et poids au moment du sacrifice,

— consommation d'aliments et d'eau, le cas échéant,

— informations sur les réactions de toxicité, par sexe et par niveau de dose, y compris les symptômes de toxicité ou mortalité,

— nature, gravité et durée (moment du début et évolution observée) des observations cliniques détaillées (préciser si les effets sont réversibles ou non),

— description détaillée des résultats de tous les tests fonctionnels,

— résultats de l'autopsie,

— description détaillée de toutes les observations concernant le comportement, les modifications neuropathologiques, neurochimiques et électrophysiologiques, le cas échéant,

— données concernant l'absorption et le métabolisme, si disponibles,

— traitement statistique des résultats, le cas échéant.

Discussion des résultats:

— informations concernant la relation dose-réponse,

— rapport entre tout autre effet toxique et une conclusion quant au potentiel neurotoxique de la substance,

— concentration sans effet nocif observé.

Conclusions:

— une appréciation sur la neurotoxicité globale de la substance est demandée.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris In Preparation.

(2) Test Guidline for a Developmental Neurotoxicitu Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

(3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria Document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals.

(4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, p. 726-742.

▼B

(5) Tupper D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, p. 999-1003.

(6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, p. 691-704.

(7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, p. 267-283.

(8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, p. 233-236.

(9) Crofton, K.M., Haward, J.L, Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, p. 599-609.

(10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

(11) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

(12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, p. 689-695.

(13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, p. 343-352.

(14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, p. 445-452.

(15) O'Callaghan, J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, p. 368-378.

(16) Fox, D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, p. 299-335.

(17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in Neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds, Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, p. 726-742.

(18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Tableau 1

Nombres minimaux d'animaux requis par groupe selon que l'étude de neurotoxicité est conduite séparément ou en combinaison avec d'autres études

	ÉTUDE DE NEUROTOXICITÉ CONDUITE COMME:			
	Étude séparée	Étude combinée avec une étude sur 28 jours	Étude combinée avec une étude sur 90 jours	Étude combinée avec une étude de toxicité chronique
Nombre total d'animaux par groupe	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles	15 mâles et 15 femelles	25 mâles et 25 femelles
Nombre d'animaux sélectionnés pour les tests fonctionnels, y compris les observations cliniques détaillées	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles	10 mâles et 10 femelles
Nombre d'animaux sélectionnés pour la perfusion in situ et l'examen neurohistopathologique	5 mâles et 5 femelles	5 mâles et 5 femelles	5 mâles et 5 femelles	5 mâles et 5 femelles
Nombre d'animaux sélectionnés pour les essais de toxicité à dose répétée, de toxicité subchronique et chronique, les études hématologiques, de biochimie clinique, histopathologiques, etc., comme indiqué dans les lignes directrices correspondantes		5 mâles et 5 femelles	10 mâles † et 10 femelles †	20 mâles † et 20 femelles †
Observations complémentaires, le cas échéant	5 mâles et 5 femelles			

† Ce nombre comprend cinq animaux sélectionnés pour les tests fonctionnels et les observations cliniques détaillées faisant partie de l'étude de neurotoxicité.

▼B

Tableau 2

Fréquence des observations cliniques et périodicité des tests fonctionnels

Type d'observation		Durée de l'étude			
		Étude de toxicité aiguë	28 jours	90 jours	Étude de toxicité chronique
Sur tous les animaux	État de santé général	quotidiennement	quotidiennement	quotidiennement	quotidiennement
	Mortalité/morbidité	deux fois par jour	deux fois par jour	deux fois par jour	deux fois par jour
Sur les animaux sélectionnés pour les observations fonctionnelles	Observations cliniques détaillées	— avant la première exposition — dans les huit heures suivant l'administration, au moment où l'effet est censé être le plus prononcé — aux jours 7 et 14 après administration	— avant la première exposition — une fois par semaine ensuite	— avant la première exposition — une fois pendant la première ou la deuxième semaine d'exposition — une fois par mois ensuite	— avant la première exposition — une fois à la fin du premier mois d'exposition — tous les trois mois ensuite
	Tests fonctionnels	— avant la première exposition — dans les huit heures suivant l'administration, au moment où l'effet est censé être le plus prononcé — aux jours 7 et 14 après administration	— avant la première exposition — pendant la quatrième semaine du traitement le plus près possible de la fin de la période d'exposition	— avant la première exposition — une fois pendant la première ou la deuxième semaine d'exposition — une fois par mois ensuite	— avant la première exposition — une fois à la fin du premier mois d'exposition — tous les trois mois ensuite

▼B

B.44. **ABSORPTION CUTANÉE: MÉTHODE IN VIVO**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 427 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La voie d'exposition à de nombreux produits chimiques est essentiellement transcutanée, c'est-à-dire via la peau. Or, la majorité des études toxicologiques réalisées sur des animaux de laboratoire s'appuient sur une administration des produits par voie orale. L'étude d'absorption cutanée in vivo décrite dans la présente méthode offre donc les éléments nécessaires pour extrapoler les résultats des études par administration orale, lors des évaluations en matière de sécurité réalisées après exposition cutanée.

Avant de passer dans la circulation sanguine, une substance doit d'abord traverser un grand nombre de couches cellulaires de la peau. Pour la plupart des substances, c'est le stratum corneum, composé de cellules mortes, qui est la couche déterminante sur le plan cinétique. La perméabilité de la peau dépend à la fois de la lipophilicité de la substance et de l'épaisseur de la couche externe de l'épiderme, ainsi que d'autres facteurs tels que le poids moléculaire et la concentration de la substance. De manière générale, la peau des rats et des lapins est plus perméable que celle de l'homme, tandis que celle des cobayes, des porcs et des singes se rapproche de la peau humaine.

Les méthodes de mesure de l'absorption percutanée sont de deux types: in vivo et in vitro. La méthode in vivo fournit de bonnes informations sur l'absorption cutanée chez différentes espèces de laboratoire. Mises au point plus récemment, les méthodes in vitro se fondent sur le transport d'une substance à travers tout ou partie de l'épaisseur de la peau humaine ou animale jusqu'à un réservoir de fluide. La méthode in vitro est décrite dans une autre méthode d'essai (1). Pour choisir la méthode la mieux appropriée en fonction des situations données, il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE pour la conduite des études d'absorption cutanée (2) qui examine en détails la pertinence respective des méthodes in vivo et in vitro.

La méthode *in vivo* décrite dans la présente méthode permet de déterminer que la substance d'essai a traversé la peau pour pénétrer dans le compartiment systémique. La technique est largement utilisée depuis de nombreuses années (3) (4) (5) (6) (7). Alors que les études in vitro d'absorption percutanée conviennent dans de nombreux cas, il existe certaines situations dans lesquelles seule une étude in vivo permet d'obtenir les données voulues.

Les avantages de la méthode *in vivo* sont les suivants: utilisation d'un système intact sur les plans physiologique et métabolique, utilisation d'une espèce commune à bon nombre d'études de toxicité, et possibilité de modification pour une utilisation sur d'autres espèces. En revanche, elle présente certains inconvénients: utilisation d'animaux vivants, utilisation de matière radiomarquée pour garantir la fiabilité des résultats, difficultés à déterminer la phase d'absorption précoce, et différences de perméabilité entre la peau humaine et celle des espèces les plus communément utilisées (rat). En effet, la peau animale est généralement plus perméable, ce qui peut conduire à une surestimation de l'absorption percutanée chez l'homme (6) (8) (9). Les substances caustiques et corrosives ne doivent pas être testées sur des animaux vivants.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

Dose non absorbée: désigne la quantité de substance éliminée par le nettoyage de la surface de la peau après exposition, et toute quantité présente sur le pansement non occlusif, y compris toute quantité volatilisée au cours de l'exposition.

Dose absorbée (in vivo): désigne les quantités de substance présentes dans l'urine, les résidus ramassés dans la cage après nettoyage, les fèces, l'air expiré (s'il est mesuré), le sang, les tissus (s'ils sont collectés) et la carcasse, après récupération de la peau du site d'application.

Dose absorbable: désigne la quantité de substance présente sur ou dans la peau après nettoyage.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance d'essai, de préférence radiomarquée, est appliquée sur la peau rasée des animaux, à la dose ou aux différentes doses appropriée(s), sous la forme d'une préparation d'usage représentative. La préparation d'essai est maintenue au contact de la peau pendant une période donnée, sous un pansement adapté (non occlusif, semi-occlusif ou occlusif) de façon à prévenir l'ingestion de la préparation. Au terme de la période d'exposition, le pansement est retiré et la peau est nettoyée à l'aide d'un agent lavant approprié. Le pansement et le matériel utilisé pour appliquer l'agent lavant sont conservés pour analyse, et un nouveau pansement est appliqué. Avant, pendant et après la période d'exposition, les animaux sont hébergés dans des cages métaboliques individuelles, et les excrétions et l'air expiré au cours de ces périodes sont collectés pour analyse. Le cas échéant, si l'on dispose d'informations suffisantes confirmant l'absence ou la formation limitée de métabolites radioactifs volatils, la collecte de l'air expiré peut être omise. Normalement, chaque étude porte sur plusieurs groupes d'animaux exposés à la préparation d'essai. Un groupe est euthanasié à la fin de la période d'exposition, et les autres groupes sont euthanasiés par la suite à des intervalles déterminés (2). À la fin de la période d'échantillonnage, les animaux restants sont euthanasiés, le sang est collecté pour analyse, la zone d'application est prélevée pour analyse, et la carcasse est analysée pour rechercher toute matière non excrétée. Les échantillons sont analysés selon les méthodes appropriées et on estime le degré d'absorption percutanée (6) (8) (9).

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Sélection de l'espèce animale**

Le rat est l'espèce la plus communément utilisée, mais des souches et espèces sans poils présentant un taux d'absorption cutanée plus proche de celui de l'homme peuvent aussi être utilisées (3) (6) (7) (8) (9). Des jeunes adultes sains du même sexe (mâles par défaut) d'une souche communément utilisée en laboratoire sont utilisés. Au début de l'étude, les animaux retenus ne doivent pas présenter un écart de poids de ± 20 % par rapport au poids moyen. Par exemple, des rats mâles de 200 à 250 grammes conviennent tout à fait, en particulier ceux présentant un poids dans la moitié supérieure de cette plage.

▼B

1.4.2. **Nombre et sexe des animaux**

Un groupe d'au moins quatre animaux du même sexe doit être utilisé pour chaque préparation d'essai et chaque durée programmée. Chacun des groupes est euthanasié à un intervalle de temps différent, par exemple à la fin de la période d'exposition (généralement de 6 à 24 heures) et à différentes échéances suivantes (48 et 72 heures par exemple). Dans le cas où des données disponibles démontrent une différence importante de sensibilité toxicologique dermique entre les mâles et les femelles, c'est le sexe le plus sensible qu'il convient d'utiliser. En l'absence de telles données, l'un ou l'autre des sexes peut être utilisé.

1.4.3. **Conditions d'hébergement et d'alimentation**

La température du local expérimental doit être de 22 °C (± 3 °C). Si l'humidité relative doit atteindre au moins 30 % sans excéder de préférence 70 %, en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforce de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 %. On applique un éclairage artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux sont nourris avec un mélange classique pour animaux de laboratoire disponible à volonté et boivent de l'eau potable à volonté. Pendant l'étude, et de préférence également pendant la phase d'acclimatation, les animaux sont placés dans des cages métaboliques individuelles. Les déversements d'eau ou de nourriture étant susceptibles de compromettre les résultats de l'étude, les risques de tels incidents doivent être minimisés.

1.4.4. **Préparation des animaux**

Les animaux sont marqués pour permettre une identification individuelle, et placés dans leurs cages cinq jours au moins avant le début de l'essai, pour qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire.

À l'issue de la période d'acclimatation et 24 heures environ avant l'application de la substance d'essai, la région dorsale des épaules de chaque animal est tondue à ras. La perméabilité d'une peau endommagée étant différente de celle d'une peau saine, un soin tout particulier doit être apporté pour ne pas «égratigner» la peau. Après la tonte et 24 heures environ avant l'application de la substance d'essai sur la peau (voir point 1.4.7), la surface de la peau est délicatement nettoyée à l'acétone pour retirer le sébum. Il n'est pas recommandé de procéder à un nettoyage supplémentaire à l'eau et au savon dans la mesure où les résidus de savon sont susceptibles de favoriser l'absorption de la substance d'essai. La surface tondue doit être suffisamment grande pour permettre un calcul fiable de la quantité de substance d'essai absorbée par centimètre carré de peau, soit de préférence au moins 10 centimètres carrés. Des rats de 200 à 250 grammes sont compatibles avec une telle surface. Après préparation, les animaux sont replacés dans leurs cages métaboliques.

1.4.5. **Substance d'essai**

La substance d'essai est le produit dont on étudie les caractéristiques de pénétration. Dans l'idéal, cette substance d'essai doit être radiomarquée.

1.4.6. **Préparation de l'essai**

La préparation de la substance d'essai (c'est-à-dire la préparation pure, diluée ou le mélange contenant la substance d'essai à appliquer sur la peau) doit être identique (ou représenter un substitut réaliste) aux produits auxquels peuvent être exposés l'homme ou les autres espèces cibles. Toute modification par rapport à la préparation «d'usage» doit être justifiée. Le cas échéant, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule adapté. Lorsqu'un véhicule autre que l'eau est utilisé, ses caractéristiques d'absorption et son interaction potentielle avec la substance d'essai doivent être connues.

▼B

1.4.7. **Application sur la peau**

Une zone (site) d'application d'une superficie spécifique est définie sur la surface de la peau. Une quantité connue de la préparation d'essai est ensuite uniformément appliquée sur ce site. Normalement, cette quantité doit correspondre à une exposition humaine potentielle, soit généralement 1 à 5 mg/cm^2 pour une substance solide ou jusqu'à 10 ml/cm^2 pour les liquides. L'application de toute autre quantité doit être justifiée par les conditions d'utilisation attendues, les objectifs fixés pour l'étude, ou les caractéristiques physiques de la préparation d'essai. Après l'application, le site doit être protégé contre les frottements. La figure 1 présente un exemple de dispositif classiquement employé dans ce contexte. Généralement, on protège le site d'application par un pansement non occlusif (par exemple une compresse de gaze nylon perméable). Cela étant, pour des applications infinies, le site d'application doit être recouvert d'un pansement occlusif. Dans les cas où l'évaporation d'une substance d'essai semi-volatile réduit dans une trop grande mesure le taux de récupération de la substance d'essai (voir également le point 1.4.10, premier paragraphe), il convient de piéger la substance évaporée dans un filtre à charbon monté sur le dispositif d'application (voir la figure 1). Il est essentiel que les dispositifs d'application utilisés n'endommagent pas la peau, et qu'ils n'absorbent pas non plus la préparation d'essai ni n'entrent en réaction avec elle. Les animaux sont ensuite replacés dans leurs cages métaboliques individuelles pour la collecte de leurs excrétions.

1.4.8. **Durée de l'exposition et échantillonnage**

La durée de l'exposition correspond à l'intervalle de temps entre l'application de la préparation d'essai et son retrait par nettoyage de la peau. Une période d'exposition pertinente (généralement de 6 à 24 heures) doit être retenue, en fonction de la durée éventuelle de l'exposition humaine. À l'issue de la période d'exposition, les animaux sont maintenus dans leurs cages métaboliques jusqu'au terme prévu. Pendant toute la durée de l'étude, il convient d'observer les animaux à intervalles réguliers, pour détecter tout signe de toxicité ou toute réaction anormale. Après la période d'exposition, les éventuels signes visibles d'irritation doivent être observés sur la peau traitée.

Les cages métaboliques doivent permettre la collecte séparée des fèces et de l'urine pendant toute la durée de l'étude, ainsi que la collecte du dioxyde de carbone marqué au C_{14} et des composés volatils C_{14} qu'il convient d'analyser lorsqu'ils sont produits en quantité (> 5 %). L'urine, les fèces et autres fluides (par exemple, le dioxyde de carbone C_{14} et les composés volatils C_{14}) doivent être collectés individuellement pour chaque groupe et à chaque étape d'échantillonnage. Sur la base d'informations suffisantes confirmant l'absence ou la formation limitée de métabolites radioactifs volatils, on peut le cas échéant utiliser des cages ouvertes.

Les excrétions sont collectées pendant la période d'exposition, soit 24 heures maximum après la première application sur la peau, puis ensuite chaque jour jusqu'à la fin de l'expérience. Si trois intervalles de collecte des excrétions suffisent normalement, des points de collecte supplémentaires ou plus appropriés peuvent être définis pour une étude, selon l'objectif envisagé pour la préparation d'essai ou en fonction de données cinétiques existantes.

À la fin de la période d'exposition, le dispositif de protection est retiré de chaque animal et conservé individuellement aux fins d'analyse. La peau traitée de tous les animaux doit être nettoyée au moins trois fois à l'aide d'un agent et de tampons nettoyants appropriés. Un soin particulier doit être apporté de façon à ne pas contaminer d'autres zones du corps des animaux. L'agent lavant doit être représentatif des pratiques d'hygiène normales (par exemple une solution d'eau savonneuse). Enfin, la peau doit être séchée. Tous les tampons et matériel de nettoyage utilisés doivent être conservés pour analyse. Un nouveau pansement doit être appliqué sur le site traité des animaux formant les derniers groupes, avant leur retour dans les cages métaboliques individuelles.

▼B

1.4.9. **Procédures terminales**

Pour chaque groupe, les animaux doivent être euthanasiés à l'échéance préétablie et leur sang collecté pour analyse. Le pansement ou dispositif de protection doit être retiré pour analyse. La peau du site d'application et une surface de peau équivalente mais provenant d'une zone rasée non traitée doivent être prélevées sur chaque animal, et des analyses distinctes doivent être conduites. Le cas échéant, le site d'application peut être fractionné pour séparer le stratum corneum de l'épiderme sous-jacent, de façon à fournir des informations supplémentaires sur l'évacuation et le comportement de la substance chimique d'essai. En effet, déterminer le comportement/élimination du produit au cours d'un laps de temps donné après la période d'exposition donne une indication sur le devenir de n'importe quelle substance chimique dans le stratum corneum. Pour faciliter le fractionnement de la peau (après le dernier nettoyage et l'euthanasie des animaux), il faut d'abord retirer tous les dispositifs de protection. Ensuite, on prélève la peau du site d'application sur le rat, plus une bande circulaire autour du site, puis on épingle le tout sur une planche. On applique alors, par quelques pressions légères, une bande de ruban adhésif à la surface de la peau. Cette bande est ensuite retirée, avec une partie du stratum corneum. On renouvelle l'opération jusqu'à ce que la bande n'adhère plus à la surface de la peau, lorsque tout le stratum corneum a été retiré. Pour chaque animal, on peut combiner toutes les bandes d'adhésif dans un seul récipient, dans lequel on ajoute un digestif pour solubiliser le stratum corneum. Le cas échéant, on récupère tout éventuel tissu cible pour procéder à des mesures séparées, avant analyse de la carcasse résiduelle et mesure de la dose absorbée par celle-ci. Les carcasses des animaux doivent être conservées pour analyse. En règle générale, l'analyse du contenu total de la carcasse est suffisante, mais certains organes peuvent être retirés pour des analyses séparées (par exemple si cela est indiqué par d'autres études). L'urine présente dans la vessie au moment de l'euthanasie doit être ajoutée à celle collectée auparavant. Après collecte des excrétions dans les cages métaboliques au moment de l'euthanasie, les cages et leurs trappes doivent être nettoyées avec un solvant approprié. Les autres équipements potentiellement contaminés doivent également être analysés.

1.4.10. **Analyse**

Dans toutes les études, un niveau de récupération approprié doit être atteint (à savoir une moyenne de 100 ± 10 % de la radioactivité). Les récupérations en dehors de cette plage doivent faire l'objet de justification. Le volume de la dose administrée dans chaque échantillon doit être analysé selon des procédures suffisamment validées.

L'analyse statistique doit inclure une mesure de la variance des essais répétés de chaque application.

2. **RÉSULTATS**

Les mesures suivantes de la substance d'essai et/ou des métabolites doivent être effectuées sur chaque animal et à chaque point d'échantillonnage. Tous les résultats doivent être présentés individuellement, mais aussi groupés par point d'échantillonnage sous forme de moyenne:

— quantité associée aux dispositifs de protection,

— quantité pouvant être récupérée de la peau,

— quantité présente sur ou dans la peau et impossible à retirer par nettoyage,

▼B

— quantité dans les échantillons de sang,

— quantité dans les excrétions et l'air expiré (le cas échéant),

— quantité restant dans la carcasse et tout organe éventuellement retiré pour analyse.

Les quantités de substance d'essai et/ou de métabolites trouvées dans les excrétions, l'air expiré, le sang et la carcasse permettent de déterminer les quantités totales absorbées à chaque point. À partir de ces données, on peut calculer la quantité de substance d'essai absorbée par centimètre carré de peau exposée à la substance au cours de la période d'exposition.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit préciser les conditions établies dans le protocole, justifier le choix du système d'essai utilisé, et également contenir les informations suivantes:

Substance d'essai:

— données d'identification [par exemple, numéro CAS si disponible; source; pureté (pureté radiochimique); impuretés connues; numéro du lot],

— état physique; propriétés physico-chimiques (par exemple, pH, volatilité, solubilité, stabilité, poids moléculaire et log P_{oe}).

Préparation de l'essai:

— formulation et justification de l'utilisation,

— détails de la préparation d'essai, quantité appliquée, concentration atteinte, véhicule, stabilité et homogénéité.

Animaux d'essai:

— espèce/souche utilisée,

— nombre, âge et sexe des animaux utilisés,

— source des animaux, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,

— poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions d'essai:

— détails concernant l'administration de la préparation d'essai (site d'application, méthodes d'essai, occlusion/non-occlusion, volume, extraction, détection),

— détails concernant la qualité de l'eau et la nourriture.

Résultats:

— tout signe de toxicité,

— tableau indiquant les données d'absorption (sous forme de taux, de quantités ou de pourcentage),

▼B

— récupérations totales de l'expérience,

— interprétation des résultats, avec comparaison avec toutes les autres données éventuellement disponibles concernant l'absorption de la substance d'essai.

Discussion des résultats

Conclusions

4. **BIBLIOGRAPHIE**

1. Méthode d'essai B.45. Absorption cutanée: méthode in vitro.

2. OCDE (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OCDE, Paris.

3. ECETOC (1993). Percutaneous Absorption. Centre européen d'écotoxicologie et de toxicologie des produits chimiques, Monographie No 20.

4. Zendzian, RP (1989). Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll Toxicol.* 8(5), p. 829-835.

5. Kemppainen, BW, Reifenrath, WG (1990). Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6. EPA (1992). Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA (1998). Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

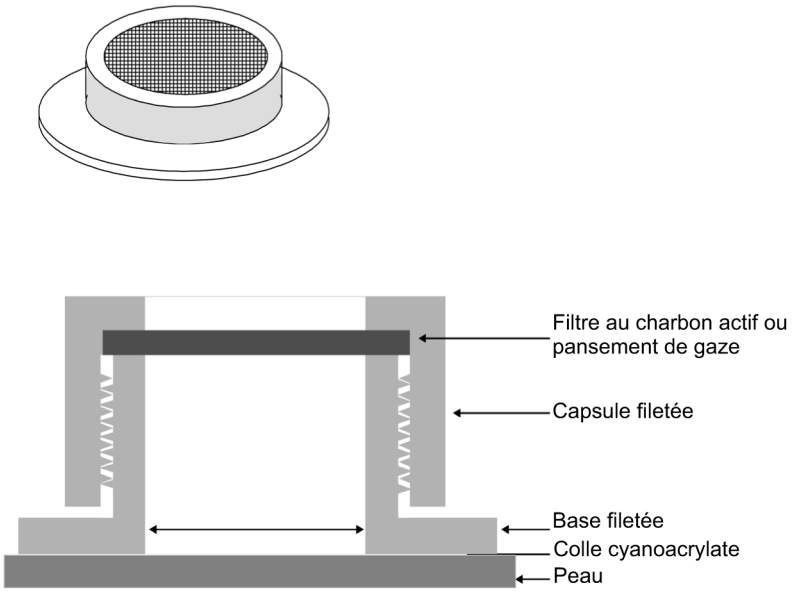
8. Bronaugh, RL, Wester, RC, Bucks, D, Maibach, HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, p. 369-373.

9. Feldman, RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54. p. 399-404.

▼B

Figure 1

Exemple de dispositif classiquement utilisé pour délimiter et protéger un site d'application cutanée au cours d'études d'absorption percutanée in vivo



▼B

B.45. **ABSORPTION CUTANÉE: MÉTHODE IN VITRO**

1. **MÉTHODE**

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 428 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Cette méthode a été élaborée pour fournir des informations sur l'absorption d'une substance d'essai appliquée sur un échantillon de peau excisée. Elle peut être combinée à la méthode d'absorption cutanée: méthode in vivo (1), ou être menée séparément. Il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE pour la conduite des études d'absorption cutanée (2) pour élaborer des études reposant sur cette méthode. Ce document d'orientation a été préparé pour faciliter la sélection des procédures in vitro appropriées, utilisables selon les circonstances spécifiques, et dans le but de garantir la fiabilité des résultats obtenus avec cette méthode.

Les méthodes de mesure de l'absorption cutanée se divisent en deux grandes catégories: in vivo et in vitro. Les méthodes *in vivo* d'étude de l'absorption cutanée sont bien connues et fournissent des informations pharmacocinétiques sur un large éventail d'espèces animales. Une méthode *in vivo* est décrite dans une autre méthode d'essai (1). Les méthodes in vitro sont utilisées depuis de nombreuses années pour mesurer l'absorption cutanée. Même s'il n'y a pas eu d'étude de validation formelle des méthodes *in vitro* présentées dans cette méthode d'essai, les experts de l'OCDE ont estimé en 1999 que le volume des données évaluées suffisait pour étayer la méthode in vitro (3). Le document d'orientation de l'OCDE (2) présente des détails supplémentaires appuyant cette décision, dont un certain nombre de comparaisons directes des méthodes in vitro et in vivo. De même, de nombreuses monographies examinent cette question et offrent un contexte de référence détaillé sur l'utilisation de la méthode in vitro (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Les méthodes in vitro mesurent la diffusion d'une substance dans et à travers la peau jusqu'à un réservoir de fluide; elles utilisent des échantillons de peau non viable pour mesurer la diffusion seule, ou des échantillons de peau fraîche et métaboliquement active pour mesurer simultanément la diffusion et le métabolisme cutané. Ces méthodes conviennent particulièrement pour comparer l'absorption cutanée et percutanée de différentes formulations d'une substance chimique, mais elles proposent aussi des modèles utiles pour l'évaluation de l'absorption percutanée chez l'homme.

La méthode in vitro ne convient pas nécessairement pour toutes les situations et classes de substances, mais on peut l'utiliser pour une première évaluation qualitative de la pénétration cutanée. Dans certains cas, il peut s'avérer nécessaire de compléter l'étude par des données in vivo. Pour des informations complémentaires sur les situations où la méthode in vitro conviendrait, il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE (2). La référence (3) fournit d'autres précisions qui peuvent faciliter la prise de décision.

La présente méthode présente des principes généraux pour mesurer l'absorption cutanée et la diffusion d'une substance d'essai à partir d'un échantillon de peau excisée. Dans ce contexte, la peau de nombreuses espèces de mammifères, y compris l'homme, peut être utilisée. Les propriétés de perméabilité de la peau sont conservées après le prélèvement de l'échantillon de peau, dans la mesure où c'est le stratum corneum non viable qui constitue le principal obstacle à la diffusion; aucune forme de transport actif des substances chimiques à travers la peau n'a jamais été identifiée. En revanche, il a été établi que la peau pouvait métaboliser certaines substances au cours de l'absorption percutanée (6), mais ce processus ne limite pas la dose réellement absorbée, même si elle est susceptible d'affecter la nature du produit qui passe ensuite dans le sang.

▼B

1.2. DÉFINITIONS

Dose non absorbée: désigne la quantité retirée par nettoyage de la surface de la peau après exposition et toute quantité présente sur le timbre non occlusif, y compris toute quantité volatilisée au cours de l'exposition.

Dose absorbée (in vitro): masse de substance d'essai atteignant le fluide receveur (ou la circulation systémique) dans une période de temps donnée.

Dose absorbable (in vitro): désigne la quantité présente sur ou dans la peau après nettoyage.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La substance d'essai, le cas échéant radiomarquée, est appliquée à la surface d'un échantillon de peau séparant les deux chambres d'une cellule à diffusion. La substance chimique reste sur la peau pendant un temps donné et dans des conditions spécifiques, avant d'être retirée selon une procédure de nettoyage appropriée. Au cours de l'étude, on échantillonne le fluide receveur à des moments donnés, puis on l'analyse pour y rechercher la substance d'essai et/ou des métabolites.

Lorsque des systèmes métaboliquement actifs sont utilisés, les éventuels métabolites de la substance d'essai peuvent être analysés selon les méthodes appropriées. À la fin de l'expérience, la distribution de la substance d'essai est déterminée et ses métabolites sont quantifiés, le cas échéant.

Dans les conditions appropriées, décrites dans cette méthode et dans le document d'orientation (2), on mesure l'absorption d'une substance d'essai au cours d'une période de temps donnée en analysant le fluide receveur et la peau traitée. La substance d'essai restant sur la peau doit être considérée comme étant absorbée, à moins qu'il soit démontré que l'on puisse déterminer l'absorption sur la seule base des valeurs relatives au fluide receveur. L'analyse des autres éléments (matières récupérées par nettoyage de la peau et matières restant à l'intérieur des couches dermiques) permet d'enrichir l'évaluation des données, en précisant notamment l'évacuation totale de la substance d'essai et le pourcentage de récupération.

Pour démontrer les performances et la fiabilité du système d'essai dans le laboratoire chargé de l'étude, les résultats relatifs aux substances chimiques de référence pertinentes doivent être tenus disponibles et être conformes à la littérature publiée pour la méthode utilisée. Pour répondre à cette exigence, on peut procéder à un essai simultané de la substance d'essai et d'une substance de référence appropriée (présentant de préférence une lipophilicité proche de celle de la substance d'essai), ou proposer un historique approprié relatif à un certain nombre de substances de référence présentant une lipophilicité différente (par exemple, la caféine, l'acide benzoïque et la testostérone).

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.4.1. **Cellule à diffusion**

Une cellule à diffusion se compose d'un compartiment donneur et d'un compartiment receveur entre lesquels on place la peau (la figure 1 présente une cellule à diffusion de conception classique). La cellule doit répondre à plusieurs objectifs: assurer une bonne étanchéité sur le pourtour de la peau, permettre un échantillonnage aisé et un bon mélange de la solution dans le compartiment receveur en contact avec le dessous de la peau, et garantir le maintien de la température voulue au niveau de la cellule et de son contenu. Des cellules à diffusion statique ou dynamique peuvent indifféremment être utilisées. Normalement, les compartiments donneurs sont laissés sans occlusion pendant l'exposition à une dose finie d'une préparation d'essai. Toutefois, pour les applications infinies et pour certains scénarios avec des doses finies, l'occlusion du compartiment donneur peut être envisagée.

▼B

1.4.2. **Fluide receveur**

L'emploi d'un fluide receveur compatible avec des éléments physiologiques doit être privilégié, mais d'autres fluides peuvent être utilisés à condition que ce choix soit justifié. La composition précise du fluide receveur doit être fournie. La bonne solubilité de la substance d'essai dans le fluide receveur doit être démontrée, de façon à garantir qu'il ne fait pas obstacle à l'absorption. En outre, le fluide receveur ne doit pas affecter l'intégrité de la préparation cutanée. Dans un système dynamique, la vitesse de l'écoulement ne doit pas gêner la diffusion de la substance d'essai dans le fluide receveur. Dans une cellule statique, le fluide doit être remué en permanence et échantillonné régulièrement. Si le métabolisme entre également dans le cadre de l'étude, le fluide receveur doit garantir la viabilité de la peau pendant toute la durée de l'expérience.

1.4.3. **Préparations de peau**

On peut utiliser indifféremment de la peau d'origine humaine ou animale. Il est entendu que l'utilisation de la peau humaine est soumise à des conditions et considérations d'éthique admises d'ordre national et international. L'utilisation d'une peau viable est préférable, mais une peau non viable peut aussi être utilisée dès lors que son intégrité est démontrée. Des membranes d'épiderme (séparées par procédé enzymatique, chimique ou à la chaleur) ou certaines strates de peau (d'une épaisseur généralement comprise entre 200 et 400 μm) préparées avec un dermatome peuvent être utilisées. Des épaisseurs de peau complètes peuvent être utilisées, mais il convient d'éviter les épaisseurs excessives (environ > 1 mm), sauf si elles sont spécifiquement requises pour examiner la substance d'essai dans les couches de la peau. Les différents choix effectués (espèce retenue, site anatomique et technique de préparation) doivent être justifiés. Des données acceptables pour un minimum de quatre essais répétés par préparation d'essai doivent être fournies.

1.4.4. **Intégrité de la préparation cutanée**

Il est essentiel que la peau soit correctement préparée. Toute manipulation inappropriée peut endommager le stratum corneum; il convient donc de contrôler l'intégrité de la peau préparée. Si le champ de l'étude englobe le métabolisme de la peau, une peau fraîchement excisée doit être utilisée dans les plus courts délais, et dans des conditions propres à soutenir l'activité métabolique. De manière générale, la peau fraîchement excisée doit être utilisée dans les 24 heures, mais la période de stockage acceptable peut varier selon le système enzymatique impliqué dans la métabolisation et les températures de stockage (13). Lorsque les préparations de peau ont été stockées avant utilisation, des éléments établissant qu'elles ont conservé toutes leurs fonctions doivent être présentés.

1.4.5. **Substance d'essai**

La substance d'essai est le produit dont on étudie les caractéristiques de pénétration. Dans l'idéal, cette substance d'essai doit être radiomarquée.

1.4.6. **Préparation d'essai**

La préparation de la substance d'essai (c'est-à-dire la préparation pure, diluée ou le mélange contenant la substance d'essai à appliquer sur la peau) doit être identique (ou représenter un substitut réaliste) aux produits auxquels peuvent être exposés l'homme ou les autres espèces cibles. Toute modification par rapport à la préparation «d'usage» doit être justifiée.

▼B

1.4.7. **Concentrations et formulations des substances d'essai**

Normalement, plusieurs concentrations de la substance d'essai sont utilisées, de façon à couvrir le haut de la gamme des expositions humaines potentielles. De la même manière, on peut envisager d'étendre l'étude à un éventail de formulations classiques.

1.4.8. **Application sur la peau**

Dans les conditions normales de l'exposition humaine aux produits chimiques, des doses limites sont généralement rencontrées. Par conséquent, il convient d'utiliser des doses correspondant à l'exposition humaine potentielle, soit généralement 1 à 5 mg/cm^2 pour une substance solide et jusqu'à 10 $\mu l/cm^2$ pour les liquides. La quantité retenue doit être justifiée par les conditions d'utilisation attendues, les objectifs fixés pour l'étude, ou les caractéristiques physiques de la préparation d'essai. Par exemple, des applications infinies sur la surface de la peau peuvent être envisagées s'il s'agit d'étudier une exposition à des volumes importants par unité de surface.

1.4.9. **Température**

La température a une incidence sur la diffusion passive des produits chimiques (et ainsi sur leur absorption cutanée). Par conséquent, la cellule à diffusion et la peau doivent être maintenues à une température constante proche de la température normale de la peau, soit 32 +/- 1 °C. Selon la conception de la cellule, la température du bain ou du bloc de chauffage pourra varier, l'objectif étant de maintenir la peau et le compartiment receveur à leur norme physiologique. De préférence, l'humidité doit être maintenue entre 30 et 70 %.

1.4.10. **Durée de l'exposition et échantillonnage**

L'exposition de la peau à la préparation d'essai peut durer tout le temps de l'expérience, ou moins longtemps (par exemple pour imiter un type spécifique d'exposition humaine). La peau doit être lavée, à l'aide d'un agent lavant approprié, pour éliminer les excédents de la préparation d'essai, et les produits de rinçage utilisés doivent être collectés pour analyse. La procédure de retrait de la préparation, qui dépend des conditions d'utilisation envisagées, doit être justifiée. Normalement, une période d'échantillonnage de 24 heures est nécessaire pour permettre une caractérisation adéquate du profil d'absorption. Sachant que l'intégrité de la peau peut commencer à se détériorer au-delà de 24 heures, la durée d'échantillonnage ne doit normalement pas excéder 24 heures. Cette durée n'est pas nécessaire pour les substances d'essai qui pénètrent rapidement la peau, mais pour celles qui pénètrent lentement, des temps plus importants peuvent se révéler nécessaires. La fréquence d'échantillonnage du fluide receveur doit permettre d'établir une représentation graphique du profil d'absorption de la substance d'essai.

1.4.11. **Procédures terminales**

Tous les éléments du système d'essai (compartiment donneur, produits de rinçage de la surface de la peau, préparation cutanée et compartiment/fluide receveur) doivent être analysés et le niveau de récupération déterminé. Dans certains cas, il peut être nécessaire de fractionner la peau en zone de peau exposée et zone de peau sous le rebord de la cellule, et en couches correspondant au stratum corneum, à l'épiderme et aux différentes strates du derme, pour procéder à des analyses séparées.

1.4.12. **Analyse**

Dans toutes les études, un niveau de récupération approprié doit être atteint (à savoir une moyenne de 100 +/- 10 % de la radioactivité, tous les écarts devant être justifiés). La quantité de substance d'essai dans le fluide receveur, la préparation cutanée, les produits de rinçage de la surface de la peau et des appareils doivent être analysés selon des procédures appropriées.

▼B

2. **RÉSULTATS**

L'analyse du fluide receveur, la distribution de la substance d'essai dans le système d'essai et le profil d'absorption dans le temps doivent être présentés. Dans des conditions d'exposition à une dose finie, la quantité de substance éliminée lors du nettoyage de la peau, la quantité présente dans la peau (et dans les différentes couches dermiques si celles-ci ont fait l'objet d'une analyse) et la quantité présente dans le fluide receveur (taux et quantité ou pourcentage de la dose appliquée) doivent être calculées. Parfois, l'absorption cutanée peut être exprimée à partir des seules données relatives au fluide receveur. Toutefois, lorsque de la substance d'essai reste dans la peau à la fin de l'étude, il peut être nécessaire de l'inclure dans la quantité totale absorbée [voir paragraphe 66 de la référence (3)]. Dans des conditions d'exposition à une dose infinie, les données peuvent permettre de calculer une constante de perméabilité (Kp). Dans ce dernier cas, le pourcentage absorbé n'est pas pertinent.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit préciser les conditions établies dans le protocole, justifier le choix du système d'essai utilisé, et également contenir les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique; propriétés physico-chimiques (au minimum, poids moléculaire et log P_{oe}), pureté (pureté radiochimique),

— informations d'identification (par exemple numéro de lot),

— solubilité dans le fluide receveur.

Préparation de la substance d'essai:

— formulation et justification de l'utilisation,

— homogénéité.

Conditions d'essai:

— sources et site de la peau, méthode de préparation, conditions de stockage avant utilisation, prétraitement éventuel (nettoyage, traitement antibiotique, etc.), mesures de l'intégrité de la peau, état métabolique, justification de l'utilisation,

— conception de la cellule à diffusion, composition du fluide receveur, vitesse d'écoulement du fluide receveur ou temps et procédures d'échantillonnage,

— détails de l'application de la préparation d'essai et quantification de la dose appliquée,

— durée de l'exposition,

— détails sur l'élimination de la préparation d'essai présente sur la peau (par exemple rinçage de la peau),

— détails sur l'analyse de la peau et les techniques de fractionnement employées pour mettre en évidence la distribution dans la peau,

▼B

— procédures de nettoyage de la cellule et du matériel,

— méthodes d'essai, techniques d'extraction, seuils de détection et validation de la méthode analytique.

Résultats:

— récupération totale de l'expérience (dose appliquée = produits de rinçage de la peau + peau + fluide receveur + produits de rinçage de la cellule),

— tableau indiquant la récupération de chaque cellule dans chaque compartiment,

— profil d'absorption,

— tableau indiquant les données relatives à l'absorption (sous forme de taux, de quantités ou de pourcentages).

Discussion des résultats

Conclusions

4. **BIBLIOGRAPHIE**

1. Méthode d'essai B.44. Absorption cutanée: méthode in vivo.

2. OCDE (2002). Document d'orientation de l'OCDE pour la conduite des études d'absorption cutanée, OCDE, Paris.

3. OCDE (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OCDE, Paris.

4. Kemppainen, BW and Reifenrath, WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh, RL and Collier, SW. (1991). Protocol for In vitro Percutaneous Absorption Studies, in In vitro *Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications,* RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, p. 237-241.

6. Bronaugh, RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.

7. Centre européen d'écotoxicologie et de toxicologie des produits chimiques (1993). Monograph No 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8. Diembeck, W, Beck, H, Benech-Kieffer, F, Courtellemont, P, Dupuis, J, Lovell, W, Paye, M, Spengler, J, Steiling, W (1999). Test Guidelines for In Vitro Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, p. 191-205.

9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No 65.

10. Howes, D, Guy, R, Hadgraft, J, Heylings, JR *et* al. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

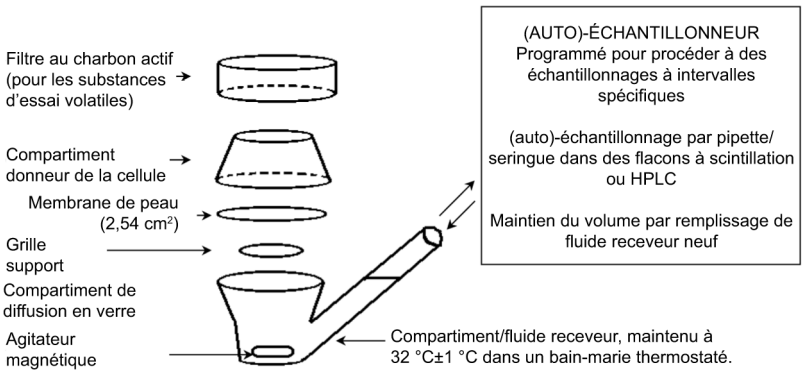
11. Schaefer, H and Redelmeier, TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12. Roberts, MS and Walters, KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C, Heylings, JR., Clowes, HM. and Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74, p. 356-365.

Figure 1

Exemple de cellule à diffusion statique classiquement utilisée pour la conduite d'études d'absorption percutanée in vitro



▼M3

B.46. IRRITATION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ

INTRODUCTION

1. L'irritation cutanée désigne l'apparition sur la peau de lésions réversibles à la suite de l'application d'une substance d'essai pendant une période allant jusqu'à quatre heures [selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations unies (ONU) et le règlement (CE) nº 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (1)(3)]. La présente méthode d'essai propose une procédure in vitro pouvant servir à identifier les dangers liés aux produits chimiques (substances et mélanges) irritants correspondant à la définition du SGH de l'ONU et à la catégorie 2 du règlement CLP de l'Union européenne (1) (2) (3). Dans l'Union européenne et les autres régions n'ayant pas adopté la catégorie 3 facultative (substances faiblement irritantes) selon le SGH de l'ONU, la présente méthode d'essai peut aussi servir à identifier des produits chimiques non classés, c'est-à-dire ne relevant d'aucune catégorie dans le SGH de l'ONU ou le règlement CLP de l'Union européenne (1) (3). Cette méthode d'essai peut être utilisée pour déterminer le pouvoir irritant pour la peau d'un produit chimique, en tant que méthode de substitution à part entière remplaçant l'essai d'irritation cutanée in vivo, dans le cadre d'une stratégie d'essai à plusieurs niveaux (4 et chapitre B.4 de la présente annexe).

2. Jusqu'à présent, l'évaluation de l'irritation cutanée impliquait généralement le recours à des animaux de laboratoire [LD 404 de l'OCDE, chapitre B.4 de la présente annexe] (4). Par souci du bien-être animal, le chapitre B.4 a été révisé en 2004 afin que la corrosion/irritation cutanée puisse être déterminée via une stratégie d'essai à plusieurs niveaux, faisant appel à des méthodes d'essai in vitro ou ex vivo validées, de manière à éviter d'infliger des souffrances aux animaux. Trois méthodes d'essai in vitro validées ont été adoptées: elles constituent respectivement les lignes directrices 430, 431 et 435 de l'OCDE (5) (6) (7) et deux d'entre elles les chapitres B.40 et B.40 *bis* de la présente annexe, qui sont destinées au volet «corrosivité» de la stratégie d'essai à plusieurs niveaux proposée dans le chapitre B.4 de la présente annexe ou la LD 404 de l'OCDE (4).

3. La présente méthode d'essai porte sur le danger d'irritation cutanée pour la santé humaine. Elle fait appel à un épiderme humain reconstitué qui, par sa conception globale (utilisation de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain en tant que source cellulaire, ainsi que de tissus et architectures cellulaires représentatifs), reproduit fidèlement les propriétés biochimiques et physiologiques des couches supérieures de la peau humaine, c'est-à-dire l'épiderme. La présente méthode d'essai comprend également un ensemble de normes de performance (appendice 2) pour l'évaluation de méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué similaires ou modifiées, développées par le ECVAM-EC (8), conformément aux principes du document d'orientation nº 34 de l'OCDE (9).

4. Il existe trois méthodes validées conformes à la présente méthode d'essai. Des études de prévalidation, d'optimisation et de validation ont été réalisées pour une méthode in vitro (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) utilisant un modèle d'épiderme humain reconstitué, disponible dans le commerce sous le nom d'EpiSkin™ (et désignée comme la méthode de référence validée, ou MRV). Deux autres méthodes d'irritation cutanée in vitro sur épiderme humain reconstitué, également disponibles dans le commerce, ont donné des résultats analogues à ceux de la MRV selon une validation fondée sur les normes de performance (21): il s'agit des méthodes EpiDerm™ SIT (EPI-200) et SkinEthic™ RHE (22).

▼M3

5. Avant de pouvoir utiliser à des fins réglementaires une méthode in vitro sur épiderme humain reconstitué similaire ou modifiée, autre que la MRV, EpiDerm™ SIT (EPI-200) ou SkinEthic™, il convient d'en déterminer la fiabilité, la pertinence (précision) et les limitations pour l'usage préconisé, de manière à s'assurer que ses caractéristiques sont comparables à celles de la MRV, conformément aux normes de performance figurant dans la présente méthode d'essai (appendice 2). En outre, il est recommandé de consulter le document explicatif accompagnant le projet de ligne directrice de l'OCDE sur l'essai d'irritation cutanée in vitro avant de développer et de valider une méthode in vitro sur épiderme humain reconstitué similaire ou modifiée et de la soumettre en vue d'une adoption réglementaire (23).

DÉFINITIONS

6. Les définitions utilisées figurent à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

7. L'une des limites de la présente méthode d'essai, comme l'a démontré l'étude de validation (16), est qu'elle ne permet pas la classification des produits chimiques dans la catégorie facultative 3 du SGH de l'ONU (1). Lorsqu'elle est utilisée en tant que méthode d'essai partiellement substitutive, un essai ultérieur in vivo peut être nécessaire pour compléter la caractérisation du potentiel d'irritation cutanée (4 et chapitre B.4 de la présente annexe). Il est entendu que l'utilisation de peau humaine est soumise à des conditions et considérations d'éthique nationales et internationales.

8. La présente méthode d'essai se rapporte au volet «irritation cutanée in vitro» de la stratégie d'essai à plusieurs niveaux proposée dans le chapitre B.4 (LD 404 de l'OCDE) pour les essais d'irritation/corrosion cutanée (4). Si elle ne fournit pas d'informations appropriées sur la corrosion cutanée, on notera cependant que le chapitre B.40 *bis* (LD 431 de l'OCDE) relatif à la corrosion cutanée, bien que faisant appel à un protocole différent, est basée sur le même système d'essai sur épiderme humain reconstitué (chapitre B.40 *bis*). La présente méthode a recours à des modèles d'épiderme humain reconstitué utilisant des kératinocytes humains, et reproduisant donc in vitro l'organe cible de l'espèce étudiée. De plus, elle couvre directement l'étape initiale de la cascade inflammatoire/du mécanisme d'action (lésions cellulaires et tissulaires causant un traumatisme localisé) survenant au cours de l'irritation in vivo. Les essais réalisés dans le cadre de l'étude de validation sous-tendant cette méthode d'essai ont porté sur un large éventail de produits chimiques; la base de données empiriques de cette étude totalisait 58 produits chimiques (16) (18) (23). La présente méthode d'essai peut être utilisée pour tester des solides, des liquides, des semi-solides et des cires. Les liquides peuvent être aqueux ou non; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Si possible, les solides sont moulus finement avant application; aucun autre prétraitement de l'échantillon n'est nécessaire. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'une étude de validation (24). Bien qu'il soit envisageable de pouvoir tester des gaz et des aérosols en faisant appel à de l'épiderme humain reconstitué, l'actuelle méthode d'essai ne permet pas de tester les produits de ce type. Il convient aussi de noter que les produits chimiques fortement colorés peuvent interférer avec les mesures de la viabilité cellulaire et nécessitent l'utilisation de témoins adaptés pour corriger ces interférences (voir les paragraphes 24-26).

9. Une seule expérience réalisée à l'aide de trois réplicats de tissus identiques devrait suffire pour tester les substances dont la classification est sans équivoque. En revanche, dans le cas de résultats ambigus, tels que des mesures non concordantes pour les différents réplicats et/ou une viabilité moyenne égale à 50 ± 5 %, une seconde expérience est envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières.

▼M3

PRINCIPE DE L'ESSAI

10. La substance d'essai est appliquée localement sur un modèle tridimensionnel d'épiderme humain reconstitué, composé de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain et mis en culture pour former un modèle multicouche hautement différencié d'épiderme humain. Ce modèle se compose de couches organisées (basale, épineuse et granuleuse), ainsi que d'un *stratum corneum* multicouche contenant des couches lipidiques lamellaires intercellulaires représentant les principales classes de lipides, similaires à celles que l'on observe in vivo.

11. L'irritation cutanée consécutive à l'application d'un produit chimique, qui se manifeste par des érythèmes ou des œdèmes, résulte d'une cascade d'évènements débutant par la pénétration du *stratum corneum* et la lésion des couches sous-jacentes de kératinocytes. En mourant, les kératinocytes rejettent des médiateurs à l'origine de la cascade inflammatoire qui agit sur les cellules du derme, en particulier les cellules stromales et endothéliales. C'est la dilatation et la perméabilité accrue des cellules endothéliales qui sont responsables des érythèmes et des oedèmes observés (24). Les méthodes fondées sur l'utilisation d'épiderme humain reconstitué permettent de mesurer les événements déclencheurs de la cascade.

12. La viabilité cellulaire des modèles d'épiderme humain reconstitué est mesurée via la conversion enzymatique du colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, numéro CAS 298-93-1] en un sel de formazan bleu mesuré quantitativement après son extraction des tissus (25). Les produits chimiques irritants sont mis en évidence par leur capacité à faire chuter la viabilité cellulaire sous un seuil prédéterminé (≤ 50 %, pour la catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne). En fonction du cadre législatif dans lequel les résultats de la présente méthode d'essai sont utilisés, les produits chimiques produisant une viabilité cellulaire supérieure au seuil défini peuvent être considérés comme non irritants (> 50 %, sans catégorie).

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

13. Avant d'appliquer en routine l'une des trois méthodes validées conformes à la présente méthode d'essai, les laboratoires font la preuve de leur compétence technique en utilisant les 10 produits chimiques de référence énumérés au tableau 1. Avant de pouvoir utiliser à des fins réglementaires une méthode similaire développée conformément à cette méthode d'essai, ou une variante d'une des trois méthodes validées, il convient de répondre aux normes de performance décrites à l'appendice 2 de la présente méthode d'essai.

14. Dans le cadre de la démonstration des compétences, il est recommandé à l'utilisateur de contrôler les propriétés de barrière des tissus dès réception, comme précisé par le producteur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Cette étape est particulièrement importante lorsque les tissus sont transportés sur de longues distances/durées. Lorsqu'une méthode a été établie avec succès, et que le laboratoire a démontré sa maîtrise de cette méthode, il ne sera plus nécessaire de procéder systématiquement à cette vérification. Toutefois, pour les méthodes utilisées en routine, il est recommandé de continuer à évaluer les propriétés de barrière des tissus à intervalles réguliers.

Tableau 1

Produits chimiques de référence ([1])

Produit chimique	Numéro CAS	Score in vivo ([2])	État physique	Catégorie du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne
acide naphtylacétique	86-87-3	0	solide	sans catégorie
isopropanol	67-63-0	0,3	liquide	sans catégorie

▼M3

Produit chimique	Numéro CAS	Score in vivo (2)	État physique	Catégorie du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne
stéarate de méthyle	112-61-8	1	solide	sans catégorie
butyrate d'heptyle	5870-93-9	1,7	liquide	sans catégorie *(cat. 3 facultative)* (3), (4)
salicylate d'hexyle	6259-76-3	2	liquide	sans catégorie (*cat. 3 facultative*) (3), (4)
3-p-cuménil-2-méthylpropionaldéhyde	103-95-7	2,3	liquide	catégorie 2
1-bromohexane	111-25-1	2,7	liquide	catégorie 2
hydroxyde de potassium (solution aqueuse à 5 %)	1310-58-3	3	liquide	catégorie 2
1-méthyl-3-phényl-1-pipérazine	5271-27-2	3,3	solide	catégorie 2
heptanal	111-71-7	3,4	liquide	catégorie 2

(1) Ces produits chimiques de référence constituent un sous-ensemble des produits chimiques de référence utilisés dans l'étude de validation.
(2) Score in vivo d'après B.4 et la ligne directrice 404 de l'OCDE (4).
(3) Dans cette méthode d'essai, les substances classées dans la catégorie facultative 3 du SGH de l'ONU (matières faiblement irritantes) (1) sont considérées comme «sans catégorie».
(4) La catégorie 3 (facultative) du SGH de l'ONU n'est pas applicable dans le cadre du règlement CLP de l'Union européenne.

PROTOCOLE

15. Les éléments et le protocole d'une méthode d'irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué sont décrits ci-après. Un modèle d'épiderme humain est reconstitué; le laboratoire peut le préparer lui-même ou l'obtenir dans le commerce. Il existe des modes opératoires normalisés pour les méthodes EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) et SkinEthic™ RHE (26) (27) (28). Les essais se dérouler dans les conditions suivantes:

Éléments de la méthode d'essai sur épiderme humain reconstitué

Conditions générales

16. L'épithélium est reconstruit à partir de kératinocytes humains non transformés. Plusieurs couches de cellules épithéliales viables (couche basale, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) doivent être présentes sous un *stratum corneum* fonctionnel. Le *stratum corneum* doit comporter plusieurs couches présentant le profil lipidique nécessaire pour constituer une barrière fonctionnelle suffisamment robuste pour résister à la pénétration rapide des substances marqueurs cytotoxiques telles que le dodécylsulfate de sodium (SDS) ou le Triton X-100. La fonction de barrière est démontrée et peut être évaluée soit en déterminant la concentration à laquelle une substance marqueur réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI_{50}) après un temps d'exposition donné, soit en définissant le temps d'exposition requis pour réduire la viabilité des cellules de 50 % (TE_{50}) après application de la substance marqueur à une concentration fixe déterminée. Le modèle d'épiderme humain reconstitué présente des propriétés de confinement suffisantes pour éviter que de la matière puisse contourner le *stratum corneum* pour atteindre les tissus viables, ce qui nuirait à la qualité de la modélisation de l'exposition cutanée. Enfin, le modèle est exempt de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmique ou mycosique.

▼M3

Conditions fonctionnelles

Viabilité

17. La viabilité est mesurée au moyen du colorant MTT (25). Les utilisateurs du modèle d'épiderme humain reconstitué font en sorte que chaque lot utilisé réponde aux critères définis pour le témoin négatif (TN). La densité optique (DO) du solvant d'extraction seul est suffisamment faible, c'est-à-dire < 0,1. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour le témoin négatif (dans les conditions de la méthode d'essai d'irritation cutanée) est établie par le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Les plages d'acceptabilité pour les trois méthodes validées sont indiquées dans le tableau 2. Il est démontré que les tissus traités par le témoin négatif sont stables en culture (c'est-à-dire qu'ils présentent des mesures de viabilité comparables) tout au long de la période d'exposition.

Tableau 2

Plages d'acceptabilité pour la DO du témoin négatif

	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Fonction de barrière

18. Le *stratum corneum* et sa composition lipidique doivent être suffisants pour résister à la pénétration rapide de substances marqueurs cytotoxiques telles que le SDS ou le Triton X-100. Cette capacité est évaluée par la CI_{50} et le TE_{50} (tableau 3).

Morphologie

19. L'examen histologique du modèle d'épiderme humain reconstitué doit mettre en évidence une structure semblable à celle de l'épiderme humain (comprenant notamment un *stratum corneum* multicouche).

Reproductibilité

20. La reproductibilité dans le temps des résultats obtenus à l'aide des témoins positifs et négatifs est démontrée.

Contrôle de qualité

21. Il incombe au développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué de garantir et de démontrer que chaque lot utilisé répond à des critères de fabrication définis, dont les plus pertinents sont ceux relatifs à la viabilité (paragraphe 17), à la fonction de barrière (paragraphe 18) et à la morphologie (paragraphe 19). Ces informations sont communiquées aux utilisateurs, afin qu'ils puissent les inclure dans le rapport d'essai. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour les valeurs CI_{50} ou TE_{50} est établie par le développeur/fournisseur d'épiderme humain (ou l'investigateur en cas d'utilisation d'un modèle «maison»). Seuls les résultats obtenus à l'aide de tissus répondant à ces critères pourront être retenus pour prédire de façon fiable les effets irritants des substances testées. À titre d'exemple, les plages d'acceptabilité pour les trois méthodes validées sont indiquées dans le tableau 3.

▼M3

Tableau 3

Exemples de critères de contrôle de qualité des lots

	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
EpiSkin™ (SM) (18 heures de traitement par SDS) (26)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (27)	ET_{50} = 4,8 h	ET_{50} = 8,7 hr
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (28)	ET_{50} = 4,0 hr	ET_{50} = 9,0 h

Application des substances et mélanges chimiques d'essai et des substances et mélanges chimiques témoins

22. Il convient d'utiliser au minimum trois réplicats par essai pour chaque substance d'essai et pour les témoins. Pour les substances liquides comme pour les substances solides, il convient d'appliquer une quantité suffisante de substance et mélange chimiques d'essai pour recouvrir uniformément la surface de la peau, sans pour autant utiliser une dose infinie, c'est-à-dire au minimum 25 µL/cm2 ou 25 mg/cm2. Dans le cas de substances ou mélanges solides, il convient d'humidifier la surface de l'épiderme avec de l'eau déionisée ou distillée avant application, afin d'assurer un bon contact entre la substance et mélange chimique d'essai et la surface de l'épiderme. Chaque fois que possible, il convient de tester les solides sous la forme d'une poudre fine. À la fin de la période d'exposition, la surface de l'épiderme est nettoyée avec soin à l'aide d'un tampon aqueux ou de NaCl à 0.9 %, afin d'éliminer la substance d'essai. En fonction de la méthode validée utilisée, la période d'exposition peut varier entre 15 et 60 minutes et la température d'incubation entre 20 et 37 °C. Les durées et températures d'exposition sont optimisées pour chacune des méthodes sur épiderme humain reconstitué, et tiennent compte des propriétés intrinsèques de chaque méthode. Pour de plus amples informations, voir les modes opératoires normalisés des trois méthodes (26) (27) (28).

23. Des témoins négatifs (TN) et positifs (TP) sont utilisés simultanément pour chaque étude afin de démontrer que la viabilité (dans le cas du TN), la fonction de barrière et la sensibilité tissulaire qui en résulte (dans le cas du TP) se situent dans une fourchette historique définie de valeurs acceptables. La substance recommandée en tant que TP est une solution aqueuse de SDS à 5 %. Pour les TN, il est recommandé d'utiliser de l'eau ou une solution saline tamponnée au phosphate [phosphate buffered saline (PBS)].

Mesures de la viabilité cellulaire

24. L'aspect le plus important du protocole est que les mesures de la viabilité ne sont pas réalisées immédiatement après l'exposition aux substances d'essai, mais après une période d'incubation posttraitement suffisamment longue des tissus rincés dans un milieu frais. Cette période permet aussi bien la disparition des effets faiblement cytotoxiques que l'apparition d'effets cytotoxiques manifestes. Durant la phase d'optimisation de l'essai (11) (12) (13) (14) (15), une période d'incubation posttraitement de 42 heures s'est révélée optimale.

25. Le test du MTT est une méthode quantitative validée, recommandée pour mesurer la viabilité cellulaire dans le cadre de cette méthode d'essai. Elle est compatible avec une utilisation sur un modèle tissulaire tridimensionnel. L'échantillon de tissu est placé dans une solution MTT à la concentration appropriée (par exemple 0,3-1 mg/mL) pendant 3 heures. Le précipité bleu de formazan est ensuite extrait à l'aide d'un solvant (ex.: isopropanol, isopropanol acide), et l'on mesure la concentration du formazan en déterminant sa DO à 570 nm à l'aide d'un filtre passe-bande de ± 30 nm au maximum.

▼M3

26. Les propriétés optiques de la substance d'essai ou son action chimique sur le MTT sont susceptibles d'interférer avec l'expérience et de conduire à une estimation erronée de la viabilité (la substance d'essai pouvant aussi bien inhiber ou faire disparaître la coloration que la provoquer). Cela peut se produire lorsque la substance d'essai n'a pas été totalement éliminée du tissu par rinçage ou lorsqu'elle a pénétré dans l'épiderme. Si une substance d'essai agit directement sur le MTT (agent réducteur du MTT), est naturellement colorée, ou si elle se colore durant le traitement du tissu, des contrôles supplémentaires sont pratiqués pour détecter et corriger les interférences de la substance d'essai avec la mesure de la viabilité. On trouvera une description détaillée de la manière de corriger la réduction directe du MTT ou les interférences dues aux agents colorants dans le mode opératoire normalisé des trois méthodes validées (26) (27) (28).

Critères d'acceptabilité

27. Pour chaque méthode faisant appel à des lots valables d'épiderme humain reconstitué (voir paragraphe 21), les tissus traités par le témoin négatif (TN) présentent une DO rendant compte de la qualité des tissus ayant été soumis à toutes les étapes d'expédition et de réception ainsi qu'à l'intégralité du protocole. Les valeurs de DO des témoins ne sont pas inférieures aux limites historiques. De la même façon, les résultats obtenus pour les tissus traités par le témoin positif (TP), c'est-à-dire la solution aqueuse de SDS à 5 %, rendent compte de leur capacité à réagir à un produit chimique irritant dans les conditions de la méthode d'essai (26) (27) (28). Il y a lieu de définir les mesures associées et appropriées de la variabilité entre les réplicats de tissu (par exemple, si des écarts types sont utilisés, ils se situent dans l'intervalle unilatéral de tolérance à 95 % calculé à partir des données historiques; pour la MRV, l'écart type est ≤ 18 %).

Interprétation des résultats et modèle prédictif

28. La valeur de DO obtenue pour chaque substance d'essai peut être utilisée pour calculer le pourcentage de viabilité cellulaire normalisé par rapport au témoin négatif, lequel correspond à une viabilité cellulaire arbitrairement fixée à 100 %. La valeur seuil du pourcentage de viabilité cellulaire, qui établit la distinction entre les substances d'essai irritantes et les substances d'essai non classées, de même que les procédures statistiques utilisées pour évaluer les résultats et identifier les substances irritantes, sont clairement définies et étayées par des données. Il conviendra par ailleurs de démontrer leur pertinence. Les valeurs seuils permettant de prédire les effets irritants sont indiquées ci-dessous:

— La substance d'essai est considérée comme irritante pour la peau conformément à la catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne, si la viabilité du tissu après exposition et incubation post-traitement est inférieure ou égale (≤) à 50 %.

— Selon le cadre législatif dans lequel les résultats de la présente méthode d'essai sont utilisés, la substance chimique d'essai peut être considérée comme non irritante pour la peau conformément à l'absence de catégorie du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne, si la viabilité du tissu après exposition et incubation posttraitement est supérieure (>) à 50 %.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

29. Pour chaque essai, il convient de présenter, sous forme de tableau, les résultats obtenus pour chaque réplicat de tissu (par exemple, les valeurs de DO et le pourcentage de viabilité cellulaire calculé pour chaque substance d'essai, ainsi que la classification correspondante), y compris les données obtenues, le cas échéant, en reproduisant les expériences. Il conviendra en outre de préciser les valeurs moyennes ± écart type correspondant à chaque essai. Les interactions observées avec le réactif MTT et les substances d'essai colorées seront signalées pour chaque substance testée.

▼**M3**

Rapport d'essai

30. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Produits chimiques d'essai et témoin:

— nom(s) chimique(s), tels que le nom CAS, le numéro CAS, le nom et le numéro CE, s'ils sont connus,

— pureté et composition du produit chimique (en pourcentage en poids),

— propriétés physico-chimiques importantes pour l'exécution de l'essai (par exemple, état physique, stabilité, volatilité, pH et hydrosolubilité, s'ils sont connus),

— le cas échéant, traitement des produits chimiques d'essai/témoins avant l'essai (par exemple, chauffage, réduction en poudre),

— conditions de stockage.

Justification du choix du modèle d'épiderme humain reconstitué et du protocole utilisé

Conditions de l'essai:

— système cellulaire utilisé,

— informations complètes sur le modèle spécifique d'épiderme humain reconstitué utilisé, et notamment sur ses performances, à savoir (liste non limitative):

  i) viabilité,

  ii) fonction de barrière,

  iii) morphologie,

  iv) reproductibilité et valeur prédictive,

  v) contrôles de qualité (CQ) du modèle,

— détails du protocole utilisé,

— doses d'essai utilisées, durée de l'exposition et de la période d'incubation posttraitement,

— description de toute modification éventuelle du protocole,

— référence aux données historiques du modèle, à savoir (liste non limitative):

  i) acceptabilité des données de CQ par rapport aux données historiques des lots,

  ii) acceptabilité des valeurs des témoins positifs et négatifs par rapport aux moyennes et aux fourchettes des témoins positifs et négatifs,

— description des critères d'évaluation utilisés, notamment justification du choix des valeurs-seuils pour le modèle prédictif,

— référence aux données témoins historiques.

▼M3

Résultats:

— présentation sous forme de tableau des résultats de chaque produit chimique d'essai pour chaque essai et chaque mesure de réplicat,

— indication des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou pour les produits chimiques d'essai colorants,

— description des autres effets observés.

Discussion des résultats

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

1. Nations unies (2009), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), Troisième édition révisée, ONU New York et Genève, 2007, disponible à l'adresse suivante: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_f.html].

2. EC-ECVAM (2009), Statement on the «Performance under UN GHS of three in vitro assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards», publié par le Comité consultatif scientifique du CEVMA (ESAC30), 9 avril 2009, disponible à l'adresse suivante: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

3. Règlement (CE) nº 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) nº 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.

4. OCDE (2002), Effet irritant/corrosif aigu sur la peau, Ligne directrice nº 404, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

5. OCDE (2004), Corrosion cutanée in vitro: Essai de résistance électrique transcutanée (TER), Ligne directrice nº 430, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

6. OCDE (2004), Corrosion cutanée in vitro: Essai sur modèle de peau humaine, Ligne directrice nº 431, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

7. OCDE (2006), Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée, Lignes directrices nº 435, Ligne directrice pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris, disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8. EC-ECVAM (2009), Performance Standards for in vitro skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE), disponible à l'adresse suivante: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

9. OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Série de l'OCDE sur les essais et les évaluations nº 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCDE, Paris. Disponible en anglais à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

10. Fentem, J. H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G. R., Harbell, J. W., Heylings, J. R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J. J. M. et Botham, P. (2001), A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57-93.

11. Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. et Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, Toxicol. in Vitro 16, 765–770.

▼M3

12. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. et Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests, ALTEX 21, 107–114.

13. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. et Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351-367.

14. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. et Rubinsteen, G. (2005), The in vitro acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329-349.

15. Zuang, V., Balls, M., Botham, P. A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R. D., Elliot, G. R., Fentem, J. H., Heylings, J. R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J. J. M., Wiemann, C. et Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109-129.

16. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. et Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559-601.

17. Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1-α, disponible à l'adresse suivante: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

18. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. et Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603-619.

19. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. et Leclaire, J. (2007), In vitro acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy - Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351-358.

20. EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of in-vitro tests for skin irritation, publié par le Comité consultatif scientifique du CEVMA (ESAC26), 27 avril 2007, disponible à l'adresse suivante: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

21. EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to in vitro skin irritation testing, Voir la rubrique «Validation Study Documents, section Skin Irritation», à l'adresse: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

22. EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of in vitro tests for skin irritation testing, publié par le Comité consultatif scientifique du CEVMA (ESAC29), 5 novembre 2008, disponible à l'adresse suivante: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

23. OCDE (2010), Document explicatif accompagnant le projet de Ligne directrice de l'OCDE sur l'essai d'irritation cutanée in vitro. Série de l'OCDE sur les essais et les évaluations n° 137, OCDE, Paris. [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]

24. Welss, T., Basketter, D. A. et Schröder, K. R. (2004), In vitro skin irritation: fact and future, State of the art review of mechanisms and models. Toxicol. in Vitro 18, 231-243.

▼**M3**

25. Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55-63.

26. EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min - 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals, disponible à l'adresse: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

27. EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: In vitro EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT). For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200), disponible à l'adresse suivante: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

28. SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42 *bis* test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation, disponible à l'adresse suivante: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

29. Harvell, J. D., Lamminstausta, K., et Maibach, H. I. (1995), Irritant contact dermatitis. In: Practical Contact Dermatitis, p. 7-18, (Ed. Guin J. D.), Mc Graw-Hill, New York.

30. Directive 2001/59/CE de la Commission du 6 août 2001 portant vingt-huitième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses, JO L 225 du 21.8.2001, p. 1.

31. Basketter, D. A., York, M., McFadden, J. P. et Robinson, M. K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test, Contact Dermatitis 51, 1-4.

32. Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. et Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular in vitro assays and animal in vivo data, ALTEX, 14, 359-365.

33. Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. et Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with in vitro skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis, 62, 109-116.

▼M3

Appendice 1

Définitions

CI_{50}: valeur pouvant être estimée en déterminant la concentration d'une substance marqueur qui réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI_{50}) après un temps d'exposition déterminé. Voir également TE_{50}.

Concordance: mesure de performance pour les méthodes d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories. Elle constitue un des aspects de la pertinence. Ce terme est utilisé indifféremment à la place de «précision», et se définit comme la proportion de toutes les substances chimiques testées qui ont été correctement classées comme positives ou négatives (9).

Dose infinie: quantité de substance d'essai appliquée sur la peau qui dépasse la quantité requise pour recouvrir entièrement et uniformément la surface de l'épiderme.

Essai substitutif: essai conçu pour remplacer un essai utilisé en routine et accepté, servant à l'identification des dangers et/ou à l'évaluation de risques, et dont il a été démontré qu'il assure, par rapport à l'essai accepté, une protection équivalente ou accrue de la santé humaine ou animale ou de l'environnement, selon les cas, pour toutes les situations et substances chimiques d'essai possibles (9).

Fiabilité: mesure dans laquelle une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoires (9).

Irritation cutanée: apparition sur la peau de lésions réversibles à la suite de l'application d'une substance d'essai pendant une durée pouvant aller jusqu'à quatre heures. L'irritation cutanée est une réaction locale, non immunogène, qui se manifeste peu après une stimulation (29). Elle se caractérise essentiellement par un processus réversible impliquant des réactions inflammatoires et la plupart des signes cliniques caractéristiques de l'irritation (érythème, œdème, démangeaisons et douleur) qui sont associés au processus inflammatoire.

Normes de performance: normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée, structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent: i) les éléments essentiels de la méthode d'essai, ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée, et iii) les niveaux de précision et de fiabilité comparables à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (9).

Pertinence: description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (9).

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (9).

Produits chimiques de référence: produits chimiques choisis pour être utilisés dans le processus de validation, dont les réponses dans le système d'essai de référence in vitro ou in vivo ou sur l'espèce d'intérêt sont déjà connues. Ils doivent être représentatifs des classes de produits chimiques auxquelles il est prévu d'appliquer la méthode d'essai, et couvrir la gamme complète des réponses attendues des produits chimiques pour lesquels la méthode d'essai est conçue, qu'elles soient fortes, faibles, ou négatives. Les différentes étapes du processus de validation, ainsi que différentes méthodes d'essai et utilisations d'essais, peuvent exiger des groupes de produits chimiques de référence différents (9).

▼**M3**

Règlement CLP de l'Union européenne (règlement de la Commission européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances chimiques et des mélanges): vise la mise en œuvre dans l'Union européenne (UE) du SGH de l'ONU pour la classification des produits chimiques (substances et mélanges) (3).

Réplique d'essai: méthode d'essai structurellement et fonctionnellement similaire à une méthode de référence validée et acceptée. Ce type d'essai peut éventuellement faire l'objet d'une validation accélérée. Synonyme de méthode d'essai similaire (9).

Sensibilité: proportion des substances d'essai positives/actives qui sont correctement classées par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (9).

SGH [Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations unies (ONU)]: système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

Spécificité: proportion des substances d'essai négatives/inactives qui sont correctement classées par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (9).

Stratégie d'essai à plusieurs niveaux: essai faisant appel à plusieurs méthodes de manière séquentielle; les méthodes d'essai sélectionnées à chaque niveau sont déterminées par les résultats du niveau d'essai précédent (9).

Substance d'essai (également dénommée substance chimique d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

TE_{50}*:* valeur pouvant être estimée en déterminant le temps d'exposition nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % après application de la substance marqueur à une concentration fixe spécifiée. Voir également CI_{50}.

Viabilité cellulaire: paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire, par exemple la capacité des déshydrogénases mitochondriales cellulaires à réduire le colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium], qui, selon l'effet mesuré et le protocole utilisé pour l'essai, est en corrélation avec le nombre total et/ou la vitalité des cellules vivantes.

▼M3

Appendice 2

Normes de performance pour l'évaluation de méthodes similaires ou modifiées proposées pour les essais d'irritation cutanée in vitro sur épiderme humain reconstitué

INTRODUCTION

1. L'objectif des normes de performance est d'indiquer sur quelles bases évaluer la précision et la fiabilité de nouvelles méthodes d'essai vis-à-vis d'objectifs définis, que ces méthodes soient protégées (par des droits d'auteur, une marque déposée ou un enregistrement) ou non. Conçues à partir de méthodes validées et acceptées, ces normes peuvent également servir à évaluer la fiabilité et la précision d'autres méthodes analogues (aussi appelées «essais répliques»), fondées sur des principes scientifiques et permettant de quantifier ou prévoir le même effet biologique ou toxique (9).

2. Avant d'adopter des méthodes modifiées, c'est-à-dire les améliorations proposées d'une méthode approuvée, il convient de déterminer quel peut être l'effet des modifications envisagées sur les performances de l'essai, et dans quelle mesure ces modifications influent sur les informations disponibles pour les autres éléments du processus de validation. En fonction du nombre et de la nature des changements proposés, des données générées et des documents justificatifs associés, le processus de validation sera le même que pour un nouvel essai ou, le cas échéant, limité à une évaluation de la fiabilité et de la pertinence sur la base des normes de performance établies (9).

3. La fiabilité et la précision des méthodes d'essai similaires (répliques) ou des variantes de l'une des trois méthodes validées [EpiSkin™ (méthode de référence validée, MRV), EpiDerm™ SIT (EPI-200) et SkinEthic™ RHE] proposées dans la présente méthode d'essai sont évaluées à l'aide de produits chimiques représentant l'éventail complet des scores d'irritation de Draize. Les valeurs de fiabilité et de précision obtenues, lors de l'évaluation des méthodes similaires ou modifiées proposées, à l'aide des 20 produits chimiques de référence recommandés dans les normes de performance (tableau 1) sont comparables à celles obtenues par la MRV ou meilleures que celles-ci (tableau 2) (2) (16). Les valeurs de fiabilité et de précision à atteindre sont indiquées aux paragraphes 8 à 12 du présent appendice. Des substances non classées («sans catégorie» dans le SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne) et classées (catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne) (1) représentant différentes classes chimiques sont incluses afin que la fiabilité et la précision (sensibilité, spécificité et précision globale) de la méthode d'essai proposée puissent être comparées à celles de la MRV. Avant d'appliquer une méthode pour tester de nouveaux produits chimiques, il convient de déterminer sa fiabilité et son aptitude à détecter correctement les substances chimiques irritantes de la catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne ainsi que, selon le cadre réglementaire pour lequel les données sont produites, son aptitude à détecter correctement les substances chimiques ne relevant d'aucune catégorie du SGH.

4. Ces normes de performance sont fondées sur celles du ECVAM (8), mises à jour conformément aux systèmes SGH de l'ONU et CLP de l'Union européenne sur la classification et l'étiquetage (1) (3). Les normes de performance d'origine ont été définies à l'issue de l'étude de validation (21) et établies sur la base du système de classification de l'Union européenne tel que figurant dans la directive 2001/59/CE de la Commission du 6 août 2001 portant vingt-huitième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses ([1]). À la suite de l'adoption par l'Union européenne du système

([1]) JO L 225 du 21.8.2001, p. 1.

▼M3

SGH de l'ONU pour la classification et l'étiquetage des substances chimiques (CLP de l'Union européenne) (3), intervenue entre la finalisation de l'étude de validation et l'achèvement de la présente méthode d'essai, les normes de performance ont été mises à jour (8). Les modifications portent principalement sur: i) l'ensemble de produits chimiques de référence utilisé dans les normes de performance; et ii) les valeurs définies pour la fiabilité et la précision (2) (23).

NORMES DE PERFORMANCE POUR LES MÉTHODES D'ESSAI D'IRRITATION CUTANÉE IN VITRO SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ

5. Les normes de performance se composent des trois éléments suivants (9):

I) les éléments essentiels de la méthode d'essai

II) une liste minimale de produits chimiques de référence

III) des valeurs définies de fiabilité et de précision

I) **Éléments essentiels de la méthode d'essai**

6. Il s'agit des éléments structurels, fonctionnels et procéduraux essentiels d'une méthode d'essai validée qui figurent dans le protocole de toute méthode structurellement et fonctionnellement similaire ou modifiée proposée. Ces éléments recouvrent les caractéristiques propres de la méthode, la description des points clés de la procédure et les mesures de contrôle de qualité. Le respect de ces éléments essentiels contribuera à garantir que les méthodes similaires ou modifiées proposées sont fondées sur les mêmes concepts que la MRV correspondante (9). Les éléments essentiels de la méthode d'essai sont décrits en détail aux paragraphes 16 à 21 de la présente méthode d'essai, et l'essai est réalisé de la manière suivante:

— conditions générales (paragraphe 16),

— conditions fonctionnelles, comprenant:

— viabilité (paragraphe 17),

— fonction de barrière (paragraphe 18),

— morphologie (paragraphe 19),

— reproductibilité (paragraphe 20),

— contrôle de qualité (paragraphe 21).

II) **Liste minimale de produits chimiques de référence**

7. Les produits chimiques de référence sont utilisés pour déterminer si la fiabilité et la précision d'une méthode proposée similaire ou modifiée, dont on a démontré qu'elle était suffisamment similaire à la MRV sur les plans structurel et fonctionnel ou qu'elle représentait une modification mineure par rapport à l'une des trois méthodes validées, sont comparables à celles de la MRV ou meilleures que celles-ci (2) (8) (16) (23). Les 20 produits chimiques de référence recommandés figurant dans le tableau 1 comprennent des substances représentant différentes classes chimiques (catégories chimiques basées sur des groupes fonctionnels) et représentatives de l'éventail complet des scores d'irritation de Draize (des substances non irritantes aux substances fortement irritantes). Le tableau comprend dix substances classées dans la catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne et 10 substances non classées, parmi lesquelles trois relèvent de la catégorie 3 facultative du SGH de l'ONU. Aux fins de la présente méthode d'essai, la catégorie 3 facultative du SGH de l'ONU équivaut à «sans catégorie». Les produits chimiques figurant dans le tableau 1 sont sélectionnés parmi ceux qui sont utilisés lors de la phase d'optimisation consécutive à l'étude de prévalidation et de validation de

▼M3

la MRV, eu égard à leur fonction chimique et leur état physique (14) (18). Ces produits chimiques de référence représentent le nombre minimal de substances à utiliser pour évaluer la précision et la fiabilité d'une méthode proposée similaire ou modifiée, mais ne sont pas utilisés pour le développement de nouvelles méthodes. Si une substance du tableau n'est pas disponible, il est possible d'utiliser d'autres produits chimiques pour lesquels il existe des données de référence in vivo appropriées, choisis en premier lieu parmi ceux utilisés lors de la phase d'optimisation consécutive à l'étude de prévalidation ou de validation de la MRV. Si nécessaire, il est possible d'ajouter à cette liste minimale d'autres produits chimiques représentant d'autres classes chimiques et pour lesquels on dispose de données de référence in vivo appropriées, afin d'évaluer plus avant la précision de la méthode proposée.

Tableau 1

Liste minimale de produits chimiques de référence pour la détermination des valeurs de précision et de fiabilité de méthodes d'irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué similaires ou modifiées (1)

Produit chimique	Numéro CAS	État physique	Score in vivo	Cat. MRV in vitro	Cat. SGH/règlement CLP de l'Union européenne in vivo
1-bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	liquide	0	cat. 2	sans catégorie
phtalate de diéthyle	84-66-2	liquide	0	sans catégorie	sans catégorie
acide naphtylacétique	86-87-3	solide	0	sans catégorie	sans catégorie
phénoxyacétate d'allyle	7493-74-5	liquide	0,3	sans catégorie	sans catégorie
isopropanol	67-63-0	liquide	0,3	sans catégorie	sans catégorie
4-(méthylthio)-benzaldéhyde	3446-89-7	liquide	1	cat. 2	sans catégorie
stéarate de méthyle	112-61-8	solide	1	sans catégorie	sans catégorie
butyrate d'heptyle	5870-93-9	liquide	1,7	sans catégorie	sans catégorie
salicylate d'hexyle	6259-76-3	liquide	2	sans catégorie	sans catégorie
cinnamaldéhyde	104-55-2	liquide	2	cat. 2	sans catégorie *(cat. 3 facultative)* (3)
décane-1-ol (2)	*112-30-1*	*liquide*	*2,3*	*cat. 2*	*cat. 2*
3-p-cuménil-2-méthylpropionaldéhyde	103-95-7	liquide	2,3	cat. 2	cat. 2
1-bromohexane	111-25-1	liquide	2,7	cat. 2	cat. 2
hydrochlorure de 2-chlorométhyl-4-méthoxy-3,5 diméthyl pyridine	86604-75-3	solide	2,7	cat. 2	cat. 2
Disulfure de dipropyle (2)	*629-19-6*	*liquide*	*3*	sans catégorie	*cat. 2*
hydroxyde de potassium (sol. aqueuse à 5 %)	1310-58-3	liquide	3	cat. 2	cat. 2
Méthyl-2 tert-butyle-5 thiophénol; thio PTBT	7340-90-1	liquide	3,3	cat. 2	cat. 2
1-méthyl-3-phényl-1-pipérazine	5271-27-2	solide	3,3	cat. 2	cat. 2

▼M3

Produit chimique	Numéro CAS	État physique	Score in vivo	Cat. MRV in vitro	Cat. SGH/règlement CLP de l'Union européenne in vivo
heptanal	111-71-7	liquide	3,4	cat. 2	cat. 2
tétrachloréthylène	127-18-4	liquide	4	cat. 2	cat. 2

([1]) La sélection des produits chimiques se fonde sur les critères suivants: i) les substances sont disponibles dans le commerce; ii) elles sont représentatives de l'éventail complet des scores d'irritation de Draize (des substances non irritantes aux substances très irritantes); iii) elles ont une structure chimique bien définie; iv) elles sont représentatives de la fonctionnalité chimique utilisée pour la validation; v) elles ne sont pas associées à un profil extrêmement toxique (cancérogène ou toxique pour la reproduction, par exemple) ni à des coûts d'élimination prohibitifs.

([2]) Substances irritantes chez le lapin, mais pour lesquelles il existe des preuves fiables de leur caractère non irritant chez l'homme (31) (32) (33).

([3]) Dans le cadre du SGH de l'ONU, pas dans le cadre du règlement CLP de l'Union européenne.

III) **Valeurs définies de fiabilité et de précision**

8. Afin d'établir la fiabilité et la précision de méthodes similaires ou modifiées proposées destinées à des transferts entre laboratoires, les 20 produits chimiques de référence du tableau 1 sont testés dans au moins trois laboratoires différents. Cependant, si la méthode est destinée à être utilisée dans un seul laboratoire, un essai interlaboratoires n'est pas indispensable à la validation. Il est toutefois essentiel que ces études de validation soient évaluées de manière indépendante par des organismes de validation reconnus au niveau international, conformément aux lignes directrices internationales en la matière (9). Dans chaque laboratoire, les 20 produits chimiques de référence font tous l'objet de trois essais indépendants les uns des autres, réalisés sur des lots de tissus différents et à des intervalles de temps suffisamment espacés. Chaque essai comporte au moins trois réplicats de tissus testés simultanément pour chaque produit chimique d'essai, TN et TP.

9. Le calcul des valeurs de la fiabilité et de la précision de la méthode proposée est effectué en tenant compte des quatre critères ci-dessous, afin de garantir qu'il est réalisé de manière prédéfinie et cohérente:

   1. Seules les données issues de séquences d'essais complètes peuvent être utilisées pour le calcul de la variabilité intralaboratoire ou interlaboratoires de la méthode et de la valeur prédictive (précision).

   2. La classification finale de chaque produit chimique de référence dans chaque laboratoire participant est obtenue en utilisant la valeur moyenne de la viabilité constatée lors des différents essais réalisés dans le cadre d'une séquence d'essais complète.

   3. Seules les données obtenues pour des produits chimiques dont les séquences d'essai ont été complétées dans tous les laboratoires participants sont retenues pour le calcul de la variabilité interlaboratoires de la méthode.

   4. Le calcul des valeurs de précision est réalisé en utilisant les prévisions individuelles des laboratoires obtenues pour les 20 produits chimiques de référence par les différents laboratoires participants.

   Dans ce contexte, une **séquence d'essais** consiste en trois essais réalisés de manière indépendante dans un laboratoire pour un produit chimique d'essai donné. Une **séquence d'essais complète** est une séquence d'essais réalisée dans un laboratoire pour un produit chimique d'essai, et pour laquelle les trois essais sont recevables. Cela signifie que tout essai non recevable annule la séquence entière des trois essais.

Reproductibilité intralaboratoire

10. L'évaluation de la répétabilité intralaboratoire doit faire apparaître une concordance des classifications (catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne et «sans catégorie») obtenues par le biais de différents essais indépendants réalisés sur les 20 produits chimiques de référence par un même laboratoire qui soit supérieure ou égale (≥) à 90 %.

▼M3

Reproductibilité interlaboratoire

11. Il n'est pas indispensable d'évaluer la reproductibilité interlaboratoire si la méthode proposée n'est utilisée que dans un seul laboratoire. En ce qui concerne les méthodes destinées à être transférées d'un laboratoire à l'autre, la concordance des classifications (catégorie 2 du SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne et «sans catégorie») obtenues par le biais de différents essais indépendants réalisés sur les 20 produits chimiques de référence par au moins trois laboratoires (de préférence), est supérieure ou égale (≥) à 80 %.

Valeur prédictive (précision)

12. La précision (sensibilité, spécificité et précision globale) de la méthode similaire ou modifiée proposée est comparable ou supérieure à celle de la MRV, en tenant compte des informations supplémentaires relatives à sa pertinence pour les espèces étudiées (tableau 2). La sensibilité est supérieure ou égale (≥) à 80 % (2) (8) (23). Toutefois, une restriction spécifique supplémentaire s'applique à la sensibilité de la méthode in vitro proposée, à savoir que seules deux substances in vivo de catégorie 2, le décane-1-ol et le disulfure de dipropyle, peuvent être classées de manière erronée comme «sans catégorie» par plus d'un laboratoire participant. La spécificité de la méthode in vitro proposée est supérieure ou égale (≥) à 70 % (2) (8) (23). Il n'existe aucune restriction supplémentaire concernant la spécificité de la méthode d'essai in vitro proposée, c'est-à-dire que tout laboratoire participant peut classer de manière erronée comme «sans catégorie» une substance in vivo, pourvu que la spécificité finale de la méthode d'essai reste dans la fourchette acceptable. La précision globale est supérieure ou égale (≥) à 75 % (2) (8) (23). Bien que la sensibilité de la MRV calculée pour les 20 produits chimiques de référence figurant dans le tableau 1 soit égale à 90 %, la valeur de sensibilité minimum nécessaire pour qu'une méthode similaire ou modifiée soit considérée comme valable est fixée à 80 %, étant donné que le décane-1-ol (substance à la limite entre deux catégories) et le disulfure de dipropyle (un faux négatif de la MRV) sont connus pour être des produits non irritants chez l'homme (31) (32) (33), même s'ils ont été identifiés comme irritants lors de l'essai chez le lapin. Les modèles d'épiderme humain reconstitué étant construits à l'aide de cellules d'origine humaine, ils prédiront sans doute l'absence d'effets irritants de ces substances («sans catégorie» dans le SGH de l'ONU/règlement CLP de l'Union européenne).

Tableau 2

Valeurs prédictives requises pour la sensibilité, la spécificité et la précision globale pour qu'une méthode similaire ou modifiée soit considérée comme valable

Sensibilité	Spécificité	Précision globale
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Critères d'acceptation de l'étude

13. Il est possible qu'un ou plusieurs essai(s) relatif(s) à une ou plusieurs substance(s) d'essai ne remplisse(nt) pas les critères d'acceptation pour les substances d'essai et témoins, ou qu'il(s) ne soi(en)t pas acceptable(s) pour d'autres raisons. Afin de compléter les données manquantes, deux essais supplémentaires au maximum pour chaque substance d'essai sont autorisés (nouvel essai). Plus précisément, étant donné qu'en cas de nouvel essai, les TP et TN sont également testés simultanément, deux essais supplémentaires au maximum peuvent être réalisés pour chaque substance d'essai.

14. Il est possible que, même après un nouvel essai, le nombre minimum de trois essais valables nécessaire pour chaque substance testée ne soit pas atteint pour tous les produits chimiques de référence dans tous les laboratoires participants, et que par conséquent la matrice de données obtenue soit incomplète. Dans ce cas, il convient de respecter les trois critères suivants afin de pouvoir considérer les jeux de données comme acceptables:

    1) les 20 produits chimiques de référence font l'objet d'au moins une séquence d'essais complète;

▼**M3**

2) dans au moins trois laboratoires participants, au minimum 85 % des séquences d'essais sont complètes (pour 20 produits chimiques, cela signifie trois séquences d'essais non recevables autorisées dans un seul laboratoire);

3) au minimum 90 % de toutes les séquences d'essais possibles issues d'au moins trois laboratoires sont complètes (pour 20 produits chimiques testés dans trois laboratoires, cela signifie six séquences d'essais non recevables autorisées au total).

▼M2

B. 47 **MÉTHODE D'ESSAI D'OPACITÉ ET DE PERMÉABILITÉ DE LA CORNÉE BOVINE POUR LA MISE EN ÉVIDENCE DES SUBSTANCES CORROSIVES ET FORTEMENT IRRITANTES POUR L'ŒIL**

INTRODUCTION

1. La méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine (OPCB) est une méthode d'essai in vitro pouvant être utilisée, dans certaines circonstances, compte tenu de ses limites particulières, pour classer des substances et des mélanges dans la catégorie des produits «corrosifs et fortement irritants pour l'œil» (1) (2) (3). Aux fins de la présente méthode d'essai, les substances et mélanges fortement irritants sont définis comme ceux qui provoquent des lésions cutanées persistant, chez le lapin, au moins 21 jours après administration. Bien qu'elle n'ait pas été validée en tant que méthode remplaçant totalement l'essai oculaire in vivo chez le lapin, la méthode OPCB est néanmoins recommandée dans le cadre d'une stratégie d'essai séquentielle visant à établir une classification et un étiquetage réglementaires dans un champ spécifique d'application (4) (5). Les substances et mélanges d'essai (6) peuvent être classés corrosifs ou fortement irritants pour l'œil sans qu'il soit nécessaire de procéder à des essais supplémentaires chez le lapin. En revanche, une substance révélant un résultat négatif à l'issue de l'essai a besoin d'être testée sur des lapins selon une démarche expérimentale de type séquentiel, telle que celle décrite dans la ligne directrice de l'OCDE n° 405 (7) (chapitre B.5 de la présente annexe).

2. L'objet de la présente méthode d'essai est de décrire les procédures utilisées pour évaluer l'effet potentiel corrosif ou fortement irritant pour l'œil d'une substance d'essai. Cet effet est mesuré par la capacité de la substance à provoquer une opacité et une perméabilité cornéennes accrues sur une cornée bovine isolée. Les effets toxiques pour la cornée sont mesurés par: i) la diminution de la capacité de transmission de la lumière (opacité), et ii) l'augmentation du passage de la fluorescéine sodique (perméabilité). Les mesures de l'opacité et de la perméabilité de la cornée après exposition à la substance d'essai sont ensuite combinées pour établir le score d'irritation in vitro (SIIV), utilisé pour classer la substance d'essai en fonction de son pouvoir irritant.

3. Des substances irritantes pour l'œil qui provoquent des lésions se résorbant en moins de 21 jours et des substances non irritantes ont également été testées par la méthode OPCB. Toutefois, pour les substances entrant dans ces catégories, la précision et la fiabilité de cette méthode n'ont pas été évaluées de façon formelle.

4. Des définitions sont fournies dans l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES DE LA MÉTHODE

5. La présente méthode d'essai est fondée sur le protocole expérimental de la méthode OPCB (8) du Comité de coordination interagences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM), élaboré à la suite d'une étude de validation internationale (4)(5)(9) à laquelle ont participé le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM) et le Centre japonais pour la validation de méthodes alternatives (JaCVAM). Ce protocole s'appuie sur des informations provenant de l'Institute for In Vitro Sciences (IIVS) et sur le protocole INVITTOX n°124 (10), qui a été utilisé lors de l'étude de prévalidation de l'essai OPCB conduite en 1997-1998 sous l'égide de la Communauté Européenne. Ces protocoles se fondent tous deux sur la méthode d'essai OPCB décrite pour la première fois par Gautheron *et al.* (11).

▼M2

6. Les limites connues de cette méthode d'essai concernent le taux élevé de faux positifs pour les alcools et les cétones, et le taux élevé de faux négatifs pour les substances solides, relevés dans la base de données de validation (voir paragraphe 44) (5). Si l'on exclut de la base de données les substances relevant de ces classes chimiques et physiques, la précision de la méthode OPCB au regard des systèmes de classifications de l'UE, de l'EPA et du SGH se trouve considérablement améliorée (5). Compte tenu de la finalité de cet essai (qui vise exclusivement à détecter les substances corrosives et fortement irritantes pour l'œil), les taux de faux négatifs ne sont pas préoccupants car les substances concernées feront ensuite l'objet d'essais chez le lapin ou d'autres essais in vitro dûment validés, conformément aux exigences de la réglementation, selon une démarche expérimentale séquentielle fondée sur la force probante des données. De surcroît, l'actuelle base de données de validation n'a pas permis de procéder à l'évaluation adéquate de certaines classes de substances chimiques ou de produits (par exemple, les mélanges). Les investigateurs peuvent néanmoins envisager d'avoir recours à cette méthode d'essai pour tous les types de matériel d'essai (y compris les mélanges), auquel cas un résultat positif pourrait être interprété comme révélateur d'un effet corrosif ou fortement irritant pour l'œil. Il convient toutefois d'interpréter avec prudence les résultats positifs obtenus avec des alcools ou des cétones en raison du risque de surestimation.

7. Tous les modes opératoires faisant intervenir des yeux et des cornées de bovins doivent être conformes aux réglementations et procédures applicables à l'installation d'essai en matière de manipulation des produits dérivés d'animaux qui englobent, sans s'y limiter, les tissus et fluides tissulaires. Le respect des précautions universelles de laboratoire est recommandé (12).

8. Bien qu'elle prenne en compte certains des effets oculaires évalués par la méthode d'essai d'irritation oculaire chez le lapin, et dans une certaine mesure leur degré de gravité, cette méthode d'essai présente toutefois l'inconvénient de ne pas prendre en considération les lésions de la conjonctive et de l'iris. De surcroît, même si la méthode OPCB ne permet pas en soi d'évaluer la réversibilité des lésions cornéennes, il a été proposé, sur la base d'études menées sur l'œil de lapin, d'utiliser une évaluation de la profondeur initiale de la lésion cornéenne pour distinguer les effets réversibles des effets irréversibles (13). Enfin, la méthode OPCB ne permet pas d'évaluer la toxicité systémique potentielle associée à l'exposition oculaire.

9. Les travaux visant à mieux caractériser l'utilité et les limites de la méthode OPCB pour la mise en évidence des substances faiblement irritantes ou non irritantes se poursuivent (voir également le paragraphe 45). Les utilisateurs sont également incités à fournir des spécimens et/ou des données aux organismes de validation à des fins d'évaluation formelle des utilisations futures possibles de la méthode d'essai OPCB, notamment pour la mise en évidence des substances faiblement irritantes ou non irritantes.

10. Tout laboratoire conduisant cet essai pour la première fois doit utiliser les substances chimiques d'épreuve de compétence mentionnées à l'appendice 2. Un laboratoire pourra faire valoir l'utilisation de ces substances pour démontrer sa compétence technique à conduire un essai selon la méthode OPCB avant de proposer les données issues de l'essai OPCB à des fins de classification réglementaire des dangers.

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. La méthode d'essai OPCB est un modèle organotypique qui permet de maintenir *in vitro* les fonctions physiologiques et biochimiques normales de la cornée bovine pendant une courte période. Selon cette méthode, les dommages causés par la substance d'essai sont évalués par des mesures quantitatives des modifications de l'opacité et de la perméabilité de la cornée réalisées, respectivement, à l'aide d'un opacitomètre et d'un spectrophotomètre visible. Ces deux mesures entrent dans le calcul du SIIV, utilisé pour assigner une catégorie de classification de danger d'irritation *in vitro* permettant d'estimer le potentiel d'irritation oculaire *in vivo* d'une substance d'essai (voir «Critères de décision»).

▼M2

12. La méthode d'essai OPCB utilise des cornées isolées provenant d'yeux de bovins récemment abattus. L'opacité cornéenne est mesurée par la quantité de lumière traversant la cornée. La perméabilité est mesurée par la quantité de fluorescéine sodique traversant toute l'épaisseur de la cornée, et détectée dans le milieu de la chambre postérieure. Les substances d'essai, introduites dans la chambre antérieure du porte-cornée, sont appliquées sur la surface épithéliale de la cornée. L'appendice 3 présente une description et un schéma de porte-cornée utilisé dans la méthode OPCB. Ces appareils sont disponibles dans le commerce auprès de différents fabricants, ou peuvent être construits.

Provenance et âge des yeux de bovins et sélection des espèces animales

13. Les bovins envoyés à l'abattoir sont généralement destinés à la consommation humaine ou à d'autres usages commerciaux. Seules les cornées de bêtes en bonne santé, considérées comme propres à intégrer la chaîne alimentaire humaine, sont prélevées pour la méthode OPCB. Le poids des bovins variant considérablement en fonction de la race, de l'âge et du sexe, il n'existe aucune recommandation spécifique en la matière au moment de l'abattage.

14. L'utilisation d'yeux provenant d'animaux d'âges différents peut entraîner des variations de dimension des cornées. Les cornées dont le diamètre horizontal est supérieur à 30,5 mm et l'épaisseur cornéenne centrale (ECC) supérieure ou égale à 1 100 μm ont généralement été prélevées sur des bovins de plus de huit ans, tandis que les cornées ayant un diamètre horizontal inférieur à 28,5 mm et une ECC inférieure à 900 μm proviennent plutôt de bêtes de moins de cinq ans (14). En conséquence, les yeux des bovins âgés de plus de 60 mois ne sont généralement pas utilisés. En général, les yeux des bovins de moins de 12 mois ne sont pas non plus utilisés, car leur développement n'est pas terminé et l'épaisseur ainsi que le diamètre de la cornée sont nettement inférieurs à ceux des yeux provenant de bovins adultes. Toutefois, les cornées issues d'animaux jeunes (entre 6 et 12 mois) sont acceptables car elles présentent certains avantages, tels qu'une plus grande disponibilité, une fourchette d'âge plus restreinte, et des risques moins importants d'exposition potentielle à l'encéphalopathie spongiforme bovine (15) pour le personnel. Une évaluation plus poussée des effets de la taille ou de l'épaisseur cornéenne sur la sensibilité aux substances corrosives et irritantes serait d'une grande utilité, aussi les utilisateurs sont-ils encouragés à consigner l'âge et/ou le poids estimés des animaux ayant fourni les cornées utilisées dans l'étude.

Collecte et transport des yeux au laboratoire

15. Les yeux sont prélevés par les employés des abattoirs. Afin de minimiser tout endommagement, mécanique ou autre, des yeux, ceux-ci sont énucléés dès que possible après la mort de l'animal. Pour éviter d'exposer les yeux à des substances potentiellement irritantes, les employés de l'abattoir n'utilisent pas de détergent lors du rinçage de la tête de l'animal.

16. Les yeux sont totalement immergés dans une solution saline équilibrée de Hank (HBSS), dans un récipient de taille adaptée, et transportés jusqu'au laboratoire en ayant soin de limiter le plus possible tout endommagement et/ou toute contamination bactérienne. Les yeux étant prélevés au cours de l'abattage, ils risquent d'entrer en contact avec du sang ou d'autres substances biologiques, notamment des bactéries et autres microorganismes. Il importe donc de réduire au minimum le risque de contamination (par exemple en plaçant le récipient contenant les yeux sur de la glace mouillée, et en ajoutant des antibiotiques à la HBSS utilisée pour le transport [100 UI/ml de pénicilline et 100 μg/ml de streptomycine, par exemple]).

▼M2

17. Il faut limiter au maximum l'intervalle de temps entre le prélèvement des yeux et l'utilisation des cornées dans le cadre de l'essai OPCB (l'utilisation a en général lieu le jour même du prélèvement) et démontrer qu'il ne compromet pas les résultats de l'essai. Ces résultats dépendent des critères de sélection des yeux, ainsi que des réponses des témoins positifs et négatifs. Tous les yeux utilisés dans l'essai proviennent d'un lot d'yeux collectés le même jour.

Critères de sélection des yeux utilisés dans la méthode OPCB

18. Une fois parvenus au laboratoire, les yeux sont examinés avec soin pour déceler d'éventuels défauts, tels qu'une opacité avancée, des éraflures ou une néovascularisation. Seules les cornées d'yeux exempts de tout défaut seront utilisées.

19. La qualité de chaque cornée est également évaluée à des stades ultérieurs de l'essai. Les cornées présentant une opacité supérieure à sept unités d'opacité (NB: l'opacitomètre est étalonné en fonction des normes d'opacité utilisées pour définir les unités d'opacité, voir appendice 3) après une période initiale d'équilibrage d'une heure sont écartées.

20. Chaque lot de traitement (substance d'essai et témoins négatifs et positifs) est composé de trois yeux au minimum. L'essai OPCB nécessite trois cornées servant de témoins négatifs. Toutes les cornées étant prélevées sur le globe oculaire entier puis placées dans les chambres du porte-cornée, les manipulations peuvent entraîner d'éventuels artefacts sur les valeurs de l'opacité et de la perméabilité cornéennes de chaque élément (y compris le témoin négatif). Aussi, les valeurs d'opacité et de perméabilité mesurées sur les cornées témoins négatives servent-elles à corriger les valeurs d'opacité et de perméabilité cornéennes des spécimens et des témoins traités positifs lors du calcul du score d'irritation in vitro.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation des yeux

21. Des cornées exemptes de tout défaut sont découpées en conservant un bord de 2 à 3 mm de sclérotique destiné à faciliter les manipulations ultérieures, et en prenant soin de ne pas endommager l'épithélium et l'endothélium cornéens. Les cornées isolées sont placées dans des porte-cornées spécialement conçus à cet effet, qui se composent de deux compartiments, antérieur et postérieur, respectivement en contact avec les faces épithéliale et endothéliale de la cornée. Il convient de remplir jusqu'à débordement ces deux chambres d'un milieu essentiel minimum de Eagle (MEM) préalablement chauffé (en commençant par la chambre postérieure), en évitant toute formation de bulles d'air. L'appareil est ensuite équilibré à une température de 32 ± 1 °C pendant une heure au moins, afin que les cornées s'équilibrent avec le milieu et atteignent une activité métabolique aussi proche de la normale que possible (la température de la surface cornéenne in vivo est d'environ 32 °C).

22. Après la période d'équilibrage, un nouveau MEM préalablement chauffé est ajouté dans les deux chambres, et une première mesure d'opacité est effectuée pour chaque cornée. Les cornées présentant une altération macroscopique des tissus (éraflures, pigmentation ou néovascularisation, par exemple) ou une opacité supérieure à 7 unités d'opacité sont écartées. L'opacité moyenne de toutes les cornées équilibrées est calculée. Au moins trois cornées présentant des valeurs d'opacité proches de la valeur médiane de toutes les cornées sont sélectionnées pour servir de témoins négatifs (ou témoins de solvant). Les cornées restantes sont ensuite réparties entre le lot de traitement et celui des témoins positifs.

▼M2

23. La capacité calorifique de l'eau étant supérieure à celle de l'air, l'eau procure des conditions de température plus stables pour l'incubation. Aussi est-il recommandé de plonger le porte-cornée dans un bain d'eau pour maintenir son contenu à 32 ± 1°C. Toutefois, il est également possible d'utiliser des incubateurs à air, à condition d'assurer la stabilité de la température (en chauffant au préalable les porte-cornées et le milieu, par exemple).

Application de la substance d'essai

24. Deux protocoles d'application différents sont utilisés, l'un pour les liquides et les tensioactifs (solides ou liquides), et l'autre pour les solides non tensioactifs.

25. Les liquides sont testés non dilués, tandis que les tensioactifs le sont à une concentration de 10 % en masse volumique dans une solution de chlorure de sodium à 0,9 %, d'eau distillée ou d'un autre solvant dont l'absence d'effets indésirables sur le système d'essai a été démontrée. Les semi-solides, crèmes et cires sont généralement testés en tant que liquides. Il conviendra de justifier de façon appropriée l'utilisation de tout autre taux de dilution. Les cornées sont ensuite exposées aux liquides ou tensioactifs pendant 10 minutes. L'utilisation d'une autre durée d'exposition devra être scientifiquement justifiée.

26. Les solides non tensioactifs sont généralement testés sous forme de solutions ou de suspensions à une concentration de 20 % dans une solution de chlorure de sodium à 0,9 %, d'eau distillée ou d'un autre solvant dont l'absence d'effets indésirables sur le système d'essai a été démontrée. Dans certaines circonstances et uniquement si cela est justifié scientifiquement, les solides peuvent aussi être testés purs par application directe sur la surface cornéenne, selon la méthode en chambre ouverte (voir paragraphe 29). Les cornées sont exposées aux solides pendant quatre heures, mais comme pour les liquides et les tensioactifs, des durées d'exposition différentes sont possibles moyennant une justification scientifique appropriée.

27. Différentes méthodes d'application peuvent être utilisées, en fonction de la nature physique et des caractéristiques chimiques des substances d'essai (solides, liquides, liquides visqueux ou non visqueux, par exemple). Il est très important que la substance d'essai recouvre convenablement la surface épithéliale puis soit correctement retirée durant les étapes de rinçage. Il conviendra généralement d'utiliser la méthode en chambre fermée pour les substances d'essai liquides non visqueuses ou légèrement visqueuses, tandis que la méthode en chambre ouverte sera privilégiée pour les substances d'essai semi-visqueuses et visqueuses et pour les solides purs.

28. Dans la méthode en chambre fermée, une quantité de substance d'essai suffisante pour recouvrir la face épithéliale de la cornée (750 µl) est introduite dans la chambre antérieure par les trous de dosage situés sur la face supérieure de celle-ci. Les trous sont ensuite occultés à l'aide de capuchons durant la durée d'exposition. Il importe de s'assurer que chaque cornée est exposée à la substance d'essai pendant la durée qui convient.

29. Dans la méthode en chambre ouverte, la goupille de fermeture et la fenêtre en verre de la chambre antérieure sont retirées avant l'application. La substance d'essai ou témoin (750 µl, ou une quantité suffisante pour recouvrir entièrement la cornée) est directement appliquée sur la surface épithéliale cornéenne à l'aide d'une micropipette. Si la substance d'essai est difficile à pipetter, il est possible d'utiliser une pipette à déplacement positif qui permet un dosage plus précis. L'embout de la pipette à déplacement positif est inséré dans l'embout distributeur de la seringue, de manière à ce que la substance puisse être chargée dans la pipette sous pression. Il convient ensuite de pousser le piston de la seringue tout en tirant simultanément celui de la pipette. Si des bulles d'air se forment dans l'embout de la pipette, il faut alors retirer la substance d'essai (en l'expulsant) et répéter le processus jusqu'à ce qu'aucune bulle d'air n'apparaisse au moment du remplissage de la pipette. Il est possible d'utiliser si nécessaire une seringue normale (sans aiguille), ce qui permet de mesurer un volume précis de substance d'essai et de l'appliquer plus facilement sur la surface épithéliale de la cornée. Après le dosage, la fenêtre en verre est replacée sur l'ouverture de la chambre antérieure afin de recréer un système fermé.

▼M2

Incubation post-exposition

30. Après la période d'exposition, la substance d'essai, ou la substance témoin négative ou positive, est retirée de la chambre antérieure et l'épithélium est rincé au moins trois fois (ou jusqu'à ce qu'aucune trace de la substance d'essai ne soit plus visible) au moyen d'un MEM contenant du rouge de phénol. Le rinçage est effectué à l'aide d'un milieu contenant du rouge de phénol, dont le changement de couleur permet de déterminer l'efficacité du rinçage des substances acides ou alcalines. Il convient de laver à nouveau les cornées si, après trois rinçages, le rouge de phénol est encore altéré (jaune ou violet) ou si la substance d'essai est toujours visible. Une fois le milieu débarrassé de la substance, les cornées subissent un dernier rinçage avec un MEM sans rouge de phénol, ce qui permet de s'assurer que la chambre antérieure est débarrassée de tout rouge de phénol avant la mesure d'opacité. La chambre antérieure est ensuite à nouveau remplie d'un MEM neuf sans rouge de phénol.

31. Pour les liquides et les tensioactifs, les cornées sont incubées après rinçage pendant deux heures supplémentaires à 32 ± 1 °C. Il peut être utile, dans certaines circonstances (déterminées au cas par cas), de prévoir une durée d'incubation post-exposition plus longue. Les cornées sur lesquelles des solides ont été appliqués sont soigneusement rincées après la période d'exposition de quatre heures, et ne requièrent pas d'incubation supplémentaire.

32. Au terme de la période d'incubation post-exposition pour les liquides et les tensioactifs, et au terme de la période d'exposition de quatre heures pour les solides non tensioactifs, les degrés d'opacité et de perméabilité de chaque cornée sont enregistrés. En outre, chaque cornée fait l'objet d'un examen visuel et les observations pertinentes sont consignées (exfoliation des tissus, résidus de substance d'essai ou opacité non uniforme, par exemple). Ces observations peuvent s'avérer importantes car elles peuvent se traduire par des variations de lecture de l'opacitomètre.

Substances témoins

33. Des témoins négatifs ou des témoins de solvant/véhicule ainsi que des témoins positifs sont inclus en parallèle dans chaque expérience.

34. Lorsqu'une substance liquide non diluée est soumise à l'essai, il convient d'inclure dans la méthode d'essai OPCB une substance témoin négatif concurrente (solution de chlorure de sodium à 0,9 % ou eau distillée, par exemple) afin de détecter des changements non intrinsèques au système d'essai et de fournir un point de référence pour les critères d'évaluation de l'essai. Cette méthode permet également de garantir que les conditions de l'essai n'entraînent aucune réaction d'irritation indésirable.

35. Lorsqu'un liquide dilué, un tensioactif ou un solide est soumis à l'essai, il convient d'inclure dans la méthode d'essai OPCB un lot témoin de solvant/véhicule concurrent afin de détecter des changements non intrinsèques au système d'essai et de fournir un point de référence pour les critères d'évaluation de l'essai. On utilisera uniquement des solvants/véhicules dont l'absence d'effets indésirables sur le système d'essai a été démontrée.

36. Chaque expérience comprend une substance irritante pour les yeux connue en tant que témoin positif, afin de vérifier l'induction d'une réponse appropriée. La méthode d'essai OPCB étant utilisée ici pour mettre en évidence des substances corrosives ou fortement irritantes, le témoin positif servant de référence est idéalement une substance entraînant une réaction d'irritation importante dans le cadre de cette méthode. Cependant, afin de pouvoir évaluer la variabilité des réponses du témoin positif dans le temps, l'ampleur des effets irritants ne devra pas être excessive.

37. Pour les substances d'essai liquides, les témoins positifs peuvent être composés de diméthylformamide ou d'hydroxyde de sodium à 1 %, par exemple. Pour les substances d'essai solides, les témoins positifs peuvent être composés d'imidazole à 20 % (en masse volumique) dans une solution de chlorure de sodium à 0,9 %, par exemple.

▼M2

38. Les substances étalons sont utiles pour évaluer le potentiel d'irritation oculaire de produits chimiques inconnus d'une classe chimique ou d'une catégorie de produits spécifique, ou pour évaluer le potentiel d'irritation relatif d'une substance irritante pour les yeux au sein d'une plage spécifique de réponses.

Effets mesurés

39. L'opacité est déterminée par la quantité de lumière traversant la cornée. L'opacité de la cornée est mesurée de manière quantitative à l'aide d'un opacitomètre, qui donne des valeurs d'opacité situées sur une échelle continue.

40. La perméabilité est déterminée par la quantité de fluorescéine sodique pénétrant la totalité des couches cellulaires de la cornée (de l'épithélium sur la face externe de la cornée à l'endothélium sur sa face interne). Un volume de 1 ml de solution de fluorescéine sodique (respectivement 4 ou 5 mg/ml lors d'essais portant sur des liquides et des tensioactifs ou sur des solides non tensioactifs) est introduit dans la chambre antérieure du porte-cornée, en contact avec la face épithéliale de la cornée, tandis que la chambre postérieure, en contact avec la face endothéliale, est remplie d'un nouveau MEM. Le porte-cornée est ensuite incubé en position horizontale pendant 90 ± 5 min à une température de 32 ± 1 °C. La quantité de fluorescéine sodique passant dans la chambre postérieure est mesurée quantitativement par spectrophotométrie UV-visible. Les mesures spectrophotométriques évaluées à 490 nm sont enregistrées en tant que valeurs de densité optique (DO_{490}) ou d'absorbance, mesurées sur une échelle continue. La perméabilité à la fluorescéine est déterminée à l'aide des valeurs de DO_{490} données par un spectrophotomètre visible utilisant un trajet optique standard de 1 cm.

41. Il est également possible d'utiliser un lecteur de plaques de microtitration à 96 puits, à condition: i) de pouvoir définir l'intervalle linéaire du lecteur de plaque servant à déterminer les valeurs de la DO_{490} de la fluorescéine; et ii) d'utiliser le bon volume d'échantillons de fluorescéine sur la plaque à 96 puits afin d'obtenir des valeurs de la DO_{490} équivalentes au trajet optique standard de 1 cm (ce qui peut nécessiter de remplir entièrement les puits [généralement 360 µl]).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

42. Une fois que les valeurs d'opacité et de perméabilité moyenne (DO_{490}) ont été corrigées de l'opacité de fond et des valeurs DO_{490} de perméabilité des témoins négatifs, l'opacité moyenne et les valeurs DO_{490} de perméabilité moyenne pour chaque lot de traitement sont combinées dans une formule établie empiriquement pour calculer, comme suit, le score d'irritation in vitro (SIIV) de chaque lot de traitement:

$$SIIV = \text{valeur moyenne d'opacité} + (15 \times \text{valeur } DO_{490} \text{ de perméabilité moyenne})$$

D'après Sina et al. (16), cette formule a été établie au cours d'études intra et interlaboratoires. Les données générées pour une série de 36 composés dans le cadre d'une étude interlaboratoires ont été soumises à une analyse à variables multiples afin de déterminer l'équation du meilleur ajustement entre les données in vivo et in vitro. Cette analyse a été réalisée par des scientifiques travaillant dans deux entreprises distinctes, qui ont obtenu des équations pratiquement identiques.

43. Les valeurs d'opacité et de perméabilité sont également évaluées de manière indépendante afin de déterminer si une substance d'essai a provoqué une corrosion ou une forte irritation pour un seul des deux critères (voir «Critères de décision»).

▼M2

Critères de décision

44. Une substance induisant un SIIV ≥ 55,1 est définie comme corrosive ou fortement irritante. Comme indiqué au paragraphe 1, s'il n'est pas démontré que la substance d'essai est corrosive ou fortement irritante pour l'œil, il convient de mener des essais complémentaires à des fins de classification et d'étiquetage. La méthode d'essai OPCB présente une précision d'ensemble comprise entre 79 % (113/143) et 81 % (119/147), un taux de faux positifs allant de 19 % (20/103) à 21 % (22/103) et un taux de faux négatifs allant de 16 % (7/43) à 25 % (10/40), en comparaison avec les données de la méthode d'essai in vivo sur les yeux de lapin classées selon les systèmes de classification de l'EPA (1), de l'UE (2) ou du SGH (3). Si l'on exclut de la base de données les substances relevant de certaines classes chimiques (alcools, cétones) ou physiques (substances solides), la précision de la méthode OPCB au regard des systèmes de classification de l'UE, de l'EPA et du SGH va de 87 % (72/83) à 92 % (78/85), le taux de faux positifs de 12 % (7/58) à 16 % (9/56), et le taux de faux négatifs de 0 % (0/27) à 12 % (3/26).

45. Même si une substance d'essai n'est pas classée comme corrosive ou fortement irritante pour l'œil, les données de la méthode d'essai OPCB peuvent servir, en association avec des résultats d'essais in vivo sur des yeux de lapin ou d'un autre test in vitro dûment validé, à évaluer plus en profondeur l'utilité et les limites de la méthode OPCB pour la détection des substances faiblement irritantes ou non irritantes (un document d'orientation sur l'utilisation de méthodes d'essai de toxicité oculaire in vitro est en cours d'élaboration).

Critères d'acceptation de l'étude

46. Un essai est considéré comme acceptable si le témoin positif présente un SIIV compris dans un intervalle de deux écarts-types autour de la moyenne historique actuelle, qui est mise à jour au moins tous les trois mois, ou chaque fois qu'un essai acceptable est mené dans des laboratoires conduisant peu fréquemment (c'est-à-dire moins d'une fois par mois) ce type d'étude. Les réponses du témoin négatif ou du témoin de solvant/véhicule doivent donner des valeurs d'opacité et de perméabilité situées en deçà des limites maximales établies pour les valeurs d'opacité et de perméabilité de fond des cornées bovines traitées avec les témoins négatifs ou les témoins de solvant/véhicule correspondants.

Rapport d'essai

47. Le rapport d'essai contient les renseignements suivants, pour autant qu'ils présentent un intérêt pour l'étude:

Substances d'essai et témoins

Nom(s) chimique(s), par exemple nom de la structure chimique utilisé par le Chemical Abstracts Service (CAS), suivi d'autres noms, s'ils sont connus;

Numéro d'enregistrement CAS (RN), s'il est connu;

Pureté et composition de la substance ou du mélange (en pourcentage pondéral), dans la mesure où cette information est disponible;

Propriétés physico-chimiques (telles que l'état physique, la volatilité, le pH, la stabilité, la classe chimique, l'hydrosolubilité) utiles pour la conduite de l'étude;

Le cas échéant, traitement des substances d'essai et témoins avant l'essai (par exemple, chauffage, broyage);

Stabilité (si elle est connue).

▼**M2**

Renseignements relatifs au commanditaire et à l'installation d'essai:

Nom et adresse du commanditaire, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude;

Provenance des yeux (c'est-à-dire de l'établissement auprès duquel ils ont été recueillis);

Conditions de stockage et de transport des yeux (par ex., date et heure de la collecte des yeux, délai avant le début de l'essai, moyen de transport et conditions de température, antibiotiques utilisés le cas échéant);

Dans la mesure du possible, caractéristiques spécifiques des animaux sur lesquels les yeux ont été prélevés (par ex., âge, sexe et poids de l'animal donneur).

Justification du choix de la méthode d'essai et du mode opératoire

Intégrité de la méthode d'essai

Mode opératoire utilisé pour assurer l'intégrité (précision et fiabilité) de la méthode d'essai au cours du temps (par exemple essai périodique des substances d'épreuve de compétence, utilisation de données antérieures de témoins positifs et négatifs).

Critères d'acceptabilité de l'essai

Intervalles de valeurs acceptables pour les témoins positifs et négatifs concurrents, d'après les données historiques;

Le cas échéant, intervalles de valeurs acceptables pour les témoins étalons concurrents, d'après les données historiques.

Conditions de l'essai

Description du système d'essai utilisé;

Type de porte-cornée utilisé;

Informations sur l'étalonnage des appareils utilisés pour mesurer l'opacité et la perméabilité (par ex., opacitomètre et spectrophotomètre);

Informations sur les cornées bovines utilisées, notamment appréciation de leur qualité;

Détails sur le mode opératoire d'essai utilisé;

Concentration(s) des substances d'essai utilisées;

Description de toutes les modifications du mode opératoire de l'essai;

Référence aux données historiques du modèle (par exemple, témoins positifs et négatifs, substances d'épreuves de compétence, substances étalons);

Description des critères d'évaluation utilisés.

Résultats

Présentation sous forme de tableau des résultats de chaque échantillon d'essai (par ex., valeurs de l'opacité et de la DO_{490} et SIIV calculé pour la substance d'essai et les témoins positifs, négatifs et étalons [si inclus], y compris les données des essais répétés, le cas échéant, et la moyenne ± écart type pour chaque essai);

Description des autres effets observés.

Discussion des résultats

Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

▼M2

(2) Règlement (CE) nº 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) nº 1907/2006. JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.

(3) Nations Unies (ONU) (2007). Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), deuxième édition révisée, Nations unies, New York et Genève, 2007. Disponible à l'adresse suivante:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_f.html]

(4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Disponible à l'adresse suivante:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(5) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible à l'adresse suivante:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(6) Règlement (CE) nº 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) nº 793/93 du Conseil et le règlement (CE) nº 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission. JO L 396 du 30.12.2006, p. 1.

(7) OCDE (2002). Ligne directrice 405. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux. Disponible à l'adresse suivante:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.htm l]

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible à l'adresse suivante:

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponible à l'adresse suivante:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM)

▼**M2**

(11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponible à l'adresse suivante:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

(13) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.

(17) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Disponible à l'adresse suivante:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Disponible à l'adresse suivante:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

Appendice 1

DÉFINITIONS

Précision: degré de concordance entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. La précision constitue une mesure de la performance de la méthode d'essai et un aspect de sa «pertinence». Ce terme est souvent utilisé de façon interchangeable avec «concordance» pour désigner la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai.

Substance étalon: substance utilisée en tant que référence, pour la comparaison avec une substance d'essai. Une substance étalon présente les propriétés suivantes: i) provient d'une ou de plusieurs sources constantes et fiables; ii) présente une similitude structurale et fonctionnelle avec la classe des substances soumises à l'essai; iii) possède des caractéristiques physiques/chimiques connues; iv) est accompagnée de données confirmant ses effets connus, et v) a une puissance connue dans la fourchette de réponses désirées.

Cornée: partie transparente située à l'avant du globe oculaire, recouvrant l'iris et la pupille et laissant pénétrer la lumière vers l'intérieur de l'œil.

Opacité cornéenne: mesure de l'étendue du caractère opaque de la cornée suite à son exposition à une substance d'essai. Une augmentation de l'opacité cornéenne indique un endommagement de la cornée. L'opacité peut être évaluée de manière subjective, par exemple lors du test de Draize réalisé sur les yeux de lapin, ou de manière objective à l'aide d'un instrument de mesure tel qu'un «opacitomètre».

Perméabilité cornéenne: Mesure quantitative de l'endommagement de l'épithélium cornéen via la détermination de la quantité de fluorescéine sodique traversant toutes les couches cellulaires de la cornée.

Catégorie 1 de l'EPA: effet corrosif (destruction irréversible du tissu oculaire) ou complication cornéenne ou irritation persistant plus de 21 jours (1).

Catégorie R41 de l'UE: lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'une substance d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application (2).

Taux de faux négatifs: proportion de substances positives faussement déclarées négatives par une méthode d'essai. C'est un indicateur de la performance de la méthode d'essai.

Taux de faux positifs: proportion des substances négatives faussement déclarées positives par une méthode d'essai. C'est un indicateur de la performance de la méthode d'essai.

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques): système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (3).

▼M2

Catégorie 1 du SGH: lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'une substance d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application (3).

Danger: propriété intrinsèque d'un agent ou situation susceptible de provoquer des effets néfastes lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-)population est exposé(e) à cet agent.

Score d'irritation *in vitro* (SIIV): formule établie empiriquement et utilisée dans les essais OPCB, dans laquelle les valeurs d'opacité moyenne et de perméabilité moyenne pour chaque lot de traitement sont combinées pour obtenir le score in vitro unique de chaque lot de traitement. SIIV = valeur moyenne d'opacité + (15 x valeur moyenne de perméabilité).

Témoin négatif: réplicat non traité contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec la substance d'essai et les autres échantillons témoins afin de déterminer si le solvant interagit avec le système d'essai.

Substance non irritante: substance qui n'est pas classée comme irritant oculaire dans la catégorie I, II ou III de l'EPA, la catégorie R41 ou R36 de l'UE, ou la catégorie 1, 2A ou 2B du SGH.

Substance corrosive pour l'œil: a) substance provoquant des lésions irréversibles des tissus oculaires; b) substance classée comme irritant oculaire dans la catégorie 1 du SGH, la catégorie 1 de l'EPA ou la catégorie R41 de l'UE (1) (2) (3).

Substance irritante pour l'œil: a) substance provoquant une modification réversible de l'œil suite à une application sur la face antérieure de l'œil; b) substance classée comme irritant oculaire dans la catégorie II ou III de l'EPA, la catégorie R36 de l'UE ou la catégorie 2A ou 2B du SGH (1) (2) (3).

Substance fortement irritante pour l'œil: a) substance provoquant des lésions des tissus oculaires suite à une application sur la face antérieure de l'œil, qui ne sont pas résorbées dans les 21 jours suivant le traitement ou entraînent une dégradation sévère de la vue; b) substance classée comme irritant oculaire dans la catégorie 1 du SGH, la catégorie 1 de l'EPA ou la catégorie R41 de l'UE (1) (2) (3).

Opacitomètre: Instrument servant à mesurer l'«opacité cornéenne» en évaluant la quantité de lumière transmise à travers la cornée. En général, cet instrument est composé de deux compartiments, chacun disposant de sa propre source lumineuse et d'une cellule photoélectrique. L'un des compartiments est utilisé pour la cornée traitée tandis que l'autre sert à étalonner l'instrument et à le mettre à zéro. La lumière d'une lampe halogène est dirigée à travers un compartiment témoin (chambre vide, sans vitre ni liquide) vers une cellule photoélectrique, et comparée à la lumière envoyée à travers le compartiment expérimental, qui abrite la chambre contenant la cornée, jusqu'à une cellule photoélectrique. La lumière transmise par les deux cellules photoélectriques est ensuite comparée, et une valeur chiffrée d'opacité s'affiche sur un écran numérique.

Témoin positif: réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, et traité avec une substance induisant notoirement une réponse positive. Afin de pouvoir évaluer la variabilité des réponses du témoin positif dans le temps, la sévérité de la réponse ne devra pas être excessive.

▼M2

Fiabilité: mesure de la reproductibilité de l'essai mis en œuvre, au sein d'un laboratoire et entre des laboratoires, au cours du temps, en utilisant le même mode opératoire. Elle est évaluée par calcul de la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoires et de la répétabilité intralaboratoire.

Témoin de solvant/véhicule: échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou véhicule utilisé pour tester les échantillons témoins traités ou non avec la substance d'essai afin de déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec la substance d'essai dissoute dans le même solvant ou véhicule. Testé avec un témoin négatif concurrent, cet échantillon indique également si le solvant ou véhicule interagit avec le système d'essai.

Stratégie d'essai séquentielle: démarche expérimentale séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur une substance d'essai dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à une procédure fondée sur la force probante des données pour déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification des dangers, avant de passer à l'étape suivante. Si le potentiel d'irritation d'une substance d'essai peut être déterminé sur la base des informations existantes, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire. Dans le cas contraire, une procédure expérimentale progressive de type séquentiel sur des animaux est alors lancée jusqu'à ce qu'une classification sans équivoque puisse être effectuée.

Méthode d'essai validée: méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés.

Force probante des données: prise en compte des forces et des faiblesses de divers éléments d'information en vue d'aboutir à une conclusion concernant le danger potentiel d'une substance et d'étayer cette conclusion.

▼M2

Appendice 2

Substances d'épreuve de compétence pour la méthode d'essai OPCB

Avant l'utilisation en routine d'une méthode d'essai conforme à la présente méthode, les laboratoires peuvent souhaiter faire la preuve de leurs compétences techniques en déterminant correctement la catégorie de corrosivité oculaire des 10 substances recommandées dans le tableau 1. Ces substances ont été sélectionnées de façon à représenter la gamme des réactions locales d'irritation/de corrosion oculaire, sur la base des résultats de l'essai in vivo sur œil de lapin (LD 405) [c'est-à-dire les catégories 1, 2A, 2B ou Non classé du SGH des Nations Unies (3) (7)]. Toutefois, compte tenu de l'utilité validée de ces essais (uniquement mise en évidence des substances corrosives/fortement irritantes pour l'œil), seuls deux résultats expérimentaux obtenus à des fins de classification (substance corrosive/fortement irritante ou substance non corrosive/faiblement irritante) permettent de démontrer les compétences des laboratoires. Les autres critères de sélection retenus ont trait à la disponibilité des substances dans le commerce, à la disponibilité de données de référence in vivo de bonne qualité, et à l'existence de données de bonne qualité issues des deux méthodes d'essai in vitro qui font l'objet de lignes directrices. Pour cette raison, les substances irritantes ont été sélectionnées dans la liste recommandée par l'ICCVAM de 122 substances de référence pour la validation de méthodes d'essai de toxicité oculaire in vitro [voir appendice H: Substances de référence recommandées par l'ICCVAM (5)]. Les données de référence sont disponibles dans les documents de l'ICCVAM (*Background Review Documents*) pour les méthodes OPCB et OPI (œil de poulet isolé) (17) (18).

Tableau 1

Substances recommandées pour la démonstration des compétences techniques des laboratoires au regard de la méthode d'essai OPCB

Substance	Nº CAS	Classe chimique (1)	Forme physique	Classification *in vivo* (2)	Classification *in vitro* (3)
Chlorure de benzalconium (5 %)	8001-54-5	Composé d'onium	Liquide	Catégorie 1	Corrosif/fortement irritant
Chlorhexidine	55-56-1	Amine, Amidine	Solide	Catégorie 1	Corrosif/fortement irritant
Acide dibenzoyl-L-tartrique	2743-38-6	Acide carboxylique, ester	Solide	Catégorie 1	Corrosif/fortement irritant
Imidazole	288-32-4	Hétérocycle	Solide	Catégorie 1	Corrosif/fortement irritant
Acide trichloroacétique (30 %)	76-03-9	Acide carboxylique	Liquide	Catégorie 1	Corrosif/fortement irritant
Chlorure de 2,6-dichlorobenzoyle	4659-45-4	Halogénure d'acyle	Liquide	Catégorie 2A	Non corrosif/Faiblement irritant
2-méthylacétoacétate d'éthyle	609-14-3	Cétone, Ester	Liquide	Catégorie 2B	Non corrosif/Faiblement irritant
Nitrate d'ammonium	6484-52-2	Sel inorganique	Solide	Catégorie 2A	Non corrosif/Faiblement irritant

▼**M2**

Substance	Nº CAS	Classe chimique (1)	Forme physique	Classification *in vivo* (2)	Classification *in vitro* (3)
Glycérol	56-81-5	Alcool	Liquide	Non étiqueté	Non corrosif/Faiblement irritant
n-Hexane	110-54-3	Hydrocarbure (acyclique)	Liquide	Non étiqueté	Non corrosif/Faiblement irritant

Abréviations: Nº CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstract Service

(1) Les classes de produits chimiques ont été attribuées à chaque substance testée à l'aide d'un système de classification normalisé, fondé sur le système de classification du *Medical Subject Headings* (MeSH) de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis d'Amérique (disponible sur http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) D'après les résultats de l'essai in vivo sur œil de lapin (Ligne directrice de l'OCDE nº 405) et en utilisant le SGH des NU (3)(7).

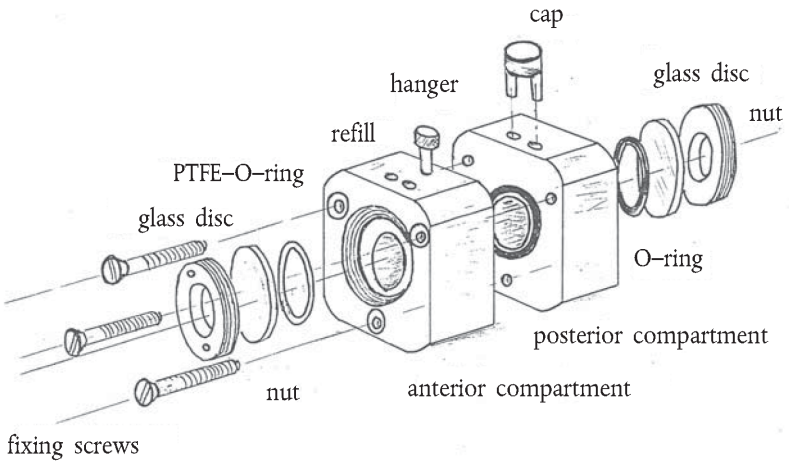
(3) D'après les résultats des méthodes OPCB et OPI.

▼M2

Appendice 3

PORTE-CORNÉE POUR LA MÉTHODE OPCB

1. Les porte-cornées pour la méthode OPCB sont fabriqués à partir d'un matériau inerte (polypropylène par exemple). Ils se composent de deux parties (une chambre antérieure et une chambre postérieure) et possèdent deux chambres internes cylindriques identiques. Chaque chambre a une contenance de 5 ml et est fermée par une vitre, à travers laquelle les mesures d'opacité sont lues. Chacune des chambres internes mesure 1,7 cm de diamètre et 2,2 cm de profondeur ([1]). Un joint torique situé au niveau de la chambre postérieure empêche toute fuite. La cornée est placée face endothéliale dessous, sur le joint torique de la chambre postérieure, et la chambre antérieure est placée du côté épithélial de la cornée. Les chambres sont maintenues en place par trois vis en acier inoxydable situées sur les bordures extérieures du porte-cornée. Chaque chambre comporte à son extrémité une vitre amovible permettant d'accéder facilement à la cornée. Un joint torique placé entre la vitre et la chambre empêche toute fuite. L'introduction et le vidage du milieu et des composés d'essai se font par deux trous situés sur la face supérieure de chaque chambre. Pendant le traitement et les périodes d'incubation, ces trous sont obturés par des capuchons en caoutchouc.



Glossaire

Glass disc: Disque de verre

PTFE-O-ring: Joint torique en PTFE

Refill: Orifice de remplissage

Hanger: Crochet

Cap: Capuchon

Nut: Écrou

O-ring: Joint torique

Posterior compartment: Compartiment postérieur

Anterior compartment: Compartiment antérieur

Fixing screws: Vis de fixation

([1]) Les dimensions indiquées ici sont celles d'un porte-cornée utilisé pour des bovins âgés de 12 à 60 mois. Pour des animaux âgés de 6 à 12 mois, le porte-cornée est conçu de telle sorte que chaque chambre ait une contenance de 4 ml et que chacune des chambres internes mesure 1,5 cm de diamètre et 2,2 cm de profondeur. Pour tout porte-cornée nouvellement conçu, il est essentiel que le rapport entre la surface cornéenne exposée et le volume de la chambre postérieure soit le même que celui du porte-cornée classique. Cette condition est indispensable pour garantir que les valeurs de perméabilité sont correctement déterminées pour le calcul du SIIV par la formule donnée.

▼**M2**

L'OPACITOMÈTRE

2. L’opacitomètre est un appareil permettant de mesurer la transmission de la lumière. La lumière d’une lampe halogène est dirigée à travers un compartiment témoin (chambre vide, sans vitre ni liquide) vers une cellule photoélectrique, et comparée à la lumière envoyée à travers le compartiment expérimental, qui abrite la chambre contenant la cornée, jusqu'à une cellule photoélectrique. La lumière transmise par les deux cellules photoélectriques est ensuite comparée, et une valeur chiffrée d'opacité s’affiche sur un écran numérique. Les unités d’opacité sont alors définies.

3. L’opacitomètre fournit une réponse linéaire sous la forme d'une plage de mesures d’opacité couvrant les seuils utilisés pour les différentes classifications décrites par le modèle de prévision (c’est-à-dire, jusqu’aux seuils déterminant le caractère corrosif/fortement irritant). Afin de garantir des mesures linéaires et précises jusqu’à 75-80 unités d’opacité, il est nécessaire d’étalonner l’opacitomètre à l’aide d’une série de calibreurs. Les calibreurs (plaques opaques de polyester) sont placés à l’intérieur de la chambre d’étalonnage (une chambre de porte-cornée destinée à contenir les calibreurs) et une mesure des calibreurs est réalisée sur l'opacitomètre. La chambre d’étalonnage est conçue pour maintenir les calibreurs approximativement à la même distance de la source lumineuse et de la cellule photoélectrique que celle où se trouveront les cornées lors des mesures d'opacité. L'opacitomètre est tout d'abord étalonné à 0 unité d'opacité en utilisant la chambre d’étalonnage sans calibreur. Trois calibreurs différents sont ensuite placés l’un après l’autre à l’intérieur de la chambre d’étalonnage, et l’opacité est mesurée. Les calibreurs 1, 2 et 3 présentent des mesures d’opacité égales à leur valeur de consigne, soit respectivement 75, 150 et 225 unités d’opacité, ± 5 %.

▼M2

B. 48 MÉTHODE D'ESSAI SUR ŒIL DE POULET ISOLÉ POUR LA MISE EN ÉVIDENCE DES SUBSTANCES CORROSIVES ET FORTEMENT IRRITANTES POUR L'ŒIL

INTRODUCTION

1. La méthode d'essai sur œil de poulet isolé (OPI) est une méthode d'essai in vitro pouvant être utilisée, dans certaines circonstances et compte tenu de ses limites particulières, pour classer des substances et des mélanges dans la catégorie des produits «corrosifs et fortement irritants pour l'œil» (1) (2) (3). Aux fins de la présente méthode d'essai, les substances et mélanges fortement irritants sont ceux qui induisent des lésions oculaires qui persistent pendant au moins 21 jours après administration chez le lapin. Le remplacement intégral par l'OPI de la méthode de l'essai sur œil de lapin in vivo n'a pas été validé, mais l'utilisation de l'OPI est recommandée dans le cadre d'une stratégie d'essai séquentielle visant à établir une classification et un étiquetage réglementaires dans un domaine d'application défini (4) (5). Les substances et mélanges d'essai (6) qui répondent positivement dans cet essai peuvent être classés dans la catégorie des produits corrosifs et fortement irritants pour l'œil sans qu'il soit nécessaire de procéder à des essais supplémentaires chez le lapin. En revanche, une substance révélant un résultat négatif à l'issue de l'essai a besoin d'être testée sur des lapins selon une démarche expérimentale de type séquentiel, telle que celle décrite dans la ligne directrice de l'OCDE nº 405 (7) (chapitre B.5 de la présente annexe).

2. L'objectif de la présente méthode d'essai est de décrire les modes opératoires utilisés pour évaluer l'effet potentiel corrosif ou fortement irritant pour l'œil d'une substance d'essai. Cet effet est mesuré par la capacité du produit à induire une toxicité dans un œil de poulet énucléé. Les effets toxiques pour la cornée sont mesurés par i) une estimation qualitative de l'opacité, ii) une estimation qualitative des dommages subis par l'épithélium, fondée sur l'application de fluorescéine sur l'œil (rétention de fluorescéine), iii) une mesure quantitative de l'augmentation d'épaisseur (gonflement), et iv) une évaluation qualitative des dommages morphologiques macroscopiques infligés en surface. L'opacité cornéenne, le gonflement et l'estimation des dommages après exposition à une substance d'essai sont évalués individuellement, puis combinés pour établir une classification d'effet irritant pour l'œil.

3. La méthode OPI a également été utilisée pour tester des substances irritantes pour l'œil qui induisent des lésions guéries en moins de 21 jours, ainsi que des substances non irritantes. Toutefois, la précision et la fiabilité de cette méthode n'ont pas été évaluées de façon formelle pour les substances entrant dans ces catégories.

4. Des définitions sont fournies dans l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES DE LA MÉTHODE

5. La présente méthode d'essai est fondée sur le protocole expérimental de la méthode OPI du Comité de coordination inter-agences sur la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) (8), élaboré à la suite d'une étude de validation internationale (4) (5) (9) à laquelle ont participé le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM), le Centre japonais pour la validation de méthodes alternatives, et le département de toxicologie et pharmacologie appliquée de TNO Quality of Life (Pays-Bas). Le protocole s'appuie sur des informations dérivées de protocoles publiés et de celui qui est actuellement employé par TNO (10) (11) (12) (13) (14).

▼M2

6. Les limites connues de cette méthode d'essai concernent le taux de faux positifs obtenu pour les alcools, et les taux de faux négatifs obtenus pour les matières solides et les tensioactifs (voir paragraphe 47) (4). Si l'on exclut de la base de données les substances relevant de ces classes chimiques et physiques, la précision de la méthode OPI au regard des systèmes de classifications de l'UE, de l'EPA et du SGH se trouve considérablement améliorée (4). Compte tenu de la finalité de cet essai (qui vise exclusivement à détecter les substances corrosives et fortement irritantes pour l'œil), les taux de faux négatifs ne sont pas préoccupants car les substances concernées feront ensuite l'objet d'essais chez le lapin ou d'autres essais in vitro dûment validés, conformément aux exigences de la réglementation, selon une démarche expérimentale séquentielle fondée sur la force probante des données. De surcroît, l'actuelle base de données de validation n'a pas permis de procéder à l'évaluation adéquate de certaines classes de substances chimiques ou de produits (par exemple, les mélanges). Les chercheurs peuvent cependant envisager l'utilisation de cette méthode d'essai pour tous les types de matériel d'essai (y compris les mélanges), auquel cas un résultat positif pourrait être interprété comme révélateur d'un effet corrosif ou fortement irritant pour l'œil. Toutefois, il convient d'interpréter avec précaution les résultats positifs obtenus avec des alcools, compte tenu du risque de surévaluation.

7. Tous les modes opératoires sur l'œil de poulet doivent respecter les réglementations applicables aux installations d'essai et les protocoles de manipulation de matériaux issus de l'homme et de l'animal, comprenant notamment, sans s'y limiter, les tissus et les fluides tissulaires. Le respect des précautions universelles de laboratoire est recommandé (15).

8. Bien qu'elle prenne en compte certains des effets oculaires évalués par la méthode d'essai d'irritation oculaire chez le lapin, et dans une certaine mesure leur degré de gravité, cette méthode d'essai présente toutefois l'inconvénient de ne pas prendre en considération les lésions de la conjonctive et de l'iris. De plus, même si la méthode OPI ne permet pas en soi d'évaluer la réversibilité des lésions cornéennes, il a été proposé, sur la base d'études menées sur l'œil de lapin, d'utiliser une évaluation de la profondeur initiale de la lésion cornéenne pour distinguer les effets réversibles des effets irréversibles (16). Enfin, la méthode d'essai OPI ne permet pas d'évaluer la toxicité systémique potentielle associée à l'exposition oculaire.

9. Les travaux visant à mieux caractériser l'utilité et les limites de la méthode d'essai OPI pour la mise en évidence des substances faiblement irritantes ou non irritantes se poursuivent (voir également paragraphe 48). Les utilisateurs sont également incités à fournir des spécimens et/ou des données aux organismes de validation à des fins d'évaluation formelle des utilisations futures possibles de la méthode d'essai OPI, notamment pour la mise en évidence des substances faiblement irritantes ou non irritantes.

10. Tout laboratoire conduisant cet essai pour la première fois doit utiliser les substances chimiques d'épreuve de compétence mentionnées à l'appendice 2. Il peut utiliser ces substances pour démontrer sa compétence technique en matière d'application de la méthode d'essai OPI préalablement à la soumission des données obtenues avec cet essai à des fins de classification réglementaire des dangers.

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. La méthode d'essai OPI est un modèle organotypique qui permet de maintenir à court terme des yeux de poulet in vitro. Dans cette méthode, les dommages provoqués par la substance d'essai sont évalués par détermination du gonflement cornéen, de l'opacité de la cornée et de sa rétention de fluorescéine. L'observation des deux derniers paramètres est qualitative, alors que l'analyse du gonflement cornéen est quantitative. Chaque mesure est convertie en un score quantitatif qui est utilisé pour calculer un indice d'irritation général, ou fait l'objet d'une catégorisation qualitative qui sert à assigner une classification de substance corrosive et fortement irritante pour l'œil in vitro. L'un ou l'autre de ces résultats peut ensuite être utilisé pour prédire le potentiel d'effet corrosif et fortement irritant pour l'œil d'une substance d'essai in vivo (voir «Critères de décision»).

▼M2

Provenance et âge des yeux de poulet

12. Habituellement, on utilise pour cet essai des yeux prélevés sur des poulets d'abattoir destinés à la consommation humaine, et les animaux de laboratoire sont de ce fait inutiles. Seuls sont utilisés les yeux d'animaux sains, considérés comme propres à intégrer la chaîne alimentaire humaine.

13. Aucune étude contrôlée visant à évaluer l'âge optimal des poulets n'a encore été menée, mais l'âge et le poids des poulets habituellement utilisés dans cette méthode d'essai sont ceux des petits poulets couramment traités dans un abattoir de volailles (à savoir, environ 7 semaines et 1,5 – 2,5 kg).

Collecte et transport des yeux au laboratoire

14. Les têtes sont coupées immédiatement après sédation des poulets, généralement par choc électrique, et incision des cous pour la saignée. Il conviendra de repérer une source locale de poulets proche du laboratoire, afin que le transfert des têtes entre l'abattoir et le laboratoire soit suffisamment rapide pour limiter autant que possible la détérioration et/ou la contamination bactérienne. Il faut réduire au minimum l'intervalle de temps qui sépare la collecte des têtes de poulets et l'utilisation des yeux dans la méthode d'essai OPI (généralement deux heures) et démontrer qu'il ne compromet pas les résultats de l'essai. Ces résultats dépendent des critères de sélection des yeux, ainsi que des réponses des témoins positifs et négatifs. Tous les yeux utilisés dans l'essai proviennent d'un lot d'yeux collectés le même jour.

15. Les yeux étant disséqués au laboratoire, les têtes sont transportées intactes depuis l'abattoir, à température ambiante, dans des boîtes en plastique humidifiées à l'aide de serviettes mouillées d'une solution saline isotonique.

Critères de sélection des yeux utilisés dans la méthode OPI

16. Les yeux dont la coloration initiale par la fluorescéine ou le score d'opacité cornéenne sont élevés après énucléation (> 0,5 dans les deux cas) sont rejetés.

17. Chaque lot de traitement et chaque lot témoin positif parallèle comprend au moins trois yeux. Le lot témoin négatif ou le témoin de solvant (si on utilise un solvant qui n'est pas une solution saline) comprend au moins un œil.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation des yeux

18. Les paupières sont soigneusement excisées en veillant à ne pas endommager la cornée. Pour évaluer rapidement l'intégrité de celle-ci, on applique une goutte de fluorescéine sodique à 2 % (p/v) sur la surface cornéenne pendant quelques secondes, puis on rince avec une solution saline isotonique. Les yeux traités à la fluorescéine sont ensuite examinés au biomicroscope pour vérifier que la cornée n'est pas endommagée (les scores de rétention de fluorescéine et d'opacité cornéenne doivent être $\leq$ 0,5).

19. S'il n'est pas endommagé, l'œil est ensuite énucléé, en veillant à ne pas léser la cornée. Le globe oculaire est tiré hors de l'orbite en maintenant fermement la membrane nictitante à l'aide de pinces chirurgicales, et les muscles de l'œil sont coupés avec des ciseaux courbes à pointes émoussées. Il est important d'éviter d'endommager la cornée par une pression excessive (artéfacts de compression).

20. Lorsque l'œil est retiré de l'orbite, une portion visible du nerf optique doit rester attachée. Une fois retiré de l'orbite, l'œil est placé sur un tampon absorbant et la membrane nictitante et le reste des tissus conjonctifs sont disséqués.

▼M2

21. L'œil énucléé est monté dans un clamp en acier inoxydable, en plaçant la cornée verticalement. Le clamp est ensuite transféré dans une chambre de l'appareil de surfusion (16). Dans l'appareil de surfusion, les clamps sont placés de telle sorte que la totalité de la cornée soit alimentée par le goutte-à-goutte de solution saline isotonique. La température dans les chambres de l'appareil de surfusion est régulée à 32 ± 1,5 °C. L'appendice 3 propose un schéma d'un appareil de surfusion classique et des clamps pour œil, disponibles dans le commerce ou à construire. L'appareil peut être modifié en fonction des besoins du laboratoire (par exemple, pour contenir un nombre d'yeux différent).

22. Une fois placés dans l'appareil de surfusion, les yeux sont à nouveau examinés au biomicroscope afin de s'assurer qu'ils n'ont pas été endommagés lors de la dissection. Il est utile à ce stade de mesurer l'épaisseur de la cornée à son apex, au moyen du dispositif de mesure dont est muni le biomicroscope. Les yeux i) dont la rétention de fluorescéine est > 0,5, ii) dont l'opacité cornéenne est > 0,5 ou iii) qui présentent tout autre signe de lésion doivent être remplacés. Les yeux qui ne sont pas rejetés sur la base de ces critères, mais dont l'épaisseur cornéenne s'écarte de plus de 10 % de la valeur moyenne calculée pour l'ensemble des yeux doivent également être rejetés. La mesure de l'épaisseur cornéenne peut varier en fonction du réglage de la largeur de la fente du biomicroscope, et les examinateurs tiennent compte de cette contrainte en ajustant cette largeur à 0,095 mm.

23. Une fois tous les yeux examinés et admis dans l'étude, ils sont incubés pendant environ 45 à 60 minutes pour leur permettre de s'équilibrer dans le système d'essai avant administration de la substance d'essai. Cette période est suivie des mesures de l'épaisseur et de l'opacité cornéennes au temps zéro (t = 0), qui serviront de mesures de référence. Le score de rétention de la fluorescéine déterminé lors de la dissection sert de mesure de référence pour ce critère d'évaluation.

Application de la substance d'essai

24. Immédiatement après les mesures de référence au temps zéro, l'œil (dans son support) est retiré de l'appareil de surfusion, placé en position horizontale et la substance d'essai est appliquée sur la cornée.

25. Les substances d'essai liquides sont généralement testées sans dilution, mais elles peuvent au besoin être diluées (par exemple, lors d'une étape prévue dans la conception de l'étude). Il est préférable d'utiliser une solution physiologique pour diluer les substances. Il est toutefois possible d'utiliser d'autres solvants en conditions contrôlées, sous réserve de démontrer le bien-fondé de leur utilisation au lieu de la solution physiologique saline.

26. Les substances d'essai liquides sont appliquées sur la cornée de façon à couvrir uniformément la totalité de la surface; le volume habituel est de 0,03 ml.

27. De préférence, les substances solides sont broyées aussi finement que possible au moyen d'un mortier et d'un pilon, ou d'un outil de broyage comparable. La poudre est appliquée sur la cornée de façon à couvrir uniformément la totalité de la surface; la quantité habituelle est de 0,03 g.

28. La substance d'essai (liquide ou solide) est appliquée pendant 10 secondes, puis éliminée par rinçage de l'œil avec une solution saline isotonique (environ 20 ml) à température ambiante. L'œil (dans son support) est ensuite remis dans l'appareil de surfusion dans la position verticale initiale.

Substances témoins

29. Il convient d'inclure des témoins négatifs ou de solvant/véhicule et des témoins positifs en parallèle dans chaque expérience.

▼M2

30. Dans le cas d'essais de liquides purs ou de solides, on utilise une solution saline physiologique comme témoin négatif parallèle dans la méthode d'essai OPI pour détecter des changements non spécifiques dans le système d'essai, et pour vérifier que les conditions de l'essai ne provoquent pas de réponse irritante indésirable.

31. Dans le cas d'essais de liquides dilués, un lot témoin parallèle de solvant/véhicule est inclus dans la méthode d'essai pour détecter des changements non spécifiques dans le système d'essai, et pour vérifier que les conditions de l'essai ne provoquent pas de réponse irritante inappropriée. Comme le mentionne le paragraphe 25, il ne faut utiliser que des solvants ou des véhicules dont l'absence d'effet néfaste sur le système d'essai a été démontrée.

32. Chaque expérience comprend une substance irritante pour les yeux connue en tant que témoin positif permettant de vérifier l'induction d'une réponse appropriée. La méthode d'essai OPI étant utilisée ici pour mettre en évidence des substances corrosives ou fortement irritantes, il convient que le témoin positif soit une substance de référence qui induit une réponse forte dans le cadre de cette méthode. Toutefois, pour pouvoir évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, il ne faut pas que l'ampleur de cette réponse soit excessive. La quantité de données in vitro obtenues pour le témoin positif doit être suffisante pour permettre le calcul d'un intervalle acceptable défini statistiquement. En l'absence de données antérieures adéquates issues de la méthode d'essai OPI pour un témoin positif donné, il peut être nécessaire de mener des études pour obtenir ces informations.

33. L'acide acétique à 10 % ou le chlorure de benzalconium à 5 % sont des exemples de témoins positifs dans les essais de substances d'essai liquides, et l'hydroxyde de sodium ou l'imidazole peuvent jouer ce rôle pour les substances d'essai solides.

34. Les substances étalons sont utiles pour évaluer le potentiel d'irritation oculaire de produits chimiques inconnus d'une classe chimique ou d'une catégorie de produits spécifique, ou pour évaluer le potentiel d'irritation relatif d'une substance irritante pour les yeux au sein d'une plage spécifique de réponses.

Effets mesurés

35. Les cornées traitées sont évaluées avant le traitement et 30, 75, 120, 180, et 240 minutes (± 5 minutes) après le rinçage suivant le traitement. Ces temps d'observation sont en nombre suffisant sur la période de traitement de 4 heures et les intervalles entre les mesures permettent d'effectuer les observations requises sur tous les yeux.

36. Les effets évalués sont l'opacité cornéenne, le gonflement de la cornée et la rétention de fluorescéine, ainsi que les effets morphologiques (par exemple, piqûres ou relâchement de l'épithélium). Tous les effets, à l'exception de la rétention de fluorescéine (qui n'est mesurée que lors du prétraitement et 30 minutes après l'exposition à la substance d'essai), sont mesurés à chacun des temps d'observation indiqués ci-dessus.

37. Il est conseillé de prendre des photographies pour attester l'opacité cornéenne, la rétention de fluorescéine, les effets morphologiques, et, le cas échéant, les observations histopathologiques.

38. Après l'examen final à quatre heures, il est recommandé de conserver les yeux dans un fixateur approprié (par exemple, formol tamponné à pH neutre) en vue d'un éventuel examen histopathologique.

▼**M2**

39. Le gonflement cornéen est déterminé par des mesures d'épaisseur de la cornée réalisées au moyen d'un pachymètre optique monté sur un biomicroscope. Il est exprimé en pourcentage et calculé à partir des mesures d'épaisseur de la cornée, selon la formule suivante:

$$\left[\frac{\textit{épaisseur de la cornée au temps } t \; - \; \textit{épaisseur de la cornée à } t \; = \; 0}{\textit{épaisseur de la cornée à } t \; = \; 0}\right] \times 100$$

40. Le pourcentage moyen de gonflement cornéen pour tous les yeux est calculé à chaque temps d'observation. À partir du score moyen de gonflement cornéen le plus élevé obtenu sur l'ensemble des temps d'observation, un score général de catégorie est attribué à chaque substance d'essai.

41. Le score d'opacité cornéenne est calculé sur la surface de cornée qui est la plus fortement opacifiée. La valeur moyenne d'opacité cornéenne pour tous les yeux est calculée à chaque temps d'observation. À partir du score moyen d'opacité cornéenne le plus élevé obtenu sur l'ensemble des temps d'observation, un score général de catégorie est attribué à chaque substance d'essai (Tableau 1).

Tableau 1

Scores d'opacité cornéenne

Score	Observation
0	Aucune opacité
0,5	Très faible opacité
1	Zones éparses ou diffuses; les détails de l'iris sont nettement visibles
2	Zone translucide facilement discernable; les détails de l'iris sont légèrement occultés
3	Forte opacité cornéenne; aucun détail spécifique de l'iris n'est visible; la taille de la pupille est à peine discernable
4	Opacité cornéenne totale; l'iris est invisible

42. Pour tous les yeux examinés, la valeur moyenne de rétention de la fluorescéine n'est calculée qu'au temps d'observation de 30 minutes, qui est utilisé pour déterminer le score général de catégorie attribué à chaque substance d'essai (Tableau 2).

Tableau 2

Scores de rétention de fluorescéine

Score	Observation
0	Pas de rétention de fluorescéine
0,5	Coloration très mineure de cellules individuelles
1	Coloration de cellules individuelles éparses dans toute la zone traitée de la cornée
2	Coloration dense de foyers de cellules individuelles ou de cellules individuelles confluentes
3	Grandes zones confluentes de cornée retenant la fluorescéine

▼M2

43. Les effets morphologiques comprennent le phénomène de «piqûre» des cellules épithéliales cornéennes, le «relâchement» de l'épithélium, la «rugosité» de la surface cornéenne et «l'adhérence» de la substance d'essai sur la cornée. La gravité de ces effets est variable et ils peuvent être observés simultanément. Leur classification est subjective et dépend de l'interprétation de l'observateur.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation des données

44. Les résultats d'opacité cornéenne, de gonflement de la cornée et de rétention de fluorescéine sont évalués séparément et aboutissent à la détermination d'une catégorie OPI par effet mesuré. Ces catégories sont ensuite combinées en une classification de l'effet irritant pour chaque substance d'essai.

Critères de décision

45. Après évaluation de chacun des effets, des catégories OPI peuvent être assignées à la substance selon un barème prédéterminé. L'interprétation de l'épaisseur cornéenne (Tableau 3), de l'opacité de la cornée (Tableau 4) et de la rétention de fluorescéine (Tableau 5) au moyen de 4 catégories OPI, suit la progression suivante:

Tableau 3

Critères de classification OPI pour l'épaisseur cornéenne

Gonflement moyen de la cornée (%) (*)	Catégorie OPI
0 à 5	I
> 5 à 12	II
> 12 à 18 (> 75 min après traitement)	II
> 12 à 18 (≤ 75 min après traitement)	III
> 18 à 26	III
> 26 à 32 (> 75 min après traitement)	III
> 26 à 32 (≤ 75 min après traitement)	IV
> 32	IV

(*) Les scores de gonflement cornéen ne sont applicables que si l'épaisseur est mesurée au moyen d'un biomicroscope Haag-Streit BP900 équipé d'un dispositif de mesure de profondeur nº I avec un réglage de largeur de fente à 9½, soit 0,095 mm. Les utilisateurs tiennent compte du fait que les mesures d'épaisseur de cornée par un biomicroscope varient en fonction du réglage de la largeur de fente.

Tableau 4

Critères de classification OPI pour l'opacité.

Score moyen maximal d'opacité (*)	Catégorie OPI
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Voir tableau 1

▼**M2**

Tableau 5

Critères de classification OPI pour la rétention moyenne de fluorescéine

Score de rétention moyenne de fluorescéine 30 minutes après traitement (*)	Catégorie OPI
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Voir tableau 2.

46. La classification générale des effets irritants in vitro d'une substance d'essai est déterminée par la catégorie d'effet irritant qui correspond à la combinaison des catégories obtenues pour le gonflement cornéen, l'opacité cornéenne et la rétention de fluorescéine, et par application du schéma présenté dans le tableau 6.

Tableau 6

Classification générale des effets irritants *in vitro*

Classification	Combinaison des 3 critères d'évaluation
Substance corrosive/fortement irritante	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Opacité cornéenne > 3 à 30 min (dans au moins deux yeux) Opacité cornéenne = 4 à n'importe quel temps d'observation (dans au moins deux yeux) Relâchement important de l'épithélium (dans au moins un œil)

(*) Combinaisons moins probables.

47. Comme indiqué au paragraphe 1, s'il n'est pas démontré que la substance d'essai est corrosive ou fortement irritante pour l'œil, il convient de mener des essais complémentaires à des fins de classification et d'étiquetage. Pour la mise en évidence des substances corrosives ou fortement irritantes pour l'œil, la méthode d'essai OPI présente une précision globale comprise entre 83 % (120/144) et 87 % (134/154), un taux de faux positifs allant de 6 % (7/122) à 8 % (9/116), et un taux de faux négatifs allant de 41 % (13/32) à 50 % (15/30), en comparaison avec les résultats de la méthode d'essai sur œil de lapin in vivo, classés selon les systèmes de classification de l'EPA (1), de l'UE (2), ou du SGH (3). Lorsqu'on exclut de la base de données les substances de certaines catégories chimiques (à savoir, les alcools et les tensioactifs) et physiques (à savoir, les solides), la précision de l'OPI dans les systèmes de classification de l'EPA, de l'UE ou du SGH se situe entre 91 % (75/82) et 92 % (69/75), les taux de faux positifs entre 5 % (4/73) et 6 % (4/70), et les taux de faux négatifs entre 29 % (2/7) et 33 % (3/9) (4).

48. Même si une substance d'essai n'est pas classée comme corrosive ou fortement irritante pour l'œil, les données de la méthode d'essai OPI peuvent servir, en association avec des résultats d'essais in vivo sur œil de lapin ou d'un autre test in vitro dûment validé, à évaluer plus en profondeur l'utilité et les limites de la méthode OPI pour la détection des substances faiblement irritantes ou non irritantes (un document d'orientation sur l'utilisation de méthodes d'essai de toxicité oculaire in vitro est en cours d'élaboration).

▼M2

Critères d'acceptation de l'étude

49. Un essai est considéré comme acceptable lorsque la classification de l'irritation obtenue pour les témoins négatifs et de véhicule/solvant parallèles, d'une part, et pour les témoins positifs parallèles, d'autre part, situe les substances correspondantes respectivement dans les catégories «substances non irritantes» et «substances fortement irritantes/corrosives».

Rapport d'essai

50. Le rapport d'essai contient les renseignements suivants, dès lors qu'ils s'appliquent à l'étude:

Substances d'essai et témoins

Nom(s) chimique(s), par exemple nom de la structure chimique utilisé par le Chemical Abstracts Service (CAS), suivi d'autres noms, s'ils sont connus;

Numéro d'enregistrement CAS (RN), s'il est connu;

Pureté et composition de la substance ou du mélange (en pourcentage pondéral), dans la mesure où cette information est disponible;

Propriétés physicochimiques, comme l'état physique, la volatilité, le pH, la stabilité, la classe chimique, la solubilité dans l'eau, pertinentes pour la conduite de l'étude;

Le cas échéant, traitement des substances d'essai et témoins avant l'essai (par exemple, chauffage, broyage);

Stabilité (si elle est connue);

Renseignements relatifs au commanditaire et à l'installation d'essai:

Nom et adresse du commanditaire, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude;

Provenance des yeux (par exemple, établissement auprès duquel ils ont été recueillis);

Stockage et conditions de transport des yeux (par exemple, date et heure de la collecte, délai avant le début de l'essai);

Dans la mesure du possible, caractéristiques spécifiques des animaux sur lesquels ont été prélevés les yeux (par exemple, âge, sexe, poids de l'animal donneur);

Justification du choix de la méthode d'essai et du mode opératoire

Intégrité de la méthode d'essai

Mode opératoire utilisé pour assurer l'intégrité (précision et fiabilité) de la méthode d'essai au cours du temps (par exemple essai périodique des substances d'épreuve de compétence, utilisation de données antérieures de témoins positifs et négatifs).

Critères d'acceptabilité de l'essai

Le cas échéant, gamme de témoins de référence parallèles acceptables selon des données antérieures;

Conditions de l'essai

Description du système d'essai utilisé;

Biomicroscope (lampe à fente) utilisé (par exemple, modèle);

Réglages du biomicroscope;

Informations sur les yeux de poulet utilisés, notamment appréciation de leur qualité;

▼M2

Détails sur le mode opératoire d'essai utilisé;

Concentration(s) des substances d'essai utilisées;

Description de toutes les modifications du mode opératoire de l'essai;

Référence aux données historiques du modèle (par exemple, témoins positifs et négatifs, substances d'épreuves de compétence, substances étalons);

Description des critères d'évaluation utilisés;

Résultats

Description des autres effets observés;

Le cas échéant, photographies de l'œil;

Discussion des résultats

Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(2) Règlement (CE) nº 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) nº 1907/2006. JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.

(3) Nations unies (NU) (2007). Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), deuxième édition révisée, Nations unies, New York et Genève, 2007. Disponible à l'adresse suivante:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible à l'adresse suivante:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(5) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Disponible à l'adresse suivante:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(6) Règlement (CE) nº 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) nº 793/93 du Conseil et le règlement (CE) nº 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission. JO L 396 du 30.12.2006, p. 1.

(7) OCDE (2002). Ligne directrice 405. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux. Disponible à l'adresse suivante:

[http://www.oecd.org/document/40/0, 2340, en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

▼**M2**

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible à l'adresse suivante:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponible à l'adresse suivante:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

(11) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Disponible à l'adresse suivante:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

(15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponible à l'adresse suivante:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

(16) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼**M2**

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Disponible à l'adresse suivante:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(19) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe IrritantsIsolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Disponible à l'adresse suivante:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

Appendice 1

DÉFINITIONS

Précision: degré de concordance entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. La précision constitue une mesure de la performance de la méthode d'essai et un aspect de sa «pertinence». Ce terme est souvent utilisé de façon interchangeable avec «concordance» pour désigner la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai.

Substance étalon: substance utilisée en tant que référence, pour la comparaison avec une substance d'essai. Une substance étalon présente les propriétés suivantes: i) provient d'une ou de plusieurs sources constantes et fiables; ii) présente une similitude structurale et fonctionnelle avec la classe des substances soumises à l'essai; iii) possède des caractéristiques physiques/chimiques connues; iv) est accompagnée de données confirmant ses effets connus, et v) a une puissance connue dans la fourchette de réponses désirées.

Cornée: partie transparente située à l'avant du globe oculaire, recouvrant l'iris et la pupille et laissant pénétrer la lumière vers l'intérieur de l'œil.

Opacité cornéenne: mesure de l'étendue du caractère opaque de la cornée suite à son exposition à une substance d'essai. Une augmentation de l'opacité cornéenne indique un endommagement de la cornée.

Gonflement cornéen: mesure objective dans l'essai OPI de l'ampleur de la distension de la cornée après exposition à une substance d'essai. Elle est exprimée en pourcentage et est calculée au moyen des mesures initiales (avant administration de la dose) d'épaisseur cornéenne, et des mesures d'épaisseur relevées à intervalles réguliers après exposition à la substance d'essai dans l'essai OPI. Le degré de gonflement cornéen est un indicateur d'endommagement de la cornée.

Catégorie 1 de l'EPA: effet corrosif (destruction irréversible du tissu oculaire) ou complication cornéenne ou irritation persistant plus de 21 jours (1).

Catégorie R41 de l'UE: lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'une substance d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application (2).

Taux de faux négatifs: proportion de substances positives faussement déclarées négatives par une méthode d'essai. C'est un indicateur de la performance de la méthode d'essai.

Taux de faux positifs: proportion des substances négatives faussement déclarées positives par une méthode d'essai. C'est un indicateur de la performance de la méthode d'essai.

Rétention de fluorescéine: mesure subjective, dans l'essai OPI, de la quantité de fluorescéine sodique qui est retenue par les cellules épithéliales de la cornée après exposition à une substance d'essai. Le degré de rétention de fluorescéine est un indicateur d'endommagement de la cornée.

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques): système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (3).

▼M2

Catégorie 1 du SGH: lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'une substance d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application (3).

Danger: propriété intrinsèque d'un agent ou situation susceptible de provoquer des effets néfastes lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-)population est exposé(e) à cet agent.

Témoin négatif: réplicat non traité contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec la substance d'essai et les autres échantillons témoins afin de déterminer si le solvant interagit avec le système d'essai.

Substance non irritante: substance qui n'est pas classée comme irritant oculaire dans la catégorie I, II ou III de l'EPA, la catégorie R41 ou R36 de l'UE, ou la catégorie 1, 2A ou 2B du SGH (1) (2) (3).

Substance corrosive pour l'œil: a) substance provoquant des lésions irréversibles des tissus oculaires; b) substance classée comme irritant oculaire dans la catégorie 1 du SGH, la catégorie 1 de l'EPA ou la catégorie R41 de l'UE (1) (2) (3).

Substance irritante pour l'œil: a) substance provoquant une modification réversible de l'œil suite à une application sur la face antérieure de l'œil; b) substance classée comme irritant oculaire dans la catégorie II ou III de l'EPA, la catégorie R36 de l'UE ou la catégorie 2A ou 2B du SGH (1) (2) (3).

Substance fortement irritante pour l'œil: a) substance provoquant des lésions des tissus oculaires suite à une application sur la face antérieure de l'œil, qui ne sont pas réversibles dans les 21 jours suivant l'application ou entraînent une dégradation sévère de la vue; b) substance classée comme irritant oculaire dans la catégorie 1 du SGH, la catégorie 1 de l'EPA ou la catégorie R41 de l'UE (1) (2) (3).

Témoin positif: réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, et traité avec une substance induisant notoirement une réponse positive. Afin de pouvoir évaluer la variabilité des réponses du témoin positif dans le temps, la sévérité de la réponse ne devra pas être excessive.

Fiabilité: mesure de la reproductibilité de l'essai mis en œuvre, au sein d'un laboratoire et entre des laboratoires, au cours du temps, en utilisant le même mode opératoire. Elle est évaluée par calcul de la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoires et de la répétabilité intralaboratoire.

Biomicroscope (lampe à fente): instrument utilisé pour examiner directement l'œil sous le grossissement d'un microscope binoculaire en créant une image stéréoscopique droite. Dans la méthode d'essai OPI, cet instrument est utilisé pour visualiser les structures antérieures de l'œil de poulet et également pour mesurer objectivement l'épaisseur de la cornée au moyen d'un dispositif adjoint de mesure de la profondeur.

Témoin de solvant/véhicule: échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou véhicule utilisé pour tester les échantillons témoins traités ou non avec la substance d'essai afin de déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec la substance d'essai dissoute dans le même solvant ou véhicule. Testé avec un témoin négatif concurrent, cet échantillon indique également si le solvant ou véhicule interagit avec le système d'essai.

▼M2

Stratégie d'essai séquentielle: démarche expérimentale séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur une substance d'essai dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à une procédure fondée sur la force probante des données pour déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification des dangers, avant de passer à l'étape suivante. Si le potentiel d'irritation d'une substance d'essai peut être déterminé sur la base des informations existantes, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire. Dans le cas contraire, une procédure expérimentale progressive de type séquentiel sur des animaux est alors lancée jusqu'à ce qu'une classification sans équivoque puisse être effectuée.

Méthode d'essai validée: méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés.

Force probante des données: prise en compte des forces et des faiblesses de divers éléments d'information en vue d'aboutir à une conclusion concernant le danger potentiel d'une substance et d'étayer cette conclusion.

▼**M2**

Appendice 2

SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE POUR LA MÉTHODE D'ESSAI OPI

Avant d'utiliser en routine une méthode conforme à cette méthode d'essai, certains laboratoires peuvent estimer souhaitable de démontrer leurs compétences techniques en identifiant correctement la catégorie de corrosivité oculaire des 10 substances recommandées dans le tableau 1. Ces substances ont été sélectionnées de façon à représenter la gamme des réactions locales d'irritation/corrosion oculaire, sur la base des résultats de l'essai sur œil de lapin in vivo (TG 405) (à savoir, les catégories 1, 2A, 2B, ou non classées ou non étiquetées selon le SGH des Nations unies) (3) (7). Toutefois, compte tenu de l'utilité validée de ces essais (uniquement mise en évidence des substances corrosives/fortement irritantes pour l'œil), seuls deux résultats expérimentaux obtenus à des fins de classification (substance corrosive/fortement irritante ou substance non corrosive/faiblement irritante) permettent de démontrer les compétences des laboratoires. Les autres critères de sélection retenus ont trait à la disponibilité des substances dans le commerce, à la disponibilité de données de référence in vivo de bonne qualité, et à l'existence de données de bonne qualité issues des deux méthodes d'essai in vitro qui font l'objet de lignes directrices. Pour cette raison, les substances irritantes ont été sélectionnées dans la liste recommandée par l'ICCVAM de 122 substances de référence pour la validation de méthodes d'essai de toxicité oculaire in vitro (voir appendice H, ICCVAM Recommended Reference Substances List)(4). Les données de référence sont disponibles dans les documents de l'ICCVAM (Background Review Documents) pour la méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine (OPCB) et la méthode OPI (18) (19).

Tableau 1

Substances recommandées pour la démonstration des compétences techniques relatives à la méthode OPI

Substance chimique	Nº CAS	Classe chimique (1)	Forme physique	Classification in vivo (2)	Classification in vitro (3)
Chlorure de benzalconium (5 %)	8001-54-5	Composé d'onium	Liquide	Catégorie 1	Corrosif/fortement irritant
Chlorhexidine	55-56-1	Amine, Amidine	Solide	Catégorie 1	Corrosif/fortement irritant
Acide dibenzoyl-L-tartrique	2743-38-6	Acide carboxylique, ester	Solide	Catégorie 1	Corrosif/fortement irritant
Imidazole	288-32-4	Hétérocycle	Solide	Catégorie 1	Corrosif/fortement irritant
Acide trichloroacétique (30 %)	76-03-9	Acide carboxylique	Liquide	Catégorie 1	Corrosif/fortement irritant
Chlorure de 2,6-dichlorobenzoyle	4659-45-4	Halogénure d'acyle	Liquide	Catégorie 2A	Non corrosif/Faiblement irritant
2-méthylacéto-acétate d'éthyle	609-14-3	Cétone, Ester	Liquide	Catégorie 2B	Non corrosif/Faiblement irritant
Nitrate d'ammonium	6484-52-2	Sel inorganique	Solide	Catégorie 2A	Non corrosif/Faiblement irritant

▼**M2**

Substance chimique	Nº CAS	Classe chimique (1)	Forme physique	Classification in vivo (2)	Classification in vitro (3)
Glycérol	56-81-5	Alcool	Liquide	Non étiqueté	Non corrosif/Faiblement irritant
n-Hexane	110-54-3	Hydrocarbure (acyclique)	Liquide	Non étiqueté	Non corrosif/Faiblement irritant

Abréviations: Nº CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstract Service

(1) Les classes de produits chimiques ont été attribuées à chaque substance testée à l'aide d'un système de classification normalisé, fondé sur le système de classification du *Medical Subject Headings* (MeSH) de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis d'Amérique (disponible sur http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) D'après les résultats de l'essai in vivo sur œil de lapin (Ligne directrice de l'OCDE nº 405) et en utilisant le SGH des NU (3)(7).

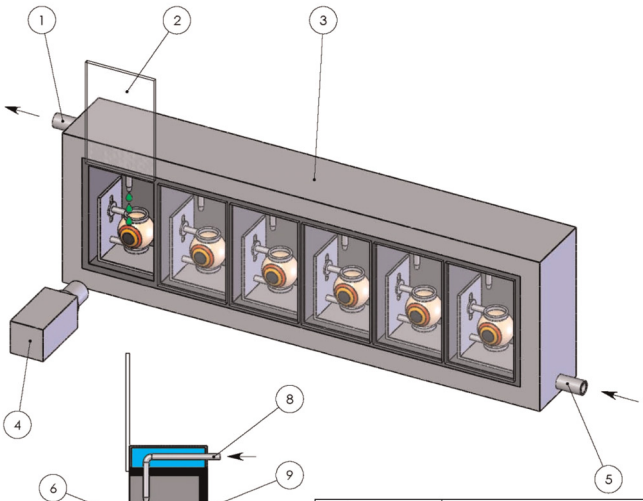
(3) D'après les résultats des méthodes OPCB et OPI.

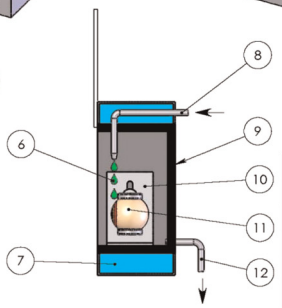
▼M2

Appendice 3

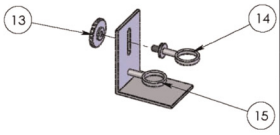
Schémas de l'appareil de surfusion et des clamps pour œil (méthode OPI)

[Voir Burton et al. (17) pour d'autres descriptions génériques de l'appareil de surfusion et du clamp pour œil]





CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

ÉLEMENT	DESCRIPTION
1	SORTIE D'EAU CHAUDE
2	PORTE COULISSANTE
3	APPAREIL DE SURFUSION
4	INSTRUMENT DE MESURE OPTIQUE
5	ENTRÉE D'EAU CHAUDE
6	SOLUTION SALINE
7	EAU CHAUDE
8	ENTRÉE DE SOLUTION SALINE
9	COMPARTIMENT
10	SUPPORT D'ŒIL
11	ŒIL DE POULET
12	SORTIE DE SOLUTION SALINE
13	VIS DE BLOCAGE
14	BRAS SUPÉRIEUR AJUSTABLE
15	BRAS INFÉRIEUR FIXE

▼M3

B.49. ESSAI IN VITRO DE MICRONOYAUX SUR CELLULES DE MAMMIFÈRES

INTRODUCTION

1. L'essai in vitro de micronoyaux (MNvit) est un essai de génotoxicité consistant à mettre en évidence d'éventuels micronoyaux (MN) dans le cytoplasme de cellules en interphase. Les micronoyaux peuvent avoir pour origine des fragments de chromosomes acentriques (c'est-à-dire dépourvus de centromère) ou des chromosomes entiers incapables de migrer vers les pôles de la cellule au cours de l'anaphase. L'essai permet de détecter l'activité de substances chimiques clastogènes et aneugènes (substances et mélanges) (1) (2) dans des cellules ayant effectué une mitose pendant ou après l'exposition à la substance d'essai. La présente méthode d'essai autorise l'utilisation de protocoles incluant ou non la cytochalasine B (cytoB), un inhibiteur de polymérisation de l'actine. Une adjonction de cytoB avant la mitose ciblée permet la détermination et l'analyse sélective de la fréquence des micronoyaux dans les cellules ayant effectué une mitose, ces cellules étant binucléées (3) (4). Cette méthode d'essai autorise également l'utilisation de protocoles ne mettant pas en jeu le blocage de la cytokinèse, à condition de pouvoir démontrer que la population cellulaire analysée a bien effectué une mitose.

2. Outre qu'il permet d'identifier des substances chimiques (substances et mélanges) induisant la formation de micronoyaux, l'essai MNvit, associé au blocage de la cytokinèse, au marquage immunochimique des kinétochores ou à l'hybridation avec sondes centromériques/télomériques [hybridation fluorescente in situ (FISH)], peut apporter des informations sur les mécanismes à l'origine des lésions chromosomiques et de la formation de micronoyaux (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Ces procédures de marquage et d'hybridation peuvent être suivies lorsqu'une augmentation de la formation de micronoyaux est constatée et que l'investigateur souhaite déterminer si cette augmentation est le résultat d'événements clastogènes et/ou aneugènes.

3. Contrairement aux aberrations chromosomiques observées dans les cellules en métaphase, qui ne sont pas forcément transmises, les micronoyaux sont des lésions transmises aux cellules-filles. Dans la mesure où les micronoyaux présents dans les cellules en interphase peuvent être évalués de façon relativement objective, le personnel du laboratoire a seulement besoin de déterminer si les cellules ont effectué une mitose, et de dénombrer les cellules contenant un micronoyau. L'examen des préparations est donc relativement rapide, et l'analyse peut être automatisée. Chaque traitement permettant l'examen non plus de centaines mais de milliers de cellules, la puissance de l'essai s'en trouve accrue. Enfin, étant donné que les micronoyaux peuvent être issus de chromosomes retardataires, l'essai peut permettre de détecter la présence d'agents inducteurs d'aneuploïdie, difficiles à étudier lors de tests d'aberration chromosomique classiques, tels que celui décrit dans la ligne directrice nº 473 de l'OCDE (chapitre B.10 de la présente annexe) (17). Toutefois, l'essai MNvit ne permet pas de différencier les substances chimiques induisant la polyploïdie de celles induisant la clastogénicité sans avoir recours à des techniques spécifiques, telles que la méthode FISH citée au paragraphe 2.

4. L'essai MNvit est une méthode d'essai in vitro utilisant généralement des cultures de cellules humaines ou de rongeur. Grâce à sa capacité de mise en évidence d'agents aneugènes et clastogènes, il constitue un outil de base complet pour l'étude in vitro du potentiel de lésions chromosomiques.

5. L'essai MNvit est efficace et fiable sur plusieurs types de cellules, et en présence ou en l'absence de cytoB. La validité de l'essai MNvit est attestée par de nombreuses données, et ce avec l'utilisation de différentes lignées cellulaires issues de rongeurs (CHO, V79, CHL/IU et L5178Y) et de lymphocytes humains (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Ces données proviennent notamment des études internationales de validation coordonnées par la Société française de toxicologie génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) et des rapports de l'International Workshop on Genotoxicity Testing (4) (16). Les données disponibles ont en outre fait l'objet d'une nouvelle évaluation lors d'une étude de validation

▼M3

rétrospective fondée sur le poids de la preuve, réalisée par le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (ECVAM) de la Commission européenne. Cette méthode d'essai a été déclarée scientifiquement valable par le comité consultatif scientifique de l'ECVAM (ESAC) (32) (33) (34). L'utilisation d'une lignée cellulaire lymphoblastoïde humaine TK6 (35), de cellules HepG2 (36) (37) et de cellules embryonnaires primaires de hamster syrien (38) a été décrite mais n'a pas été retenue dans les études de validation.

DÉFINITIONS

6. Les définitions des termes employés sont présentées à l'appendice 1.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

7. À moins que les cellules utilisées ne soient dotées d'un métabolisme compatible avec les substances d'essai, les essais conduits in vitro requièrent généralement une source exogène d'activation métabolique. Or, les systèmes d'activation métabolique exogène sont incapables de reproduire parfaitement les conditions in vivo. Il convient aussi d'éviter d'introduire des conditions qui conduiraient à de faux résultats positifs ne reflétant pas une mutagénicité intrinsèque, et pouvant provenir de facteurs tels que des modifications importantes du pH ou de l'osmolalité, ou une forte cytotoxicité (39) (40) (41). En cas de modification du pH du milieu par la substance chimique d'essai lors de son adjonction, il convient d'ajuster le pH, de préférence en tamponnant la solution mère de façon que tous les volumes restent identiques pour toutes les concentrations d'essai et tous les témoins.

8. Afin que l'analyse de l'induction de micronoyaux soit valable, il est essentiel que la mitose se soit produite aussi bien dans les cultures traitées et que dans les cultures non traitées. Pour que son intérêt soit maximal, la numération des micronoyaux est effectuée dans les cellules ayant achevé une mitose durant ou après l'application de la substance d'essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

9. Les cultures cellulaires d'origine humaine ou mammifère sont exposées à la substance d'essai, en présence et en l'absence d'une source exogène d'activation métabolique, à moins que les cellules utilisées ne soient dotées de capacités métaboliques idoines. Tous les essais prévoient l'utilisation de témoins parallèles de solvant/véhicule et de témoins positifs.

10. Durant ou après l'exposition à la substance d'essai, les cellules sont mises en culture pendant une période suffisante pour que la lésion chromosomique ou fusoriale conduise à la formation de micronoyaux dans les cellules en interphase. La substance d'essai est normalement présente au cours de la mitose pour qu'il y ait induction d'une aneuploïdie. Les cellules récoltées en interphase sont teintées et soumises à analyse pour déceler la présence de micronoyaux. En principe, la numération des micronoyaux ne devrait être réalisée que dans les cellules ayant effectué une mitose durant l'exposition à la substance d'essai, ou pendant la période de postexposition, si l'essai la prévoit. Dans les cultures ayant été exposées à un agent de blocage de la cytokinèse, la numération n'est effectuée que sur les cellules binucléées. En l'absence d'agent de blocage de la cytokinèse, il importe de démontrer que les cellules analysées ont selon toute vraisemblance subi une mitose pendant ou après l'exposition à la substance d'essai. Pour tous les protocoles, il convient de démontrer qu'une prolifération cellulaire a eu lieu tant dans les cultures témoins que dans les cultures traitées. Le degré de cytotoxicité ou de cytostase induit par la substance d'essai est évalué pour les cultures (ou des cultures parallèles) dans lesquelles est réalisée la numération des micronoyaux.

▼M3

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Préparations

11. L'emploi de lymphocytes primaires du sang périphérique humain en culture (5) (19) (42) (43) et de plusieurs lignées cellulaires issues de rongeurs, telles que des cellules CHO, V79, CHL/IU et L5178Y, est possible dans le cadre de cet essai (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Tout recours à d'autres lignées cellulaires ou d'autres types de cellules est justifié via la démonstration de leur performance pour l'essai, ainsi qu'il est indiqué dans la section sur les critères d'acceptabilité. Dans la mesure où la fréquence des micronoyaux généralement constatée pour un type de cellule aura une influence sur la sensibilité de l'essai, il est recommandé d'utiliser des types de cellules pour lesquelles la fréquence habituelle de formation de micronoyaux est faible et stable.

12. Les lymphocytes du sang périphérique humain utilisés sont issus de sujets jeunes (âgés de 18 à 35 ans environ), sains, non fumeurs et n'ayant pas subi récemment d'exposition connue à des rayonnements ou des substances chimiques génotoxiques. Si des cellules issues de plusieurs donneurs sont mises en commun, le nombre des donneurs est précisé. La fréquence des micronoyaux augmente avec l'âge, et cette tendance est plus marquée chez la femme que chez l'homme (44). Cela est pris en compte lors du choix des donneurs pour une mise en commun des cellules.

Milieu et conditions de culture

13. Il convient d'utiliser un milieu de croissance et des conditions d'incubation (récipients de culture, concentration de CO_2, température et humidité) appropriés pour les cultures. La stabilité du caryotype et l'absence de contamination par des mycoplasmes sont vérifiées régulièrement dans les lignées cellulaires établies et les souches cellulaires, qui sont écartées si une contamination ou une modification du caryotype sont constatées. La durée normale du cycle cellulaire dans les conditions de culture appliquées par le laboratoire d'essai doit être connue. En cas de recours à la méthode du blocage de la cytokinèse, la concentration de l'inhibiteur de la cytokinèse est adaptée au type de cellule utilisé, et preuve est faite de son aptitude à produire suffisamment de cellules binucléées pour pouvoir procéder à une numération.

Préparation des cultures

14. Lignées cellulaires établies et souches cellulaires: les cellules sont multipliées à partir de cultures mères, placées dans le milieu de culture à une densité telle qu'elles ne recouvriront pas entièrement la surface du milieu, sur une seule couche, et que les cultures en suspension n'atteindront pas une densité excessive avant le moment de la récolte, et incubées à 37 °C.

15. Lymphocytes: un sang total traité avec un anticoagulant (ex.: héparine) ou des lymphocytes isolés sont mis en culture en présence d'un mitogène [ex: phytohémagglutinine (PHA)] avant l'exposition à la substance d'essai et à la cytoB.

Activation métabolique

16. Le recours à un système d'activation métabolique exogène est nécessaire en cas d'utilisation de cellules dotées d'une capacité métabolique endogène inadéquate. Le système le plus couramment utilisé est une fraction postmitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foies de rongeurs traités avec des inducteurs enzymatiques, par exemple l'Aroclor 1254 (45) (46) ou un mélange de phénobarbitone et ß-naphthoflavone (46) (47) (48) (49). L'utilisation de ce mélange n'est pas contraire à la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (50) ni au règlement (CE) nº 850/2004 concernant les polluants organiques persistants (66) et s'est révélée aussi efficace que celle de l'Arcolor 1254 pour l'induction d'oxydases à fonction mixte (46) (47) (48) (49). La fraction S9 est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 10 % v/v dans le milieu d'essai final. Le choix du système d'activation métabolique peut dépendre de la classe chimique de la substance d'essai. Dans certains cas, il peut y avoir avantage à utiliser plus d'une concentration de la fraction S9.

▼M3

17. Des lignées cellulaires génétiquement modifiées pour produire des enzymes activantes spécifiques, humaines ou de rongeur, peuvent éliminer le besoin de recourir à un système d'activation métabolique exogène, et peuvent être utilisées comme cellules d'essai. Dans ce cas, le choix des lignées cellulaires utilisées est justifié scientifiquement, par exemple par la pertinence des oxydases à fonction mixte pour le métabolisme de la substance d'essai (51) et par leur réactivité aux clastogènes et aneugènes connus (voir la section sur les critères d'acceptabilité). Il convient de prendre en considération le fait que la substance d'essai peut ne pas être métabolisée par la ou les oxydases à fonction mixte exprimées, auquel cas des résultats négatifs n'indiqueraient pas que la substance d'essai n'est pas un inducteur de micronoyaux.

Préparation de la substance d'essai

18. Les substances chimiques solides sont dissoutes dans un véhicule ou un solvant approprié puis, le cas échéant, diluées avant application. Les substances chimiques liquides peuvent être ajoutées telles quelles ou après dilution au système d'essai. Les essais de substances chimiques gazeuses ou volatiles nécessitent une modification appropriée des protocoles standards, par exemple l'utilisation de récipients hermétiquement clos (52) (53). Il convient d'utiliser des préparations fraîches sauf si l'on dispose de données démontrant la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

Conditions expérimentales

Solvants/véhicules

19. Le solvant/véhicule choisi ne doit pas réagir avec la substance d'essai ni altérer la survie des cellules et l'activité du mélange S9 à la concentration employée. L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel (autre que l'eau, le milieu de culture cellulaire ou le diméthylsulfoxyde, notamment) est justifié par des données faisant état de sa compatibilité avec la substance d'essai et de son absence de génotoxicité. Il est recommandé, dans la mesure du possible, d'envisager en premier lieu l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux.

Utilisation de la cytoB comme agent de blocage de la cytokinèse

20. Il est essentiel, pour garantir l'efficacité de la méthode d'essai MNvit, que les cellules faisant l'objet d'une numération aient bien effectué une mitose au cours de l'application ou pendant la période d'incubation qui suit le traitement, le cas échéant. La cytoB est l'agent le plus couramment utilisé pour bloquer la cytokinèse, car elle inhibe l'assemblage de l'actine, empêchant la séparation des cellules-filles après la mitose, d'où la formation de cellules binucléées (5) (54) (55). Ainsi, la numération des micronoyaux peut être limitée aux cellules ayant effectué une mitose pendant ou après le traitement. L'effet de la substance d'essai sur la cinétique de prolifération cellulaire peut être mesuré de façon concomitante. L'usage de cytoB comme agent de blocage de la cytokinèse est indiqué lors de l'utilisation de lymphocytes humains car la durée du cycle cellulaire est variable selon les cultures et les donneurs, et car tous les lymphocytes ne réagissent pas à la PHA. D'autres méthodes existent pour déterminer si les cellules des lignées cellulaires utilisées et faisant l'objet d'une numération ont effectué une mitose; ces méthodes sont détaillées ci-dessous (voir paragraphe 26).

21. Pour chaque type de cellule, le laboratoire détermine la concentration de cytoB permettant d'obtenir la fréquence optimale de cellules binucléées dans les cultures témoins traitées uniquement au solvant/véhicule. La concentration appropriée de cytoB se situe habituellement entre 3 et 6 µg/ml.

▼M3

Mesure de la prolifération et de la cytotoxicité cellulaires et choix des concentrations d'exposition

22. Lors de la détermination de la plus forte concentration de substance d'essai à tester, on évitera les concentrations susceptibles de produire de fausses réponses positives, notamment celles qui engendrent une cytotoxicité excessive, une précipitation dans le milieu de culture ou une modification marquée du pH ou de l'osmolalité (39) (40) (41).

23. Des mesures de la prolifération cellulaire sont effectuées pour s'assurer que les cellules traitées ont bien effectué une mitose au cours de l'essai et que les applications sont réalisées à des niveaux de cytotoxicité appropriés (voir paragraphe 29). La cytotoxicité est déterminée avec et sans activation métabolique dans les cellules nécessitant une telle activation, via la mesure de l'augmentation relative du nombre de cellules ou le doublement relatif de la population (voir les formules à l'appendice 2), sauf si l'on utilise la cytoB, auquel cas la cytotoxicité peut être déterminée grâce à l'indice de réplication (voir la formule à l'appendice 2).

24. L'application de cytoB sur les cultures, et la mesure des fréquences relatives de cellules mononucléées, binucléées et multinucléées dans chaque culture, offrent un moyen précis de quantifier l'effet d'un traitement sur la prolifération cellulaire et l'activité cytotoxique ou cytostatique (5), et d'assurer que seules les cellules ayant effectué une mitose pendant ou après l'application sont prises en compte.

25. Dans les études faisant appel à la cytoB, la cytostase/cytotoxicité peut être quantifiée au moyen de l'indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (cytokinesis-block proliferation index, ou CBPI) (5) (26) (56) ou déduite de l'indice de réplication (RI) à partir d'au moins 500 cellules par culture (voir les formules à l'appendice 2). Lorsque la cytoB est utilisée pour évaluer la prolifération cellulaire, un CBPI ou RI est défini à partir d'au moins 500 cellules par culture. Ces mesures peuvent servir, parmi d'autres, à estimer la cytotoxicité en comparant les valeurs obtenues pour les cultures traitées et les cultures témoins. L'évaluation d'autres marqueurs de cytotoxicité (ex.: degré de confluence, nombre de cellules, apoptose, nécrose, comptage des cellules en métaphase) peut fournir des informations utiles.

26. Dans les études sans cytoB, il est nécessaire de démontrer que les cellules faisant l'objet d'une numération ont effectué une division cellulaire durant ou après l'exposition à la substance d'essai, faute de quoi on risque de produire de fausses réponses négatives. Les méthodes utilisées pour garantir que les cellules évaluées ont bien été divisées comprennent l'incorporation puis la détection de bromodéoxyuridine (BrdU) afin d'identifier les cellules répliquées (57), la formation de clones lorsque des cellules provenant de lignées cellulaires permanentes sont traitées et dénombrées in situ sur une lame de microscope (Indice de prolifération PI) (25) (26) (27) (28), la mesure du doublement relatif de la population (RPD) ou de l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) ou encore d'autres méthodes validées (16) (56) (58) (59) (voir les formules à l'appendice 2). L'évaluation d'autres marqueurs de cytotoxicité ou de cytostase (ex.: degré de confluence, nombre de cellules, apoptose, nécrose, comptage des cellules en métaphase) peut fournir des informations utiles.

27. Il convient d'évaluer au moins trois concentrations analysables. À cette fin, il peut être nécessaire de réaliser l'expérience en utilisant un plus grand nombre de concentrations peu espacées, et d'analyser la formation des micronoyaux pour les concentrations présentant la fourchette de cytotoxicité appropriée. Il est également possible de réaliser un essai de cytotoxicité préliminaire afin de réduire le spectre de l'essai définitif.

28. La concentration maximale vise à produire un taux de cytotoxicité de 55 ± 5 %. Des concentrations plus fortes peuvent induire des lésions chromosomiques comme effet secondaire de la cytotoxicité (60). En présence d'une substance cytotoxique, les concentrations retenues couvrent un domaine allant d'une cytotoxicité nulle ou légère à une cytotoxicité de 55 ± 5 %.

▼**M3**

29. Quand aucune cytotoxicité ni précipité n'est observé, la concentration maximale est la plus basse des trois concentrations suivantes: 0,01 M, 5 mg/mL ou 5 µl/mL. Les concentrations retenues pour l'expérience sont généralement séparées par un facteur de 10 au maximum. Pour les substances d'essai présentant une courbe concentration-réponse caractérisée par une forte pente, il peut être nécessaire de réduire ce facteur de séparation de façon à pouvoir analyser les cultures des plages de toxicité inférieures et moyennes.

30. Lorsque la solubilité est un facteur limitant, la concentration maximale, si elle n'est pas limitée par la cytotoxicité, correspond à la concentration la plus faible permettant d'observer une précipitation minimale dans les conditions de culture, sous réserve que le précipité n'interfère pas avec la numération. L'évaluation de la précipitation est réalisée selon des méthodes telles que la microscopie optique, en notant tout précipité persistant ou apparaissant durant la période de culture (avant la fin du traitement).

Témoins

31. Il convient d'inclure dans chaque expérience des témoins positifs et des témoins de solvant/véhicule, avec et sans activation métabolique.

32. Des témoins positifs sont nécessaires pour démontrer que les cellules utilisées, et le protocole d'essai, permettent bien d'identifier les agents clastogènes et aneugènes, et prouver la capacité métabolique de la préparation S9. Les témoins positifs font appel à des inducteurs connus de formation de micronoyaux à des concentrations susceptibles d'entraîner une augmentation faible, mais reproductible, de la fréquence de fond, et de démontrer la sensibilité du système d'essai. Les concentrations des témoins positifs sont choisies de manière que les effets soient nets mais que l'identité des lames codées ne soit pas évidente pour celui qui les interprète.

33. Un clastogène nécessitant une activation métabolique (par exemple: cyclophosphamide; benzo[a]pyrène) est utilisé pour démontrer d'une part la compétence métabolique et d'autre part l'aptitude du système d'essai à détecter les clastogènes. D'autres témoins positifs peuvent être utilisés si cela est justifié. Certains témoins positifs qui nécessitent une activation métabolique étant parfois actifs sans activation métabolique exogène dans certaines conditions de traitement ou chez certaines lignées cellulaires, la nécessité d'avoir recours à une activation métabolique, ainsi que l'activité de la préparation S9, sont démontrées pour la lignée cellulaire retenue et pour les concentrations sélectionnées.

34. À l'heure actuelle, aucun aneugène connu ne nécessite une activation métabolique pour présenter une activité génotoxique (16). Les témoins positifs actuellement acceptés pour l'activité aneugénique sont, notamment, la colchicine et la vinblastine. D'autres substances et mélanges chimiques peuvent être utilisés si ils induisent des micronoyaux uniquement, ou principalement, via leur activité aneugénique. Pour éviter d'avoir recours à deux témoins positifs (pour la clastogénicité et l'aneugénicité) sans activation métabolique, le témoin d'aneugénicité peut servir de témoin positif sans S9, et le témoin de clastogénicité peut être utilisé pour éprouver le caractère approprié du système d'activation métabolique utilisé. Les témoins positifs tant pour la clastogénicité que pour l'aneugénicité sont utilisés pour des cellules ne nécessitant pas de préparation S9. Les témoins positifs suggérés sont indiqués à l'appendice 3.

35. Le recours à des témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, si des substances chimiques appropriées sont disponibles. Tous les témoins positifs utilisés sont adaptés au type de cellule concerné et aux conditions d'activation.

▼M3

36. Des témoins de solvant/véhicule sont inclus au moment de chaque récolte. En outre, des témoins négatifs non traités (sans solvant/véhicule) sont aussi utilisés à moins que des données publiées ou issues d'essais témoins réalisés antérieurement par le laboratoire ne démontrent que le solvant choisi n'a pas d'action génotoxique ou d'autre effet délétère aux concentrations retenues.

MODE OPÉRATOIRE

Déroulement du traitement

37. Afin d'augmenter au maximum la probabilité de détecter une action aneugène ou clastogène à un stade précis du cycle cellulaire, il importe qu'un nombre suffisant de cellules reçoive une application de la substance d'essai à tous les stades du cycle cellulaire. Le déroulement du traitement pour les lignées cellulaires et les cultures de cellules primaires peut donc différer quelque peu de celui pour les lymphocytes qui nécessitent une stimulation mitogénique pour débuter leur cycle cellulaire, ce qui est détaillé aux paragraphes 41-43 (16).

38. Les études théoriques et les données publiées (18) indiquent que la plupart des aneugènes et clastogènes sont détectés à l'issue d'une application de courte durée, comprise entre 3 et 6 heures, en présence et en l'absence de préparation S9, suivie du retrait de la substance d'essai et d'une période de croissance équivalente à 1,5 à 2,0 cycles cellulaires (6). Les échantillons de cellules sont prélevés après un temps correspondant à 1,5 à 2,0 fois la durée du cycle cellulaire normal (c'est-à-dire sans traitement) après le début du traitement ou à la fin du traitement (voir tableau 1). Les durées d'échantillonnage ou de récupération peuvent être allongées s'il est connu ou supposé que la substance d'essai affecte la durée du cycle cellulaire (par exemple si l'essai porte sur des analogues de nucléosides).

39. En raison de la cytotoxicité potentielle des préparations S9 pour les cellules de mammifères cultivées, le traitement d'exposition prolongée correspondant à 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux n'est utilisé qu'en l'absence de préparation S9. Dans les protocoles de traitement prolongé, différents choix sont possibles pour permettre l'application de la substance d'essai sur les cellules en présence ou en l'absence de cytoB. Ces différents choix sont à faire en fonction des craintes d'interaction entre la substance d'essai et la cytoB.

40. Le tableau 1 présente les différents déroulements proposés pour le traitement. Ces déroulements de traitement généraux peuvent être modifiés en fonction de la stabilité et de la réactivité de la substance d'essai, ou des caractéristiques de croissance des cellules utilisées. Toutes les applications débutent et s'achèvent pendant la phase de croissance exponentielle des cellules. Ces déroulements sont présentés plus en détail dans les paragraphes 41 à 47 ci-dessous.

Tableau 1

Traitement des cellules et temps de récolte pour l'essai MNvit

Lymphocytes, cellules primaires et lignées cellulaires traités avec application de cytoB	+ S9	Traiter pendant 3 à 6 heures en présence de S9; éliminer la préparation S9 et le milieu de traitement; ajouter du milieu frais et de la cytoB; récolter après 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux.
	– S9 Exposition courte	Traiter pendant 3 à 6 heures; éliminer le milieu de traitement; ajouter du milieu frais et de la cytoB; récolter après 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux.

▼M3

	– S9 Exposition prolongée	*Option A:* traiter pendant 1,5 à 2 cycles cellulaires normaux en présence de cytoB; récolter à la fin de la période d'exposition. *Option B:* traiter pendant 1,5 à 2 cycles cellulaires normaux; éliminer la substance d'essai; ajouter du milieu frais et de la cytoB; récolter après 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux.
Lignées cellulaires traitées sans application de cytoB (mode de traitement identique à celui décrit ci-dessus, sauf que l'on n'ajoute pas de cytoB)		

Lymphocytes, cellules primaires et lignées cellulaires avec cytoB

41. Pour les lymphocytes, la méthode la plus efficace consiste à démarrer l'exposition à la substance d'essai 44 à 48 heures après la stimulation par la PHA, une fois la synchronisation du cycle cellulaire disparue (5). Lors de l'essai initial, la substance d'essai est appliquée pendant 3 à 6 heures, en présence et en l'absence de S9. Le milieu de traitement est ensuite éliminé et remplacé par un milieu frais contenant de la cytoB, puis les cellules sont récoltées après un laps de temps correspondant à 1,5 à 2,0 fois le cycle cellulaire normal.

42. Si les résultats des deux essais initiaux de traitement court (3-6 heures) sont négatifs ou équivoques, un autre traitement plus long est appliqué par la suite (sans S9). Deux traitements différents, également acceptables, sont possibles. Toutefois, il peut s'avérer plus approprié de suivre l'option A pour les lymphocytes stimulés, dont la croissance exponentielle peut décliner 96 heures après la stimulation. Par ailleurs, il convient que les cultures de cellules ne recouvrent pas entièrement la surface du milieu avant l'échantillonnage final dans le cadre de l'option B:

— Option A: Les cellules sont traitées avec la substance d'essai pendant 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux, et récoltées à la fin du traitement.

— Option B: Les cellules sont traitées avec la substance d'essai pendant 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux. Le milieu de traitement est ensuite éliminé et remplacé par un milieu frais, puis les cellules sont récoltées après 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux supplémentaires.

43. Le traitement des cellules primaires et des lignées cellulaires est identique à celui des lymphocytes, à l'exception du fait que la stimulation par PHA pendant 44 à 48 heures n'est pas nécessaire. Les cellules autres que les lymphocytes sont exposées de telle sorte qu'à la fin de l'étude, elles n'aient pas dépassé la phase de croissance exponentielle.

Lignées cellulaires sans cytoB

44. Les cellules sont traitées pendant 3 à 6 heures en présence et en l'absence de S9. Le milieu du traitement est ensuite éliminé et remplacé par un milieu frais, puis les cellules sont récoltées après 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux.

▼M3

45. Si les résultats des deux essais initiaux de traitement court (3-6 heures) sont négatifs ou équivoques, un autre traitement plus long est appliqué par la suite (sans S9). Deux traitements différents, également acceptables, sont possibles:

— Option A: Les cellules sont traitées avec la substance d'essai pendant 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux, et récoltées à la fin du traitement.

— Option B: Les cellules sont traitées avec la substance d'essai pendant 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux. Le milieu de traitement est ensuite éliminé et remplacé par un milieu frais, puis les cellules sont récoltées après 1,5 à 2,0 cycles cellulaires normaux supplémentaires.

46. Il est possible que les cultures monocouches présentent des cellules mitotiques (reconnaissables à leur forme ronde et se détachant de la surface) à l'issue du traitement de 3 à 6 heures. Ces cellules se détachant facilement de la culture, elles risquent d'être emportées lors de l'élimination du milieu contenant la substance d'essai. Afin d'éviter la perte de cellules en mitose qui sont susceptibles de former des micronoyaux, il convient donc de les recueillir avec soin lors du lavage des cultures puis de les y réintroduire au moment de la récolte.

Nombre de cultures

47. Il convient de réaliser des cultures dupliquées pour chaque concentration de la substance d'essai, ainsi que pour les véhicules/solvants et les témoins négatifs. Si des résultats de laboratoire antérieurs ont démontré que la variation entre les cultures dupliquées est minime, l'utilisation d'une seule culture pour chaque concentration peut être envisagée. En cas d'utilisation de cultures uniques, il est recommandé d'analyser un plus grand nombre de concentrations.

Récolte des cellules et préparation des lames

48. Chaque culture fait l'objet d'une récolte et d'un traitement séparés. La préparation des cellules peut comporter un traitement hypotonique, mais cette étape n'est pas indispensable si les cellules sont correctement étalées par un autre biais. Différentes méthodes peuvent être employées pour la préparation des lames, à condition que les préparations cellulaires obtenues pour la numération soient de très bonne qualité. Le cytoplasme cellulaire est conservé pour permettre la détection d'éventuels micronoyaux et (dans la méthode du blocage de la cytokinèse) le repérage fiable des cellules binucléées.

49. Les lames peuvent être colorées par différentes méthodes, au Giemsa ou à l'aide de colorants fluorescents spécifiques de l'ADN, par exemple (59). L'emploi d'un colorant spécifique [tel que l'orange d'acridine (61) ou Hoechst 33258 plus pyronine-Y (62)] permet d'éliminer une partie des artefacts dus à l'utilisation d'un colorant non spécifique de l'ADN. Les anticorps anti-kinétochore, la méthode FISH associée à des sonde ADN pancentromériques ou encore le marquage in situ par amorçage à l'aide d'amorces pancentromériques, avec un colorant de contraste de l'ADN approprié, peuvent être utilisés pour identifier le contenu (chromosomes/fragments chromosomiques) des micronoyaux si les informations d'ordre mécanistique concernant leur formation présentent de l'intérêt (15) (16). D'autres méthodes de discrimination des effets clastogènes et aneugènes peuvent être utilisées, à condition que leur efficacité ait été prouvée.

Analyse

50. Toutes les lames, y compris celles du solvant/véhicule et des témoins, sont codées individuellement avant l'analyse au microscope. Il est également possible d'analyser des échantillons codés à l'aide d'un système automatisé et préalablement validé de cytométrie en flux ou d'analyse d'images.

▼M3

51. Dans les cultures traitées à la cytoB, la fréquence des micronoyaux est analysée dans au minimum 2 000 cellules binucléées par concentration (au moins 1 000 cellules binucléées par culture; deux cultures par concentration). Dans le cas de cultures en un seul exemplaire, il conviendra d'examiner au minimum 2 000 cellules binucléées par concentration. Si le nombre de cellules binucléées disponibles pour l'examen de chaque concentration est largement inférieur à 1 000 par culture, ou à 2 000 en cas de culture en un seul exemplaire, et si aucune augmentation significative du nombre de micronoyaux n'est détectée, l'essai devra être renouvelé sur un nombre plus important de cellules, ou à des concentrations moins élevées, suivant la situation. Il convient également de veiller à ne pas comptabiliser les cellules binucléées ayant une forme irrégulière ou dont les deux noyaux présentent une différence de taille trop importante. De même, les cellules binucléées ne doivent pas être confondues avec des cellules multinucléées mal étalées. Les cellules possédant plus de deux noyaux principaux ne sont pas analysées, car la fréquence de référence des micronoyaux est susceptible d'être plus élevée dans ce type de cellules (63) (64). La numération des cellules mononucléées peut être envisagée s'il s'avère que la substance d'essai interfère avec l'action de la cytoB.

52. Pour les lignées cellulaires n'ayant pas reçu de cytoB, il convient d'examiner les micronoyaux d'au moins 2 000 cellules par concentration (1 000 cellules au minimum par culture; deux cultures par concentration). Dans le cas d'une culture en un seul exemplaire par concentration, 2 000 cellules au moins sont examinées.

53. Lorsque l'essai est réalisé en présence de cytoB, il convient de déterminer un CBPI ou un indice de réplication (RI) afin d'évaluer la prolifération cellulaire (voir appendice 2), en utilisant 500 cellules au moins par culture. Lorsque les traitements sont effectués en l'absence de cytoB, il est essentiel de faire la preuve que les cellules analysées ont proliféré (voir paragraphes 24 à 27).

Critères d'acceptabilité

54. Tout laboratoire proposant de recourir à l'essai MNvit décrit dans la présente méthode d'essai démontre qu'il est à même de détecter de manière fiable et précise des substances et mélanges chimiques dont le pouvoir aneugène ou clastogène est connu, avec et sans activation métabolique, ainsi que des substances chimiques négatives connues, en employant les produits chimiques de référence indiqués à l'appendice 3. Pour attester de son aptitude à mettre en œuvre cette méthode d'essai correctement, le laboratoire démontre que les cellules dont les micronoyaux sont dénombrés ont bien effectué une division nucléaire si l'essai est réalisé sans cytoB.

55. Il est recommandé d'utiliser comme produits de référence les produits chimiques figurant à l'appendice 3. Des produits chimiques de substitution ou supplémentaires peuvent être utilisés si leur activité est connue, s'ils induisent la formation de micronoyaux via les mêmes mécanismes d'action et si leur pertinence est prouvée pour les substances d'essai dans le cadre de la procédure MNvit. La justification pourra inclure une étude de validation couvrant une grande diversité de substances ou axée sur un spectre plus étroit, limité à la classe chimique de la substance d'essai ou au mécanisme de lésion étudié.

56. Le témoin du solvant/véhicule et les cultures non traitées présentent des fréquences reproductibles de micronoyaux faibles et cohérentes (de l'ordre de 5 à 25 micronoyaux/1 000 cellules pour les types de cellules cités au paragraphe 11). D'autres types de cellules peuvent présenter des fourchettes de réponse différentes, qui devront être déterminées lors de leur validation pour l'essai MNvit. Il conviendra d'utiliser les données issues des témoins négatifs, du solvant, et positifs pour établir des fourchettes de référence. Ces données serviront à déterminer si les témoins négatifs/positifs sont appropriés pour réaliser un essai.

▼M3

57. S'il est proposé d'apporter de légères modifications au protocole d'essai (par exemple l'utilisation de techniques de numération automatisées et non manuelles, ou le recours à un nouveau type de cellule), l'efficacité de ces changements est démontrée afin que le protocole modifié soit considéré comme acceptable. Il convient notamment de démontrer que les mécanismes principaux de cassure, de perte ou de gain chromosomique peuvent être détectés, et que des résultats positifs et négatifs appropriés peuvent être obtenus pour la classe de la substance concernée, ou pour tout le spectre des substances à tester.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

58. Lorsque la technique du blocage de la cytokinèse est employée, seules les fréquences des cellules binucléées présentant des micronoyaux (indépendamment du nombre de micronoyaux par cellule) sont utilisées pour évaluer l'induction de micronoyaux. La numération des cellules présentant un ou plusieurs micronoyaux est susceptible d'apporter des informations intéressantes, mais est optionnelle.

59. Il convient d'effectuer des mesures parallèles de cytotoxicité et/ou de cytostase pour toutes les cultures traitées et les cultures témoins traitées uniquement avec le solvant/véhicule (58). Il faut également calculer le CBPI ou l'indice de réplication (RI) pour toutes les cultures traitées et témoins, afin de mesurer le retard du cycle cellulaire en cas de recours à la méthode de blocage de la cytokinèse. En l'absence de cytoB, il convient de mesurer le doublement relatif de la population (RPD), l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) ou l'indice de prolifération (PI) (voir appendice 2).

60. Les données sont indiquées individuellement pour chaque culture. En outre, toutes les données sont résumées sous forme de tableaux.

61. Lorsque des produits chimiques induisent la formation de micronoyaux lors de l'essai MNvit, celle-ci est due soit à une cassure chromosomique, soit à une perte chromosomique, soit aux deux évènements combinés. D'autres analyses utilisant des anticorps anti-kinétochores, des sondes centromériques in situ ou d'autres méthodes permettent de déterminer si le mécanisme d'induction des micronoyaux est le résultat d'une activité clastogène et/ou aneugène.

Évaluation et interprétation des résultats

62. Il n'est pas requis de vérifier par le biais d'expériences supplémentaires une réponse positive ou négative claire. Il est possible qu'un résultat ambigu soit clarifié en analysant 1 000 cellules supplémentaires issues de l'ensemble des cultures afin de conserver le caractère aveugle de l'essai. Si cette approche ne permet pas d'obtenir des résultats satisfaisants, des expériences supplémentaires sont réalisées. Dans le cadre des expériences supplémentaires ainsi réalisées, on envisagera de modifier les paramètres de l'étude, afin d'en élargir ou d'en restreindre les conditions, selon le cas. Les paramètres susceptibles d'être modifiés comprennent l'espacement des niveaux de concentration, le calendrier des traitements et de la récolte des cellules et/ou les conditions de l'activation métabolique.

63. Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment une augmentation liée à la concentration ou statistiquement significative du nombre de cellules présentant des micronoyaux. Il convient en premier lieu de prendre en considération la pertinence biologique des résultats. Le fait que les valeurs observées soient ou non comprises dans la fourchette de référence peut fournir des indices utiles à l'évaluation de la signification biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques appropriées (65). Toutefois, les résultats des tests statistiques sont évalués en tenant compte de la relation dose-réponse. La reproductibilité et les données historiques sont également prises en compte.

▼**M3**

64. Bien que la plupart des expériences donnent des résultats clairement positifs ou négatifs, il arrive que l'ensemble des résultats d'un essai ne permette pas un jugement catégorique sur l'activité de la substance d'essai. Ces résultats équivoques ou discutables peuvent survenir indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

65. Des résultats positifs dans un essai MNvit indiquent que la substance d'essai induit une cassure ou une perte chromosomique dans des cellules de mammifère en culture. Des résultats négatifs indiquent que, dans les conditions de l'essai, la substance d'essai n'induit pas de cassure et/ou de gain ou de perte chromosomique dans des cellules de mammifère en culture.

Rapport d'essai

66. Le rapport d'essai contient au minimum les informations suivantes, si elles sont pertinentes pour la conduite de l'étude:

Substance chimique d'essai:

— données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) et numéro CE,

— état physique et pureté,

— propriétés physico-chimiques importantes pour l'exécution de l'essai,

— réactivité de la substance chimique d'essai avec le solvant/véhicule ou le milieu de culture cellulaire.

Solvant/véhicule:

— justification du choix du solvant ou véhicule,

— solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant ou véhicule.

Cellules:

— type et source des cellules utilisées,

— raisons du choix du type cellulaire utilisé,

— absence de mycoplasme, le cas échéant,

— données sur la durée du cycle cellulaire, le temps de doublement ou l'indice de prolifération,

— en cas d'utilisation de lymphocytes, sexe, âge et nombre de donneurs de sang, s'il y a lieu,

— en cas d'utilisation de lymphocytes, préciser si du sang total ou des lymphocytes isolés sont exposés,

— nombre de repiquages, le cas échéant,

— méthodes d'entretien des cultures cellulaires, s'il y a lieu,

— nombre modal de chromosomes,

— durée normale du cycle cellulaire (témoin négatif).

Conditions de l'essai:

— identité de l'éventuel agent de blocage de la cytokinèse utilisé (cytoB, par exemple), sa concentration et la durée d'exposition des cellules,

— justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris données concernant la cytotoxicité et les limites de solubilité, s'il y a lieu,

— composition du milieu et, le cas échéant, concentration de CO_2,

— concentration de la substance d'essai,

▼**M3**

— concentration (et/ou volume) de véhicule et de substance d'essai ajoutés,

— température et temps d'incubation,

— durée du traitement,

— délai de récolte après application,

— densité cellulaire au moment de l'ensemencement, le cas échéant,

— type et composition du système d'activation métabolique, y compris les critères d'acceptabilité,

— témoins positifs et négatifs,

— méthodes de préparation des lames et techniques de coloration utilisées,

— critères d'identification des micronoyaux,

— nombre de cellules analysées,

— méthodes de mesure de la cytotoxicité,

— toute information supplémentaire concernant la cytotoxicité,

— critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque,

— méthode(s) d'analyse statistique utilisée(s),

— méthodes, telles que le recours aux anticorps anti-kinétochores, utilisées pour déterminer si les micronoyaux possèdent des chromosomes entiers ou fragmentés, le cas échéant.

Résultats:

— mesure de cytotoxicité utilisée, par exemple CBPI ou RI dans le cas de la méthode de blocage de la cytokinèse; RICC, RPD ou PI lorsque la méthode de blocage de la cytokinèse n'est pas utilisée; autres observations le cas échéant, telles que degré de confluence cellulaire, apoptose, nécrose, numération des cellules en métaphase, fréquence des cellules binucléées,

— signes de précipitation,

— données sur le pH et l'osmolalité du milieu de traitement, si elles ont été déterminées,

— définition des cellules acceptables pour l'analyse,

— répartition des cellules mono-, bi- et multinucléées en cas d'utilisation d'une méthode de blocage de la cytokinèse,

— nombre de cellules micronucléées, donné séparément pour chaque culture traitée et culture témoin, en précisant si elles proviennent de cellules binucléées ou mononucléées, s'il y a lieu,

— relation concentration-réponse, si possible,

— données (concentrations et solvants) concernant les témoins négatifs (solvant ou véhicule) et positifs concomitants,

— données historiques concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs, y compris ordres de grandeur, moyennes, écarts types et intervalle de confiance (95 % par exemple),

— analyse statistique; valeurs P le cas échéant.

Discussion des résultats

Conclusions

▼M3

BIBLIOGRAPHIE

1. Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test, Mutation Res., 392, 1-4.

2. Parry, J.M. et Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, Mutation Res., 287, 3-15.

3. Fenech, M. et Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, Cytobios., 43, 233-246.

4. Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. et Wakata, A. (2000), Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group, Environ. Mol. Mutagen., 35, 167-172.

5. Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, Nature Protocols, 2(5), 1084-1104.

6. Fenech, M. et Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in-vivo ageing and low dose X-irradiation, Mutation Res., 161, 193-198.

7. Eastmond, D.A. et Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, Environ. Mol. Mutagen., 13, 34-43.

8. Eastmond, D.A. et Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence in-situ hybridisation with chromosome-specific DNA probes, Mutation Res., 234, 9-20.

9. Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. et Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, 6, 297-302.

10. Farooqi, Z., Darroudi, F. et Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence in-situ hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, Mutagenesis, 8, 329-334.

11. Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. et Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe, Mutation Res., 319, 205-213.

12. Norppa, H., Renzi, L. et Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization, Mutagenesis, 8, 519-525.

13. Eastmond, D.A, Rupa, D.S. et Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence in situ hybridization with DNA probes, Mutation Res., 322, 9-20.

14. Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. et Bentley, K.S. (1996), Fluorescence in situ hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, Mutation Res., 372, 233-245.

15. Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. et Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence in situ hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, Mutation Res., 372, 211-219.

16. Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. et Wakata, A. (2003), Report from the in vitro micronucleus assay working group, Mutation Res., 540, 153-163.

▼M3

17. OCDE (1997), Essai d'aberration chromosomique in vitro chez les mammifères, Ligne directrice nº 473, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OECD, Paris.[disponible à l'adresse: www.oecd.org/env/testguidelines].

18. Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. et Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on in vitro micronucleus test, I. General conditions and overall conclusions of the study. Mutation Res., 607, 13-36.

19. Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. et Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test. II. Using human lymphocytes, Mutation Res., 607, 37-60.

20. Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. et Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test, III. Using CHO cells. Mutation Res., 607, 61-87.

21. Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. et Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. Mutation Res., 607, 88-124.

22. Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. et Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test, V. Using L5178Y cells. Mutation Res., 607, 125-152.

23. Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. et Locher, F. (1997), Detailed data on in vitro MNT and in vitro CA: industrial experience, Mutation Res., 392, 187-208.

24. Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. et Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience, Mutation Res., 392, 45-59.

25. Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. et Madle, S. (1998), Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test, Gesellschaft fur Umwelt-Mutationsforschung. Mutation Res., 410, 81-116.

26. Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. et Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, Mutation Res. 439, 183-190.

27. Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. et Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, Mutation Res. 445, 55-71.

28. von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. et Madle, S. (2000), In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances, Mutation Res., 468, 137-163.

29. Garriott, M.L., Phelps, J.B. et Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the in vitro micronucleus test. I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, Mutation Res., 517, 123-134.

30. Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. et Sofuni, T. (1999), Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), Mutagenesis, 14, 569-580.

▼M3

31. Elhajouji, A., et Lorge, E. (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on in vitro micronucleus test, Mutation Res., 607, 1-152.

32. CEVMA (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosome aberration assay for genotoxicity testing, 25e réunion de l'ESAC, 16-17 novembre, 2006, disponible à l'adresse: http://ecvam.jrc.it/index.htm (en anglais).

33. ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the In Vitro Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, Disponible à l'adresse: http://ecvam.jrc.it/index.htm (en anglais).

34. Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of in vitro Micronucleus Test (MNT), Mutagenesis, 23, 271-283.

35. Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. et Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the in vitro micronucleus test, Mutation Res., 347, 105-115.

36. Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. et Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, Mutagenesis, 17, 257-260.

37. Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. et Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, Toxicol., 198, 315-328.

38. Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. et Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, Mutation Res., 392, 61-70.

39. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. et Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-205.

40. Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. et Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, Mutation Res., 268, 297-305.

41. Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

42. Fenech, M. et Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, Mutation Res., 147, 29-36.

43. Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, Mutation Res., 392, 11-18.

44. Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. et Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, Environ. Mol. Mutagen. 37, 31-45.

▼M3

45. Maron, D.M. et Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutation Res., 113, 173-215.

46. Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. et Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, J. Environ. Pathol. Toxicol., 4, 55-65.

47. Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. et Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in-vitro genotoxicity assays, Mutagenesis, 7, 175-177.

48. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. et Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, In: de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds). In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, p. 85-88.

49. Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. et Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.

50. PNUE (2001), Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants, Programme des Nations unies pour l'environnement (ONUE). Disponible sur: [http://www.pops.int/] (en anglais).

51. Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. et Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, Mutagenesis, 11, 247-274.

52. Krahn, D.F., Barsky, F.C. et McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents, New York, Plenum, p. 91-103.

53. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. et Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, Environ. Mutagenesis 5, 795-801.

54. Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, Mutation Res., 285, 35-44.

55. Phelps, J.B., Garriott, M.L., et Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the in vitro micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, Mutation Res., 521, 103-112.

56. Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. et Wakata, A. (2004), Corrigendum to «Report from the in vitro micronucleus assay working group», Mutation Res., 564, 97-100.

57. Pincu, M., Bass, D. et Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, Mutation Res., 139, 61-65.

58. Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. et Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test, I. Theoretical aspects, Mutation Res., 655, 1-3.

59. Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. et Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, Mutation Res., 341, 169-184.

60. Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, Environ. Molec. Mutagenesis 35, 191-201.

▼**M3**

61. Hayashi, M., Sofuni, T., et Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, Mutation Res., 120, 241-247.

62. MacGregor, J. T., Wehr, C. M., et Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, Mutation Res., 120, 269-275.

63. Hayashi, M., Sofuni, T. et Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Res., 120, 241-247.

64. Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. et Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, Mutation Res., 534, 65-75.

65. Hoffman, W.P., Garriott, M.L. et Lee, C. (2003), In vitro micronucleus test. In: Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second edition, S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, p. 463-467.

66. Règlement (CE) n° 850/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 concernant les polluants organiques persistants et modifiant la directive 79/117/CEE, JO L 229 du 30.4.2004, p. 5.

▼M3

Appendice 1

Définitions

Aneugène: Substance ou processus qui, *via* des interactions avec les composants de la cellule mitotique ou méiotique lors de la division cellulaire, provoque la formation de cellules ou d'organismes aneuploïdes.

Aneuploïdie: Tout écart par rapport au nombre diploïde (ou haploïde) normal de chromosomes, d'un seul ou de plusieurs chromosomes, mais non d'un ou de plusieurs jeux de chromosomes (polyploïdie).

Apoptose: Mort cellulaire programmée caractérisée par une succession d'étapes menant à la désintégration des cellules en particules membranaires qui sont ensuite éliminées par phagocytose ou par excrétion.

Augmentation relative du nombre de cellules (Relative increase in cell count, RICC): Méthode de mesure de la cytotoxicité lorsque la cytoB n'est pas utilisée (voir formule à l'appendice 2).

Cellules en interphase: Cellules qui ne sont pas en phase de mitose.

Centromère: Région de l'ADN d'un chromosome où les deux chromatides sont reliées entre elles et sur laquelle les deux kinétochores sont fixés côte à côte.

Clastogène: Substance ou processus induisant des aberrations chromosomiques structurelles dans des populations cellulaires ou des organismes.

Cytokinèse: Processus de division cellulaire survenant immédiatement après la mitose pour former deux cellules-filles, contenant chacune un noyau unique.

Cytostase: Inhibition de la croissance cellulaire (voir formule à l'appendice 2).

Cytotoxicité: Effets dommageables sur la structure ou les fonctions cellulaires, entraînant *in fine* la mort cellulaire.

Doublement relatif de la population (Relative Population Doubling, RPD): Méthode de mesure de la cytotoxicité lorsque la cytoB n'est pas utilisée (voir formule à l'appendice 2).

Génotoxique: Terme générique qualifiant tous les types de lésions de l'ADN ou des chromosomes, tels que les cassures, adduits, remaniements, mutations, aberrations chromosomiques et aneuploïdies. Tous les types d'effets génotoxiques n'entraînent pas nécessairement de mutations ou de lésions chromosomiques stables.

Indice de prolifération (PI): Méthode de mesure de la cytotoxicité lorsque la cytoB n'est pas utilisée (voir formule à l'appendice 2).

Indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (Cytokinesis-Block Proliferation Index, CBPI): Proportion de cellules issues de la deuxième division dans la population traitée par rapport au témoin non traité (voir formule à l'appendice 2).

Indice de réplication (Replication Index, RI): Rapport entre le nombre de cycles de division cellulaire achevés dans une culture traitée et ce même nombre dans le témoin non traité, au cours de la période d'exposition et de récupération (voir formule à l'appendice 2).

Indice mitotique: Rapport entre le nombre de cellules en métaphase et le nombre total de cellules observées dans une population cellulaire; il donne une indication du degré de prolifération cellulaire de cette population.

Kinétochore: Assemblage de protéines situé au niveau du centromère d'un chromosome, auquel sont associées les fibres fusoriales lors de la division cellulaire, permettant le mouvement ordonné des chromosomes-fils vers les pôles des cellules-filles.

▼**M3**

Micronoyau: Petit noyau, venant s'ajouter au noyau principal de la cellule et séparé de celui-ci, formé lors de la télophase de la mitose ou de la méiose à partir de chromosomes entiers ou de fragments de chromosomes retardataires.

Mitose: Division du noyau cellulaire, généralement décomposée en prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase.

Mutagène: Se dit d'un agent produisant une modification héréditaire portant sur une ou plusieurs séquences de paires de bases d'ADN génique, ou sur la structure de chromosomes (aberrations chromosomiques).

Non-disjonction: Non-séparation d'une paire de chromatides, qui ne parviennent donc pas à migrer correctement lors de la division cellulaire, ce qui entraîne la présence d'un nombre anormal de chromosomes dans les cellules-filles.

Polyploïdie: Aberrations chromosomiques numériques dans des cellules ou des organismes, impliquant un ou plusieurs jeux de chromosomes et non un ou plusieurs chromosomes isolés (aneuploïdie).

Prolifération cellulaire: Augmentation du nombre de cellules résultant de la division cellulaire mitotique.

Substance chimique d'essai (également dénommée substance d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

▼M3

Appendice 2

Formules pour l'évaluation de la cytotoxicité

1. *En cas d'utilisation de la cytoB,* l'évaluation de la cytotoxicité se fonde sur l'indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (CBPI) ou sur l'indice de réplication (RI) (16) (58). Le CBPI indique le nombre moyen de cycles cellulaires par cellule effectués au cours de la période d'exposition à la cytoB, et peut servir au calcul de la prolifération cellulaire. Le RI indique le nombre relatif de noyaux présents dans les cultures traitées par rapport aux cultures témoin, et peut servir au calcul du pourcentage de cytostase:

$$\% \text{ cytostase} = 100 - 100\{(CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1)\}$$

Avec:

T = culture traitée avec la substance chimique d'essai

C = culture témoin véhicule

Où:

$$CBPI = \frac{((\text{nb de cellules mononucléées}) + (2 \times \text{nb de cellules binucléées}) + (3 \times \text{nb de cellules multinucléées}))}{(\text{Nombre total de cellules})}$$

Ainsi, un CBPI égal à 1 (toutes les cellules sont mononucléées) équivaut à une cytostase de 100 %.

$$\text{Cytostase} = 100 - RI$$

$$RI = \frac{((\text{Nb de cellules binucléées}) + (2 \times \text{nb de cellules multinucléées})) \div (\text{Nombre total de cellules})_T}{((\text{Nb de cellules binucléées}) + (2 \times \text{nb de cellules multinucléées})) \div (\text{Nombre total de cellules})_C} \times 100$$

T = cultures traitées

C = cultures témoins

2. Ainsi, un RI de 53 % signifie que, par rapport au nombre de cellules ayant effectué une division cellulaire pour former des cellules binucléées et multinucléées dans la culture témoin, 53 % seulement de ces cellules ont effectué une division dans la culture traitée, soit une cytostase de 47 %.

3. *En l'absence d'utilisation de cytoB,* l'évaluation de la cytotoxicité sur la base de l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) ou du doublement relatif de la population (RPD) est recommandée (58), ces deux mesures tenant compte de la proportion de cellules ayant effectué une division cellulaire.

$$RICC = \frac{(\text{Augmentation du nombre de cellules dans les cultures traitées (final – initial)})}{(\text{Augmentation du nombre de cellules dans les cultures téémoins (final – initial)})} \times 100$$

$$RPD = \frac{(\text{Nombre de doublements de population dans les cultures traitées})}{(\text{Nombre de doublements de population dans les cultures téémoins})} \times 100$$

▼**M3**

où:

Doublement de population = [log (nombre de cellules postapplication ÷ nombre de cellules initial)] ÷ log 2

4. Ainsi, un RICC ou un RDP de 53 % indique une cytotoxicité/cytostase de 47 %.

5. En utilisant l'Indice de prolifération (PI), la cytotoxicité peut être évaluée via le comptage du nombre de clones composés de 1 cellule (cl1), 2 cellules (cl2), 3 à 4 cellules (cl4) et 5 à 8 cellules (cl8)

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. Le PI est également un paramètre fiable et utile de cytotoxicité pour les lignées cellulaires cultivées in situ en l'absence de cytoB (25) (26) (27) (28).

▼**M3**

Appendice 3

Produits chimiques de référence recommandés pour évaluer l'efficacité [1]

Catégorie	Produit chimique	Numéro CAS	N° CE
1. Clastogènes actifs sans activation métabolique			
	Cytosine arabinoside	147-94-4	205-705-9
	Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
2. Clastogènes nécessitant une activation métabolique			
	Benzo(a)pyrène	50-32-8	200-028-5
	Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
3. Aneugènes			
	Colchicine	64-86-8	200-598-5
	Vinblastine	143-67-9	205-606-0
4. Témoins négatifs			
	Di(2-éthylhexyl)phthalate	117-81-7	204-211-0
	Acide nalidixique	389-08-2	206-864-7
	Pyrène	129-00-0	204-927-3
	Chlorure de sodium	7647-14-5	231-598-3

[1] Ces produits chimiques de référence sont ceux dont l'utilisation est recommandée. La substitution ou l'ajout de produits chimiques à cette liste de référence est possible si l'activité des produits en question est connue, s'ils induisent la formation de micronoyaux via les mêmes mécanismes d'action, et si leur pertinence est prouvée pour les substances d'essai dans le cadre de la procédure MNvit. Suivant l'objectif visé, la justification pourra aussi inclure une étude de validation couvrant une grande diversité de substances ou axée sur un spectre plus étroit, limité à la classe chimique de la substance d'essai ou au mécanisme de lésion examiné.

▼M3

B.50. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES: DA

INTRODUCTION

1. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques et les méthodes d'essai de l'Union européenne sont régulièrement mises à jour à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La première méthode d'essai (B.42) visant à déterminer la sensibilisation cutanée chez la souris, c'est-à-dire l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL, LD 429 de l'OCDE), a été mise à jour (1). Les détails de la validation de l'ELGL et une synthèse des travaux qui y sont associés ont été publiés (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). La méthode ELGL s'appuie un marquage radioisotopique par la thymidine ou l'iode pour mesurer la prolifération des lymphocytes, ce qui limite son application lorsque l'acquisition, l'utilisation et l'élimination de produits radioactifs posent problème. L'ELGL: DA (développé par Daicel Chemical Industries, Ltd.) est une variante non radioactive de l'ELGL, qui quantifie l'adénosine triphosphate (ATP) par bioluminescence pour estimer la prolifération des lymphocytes. La méthode ELGL: DA a été validée, et évaluée et recommandée par un comité international d'examen, qui a reconnu son utilité pour identifier, dans certaines limites, les substances d'essai ayant ou non un effet sensibilisant sur la peau (10) (11) (12) (13). La présente méthode d'essai permet d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée de substances chimiques (substances et mélanges) chez les animaux. Le chapitre B.6 de la présente annexe et la LD 406 de l'OCDE font appel à des essais sur cobayes, notamment l'essai de maximisation sur le cobaye et l'essai de Buehler (14). L'ELGL (chapitre B.42 de la présente annexe, LD 429 de l'OCDE) et ses deux variantes non radioactives, ELGL: DA (chapitre B.50 de la présente annexe, LD 442 A de l'OCDE) et ELGL: BrdU-ELISA (chapitre B.51 de la présente annexe, LD 442 B de l'OCDE), sont toutes plus intéressantes que les essais sur cobayes décrits dans le chapitre B.6 et la LD 406 de l'OCDE (14) en termes de réduction et de raffinement de l'utilisation des animaux.

2. À l'instar de l'ELGL, la méthode ELGL: DA s'intéresse à la phase d'induction de la sensibilisation cutanée et fournit des données quantitatives permettant d'évaluer la relation dose-effet. Par ailleurs, en détectant les sensibilisants cutanés sans recourir au radiomarquage de l'ADN, cette technique évite les risques professionnels liés à l'exposition aux rayonnements et les problèmes de gestion des déchets. En revanche, elle pourrait se traduire par une hausse du nombre de souris utilisées pour détecter les sensibilisants cutanés, entraînant néanmoins la diminution du nombre de cobayes mis à contribution à ces mêmes fins (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (14).

DÉFINITIONS

3. Les définitions utilisées sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

4. La méthode ELGL: DA est une variante de l'ELGL visant à identifier les substances d'essai susceptibles d'induire une sensibilisation cutanée, dans des limites spécifiques. Cela n'implique pas que l'ELGL: DA doive systématiquement remplacer l'ELGL ou les essais sur cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (14), mais plutôt qu'il s'agit d'un outil d'une qualité égale pouvant se substituer à ces méthodes, et dont les résultats positifs et négatifs n'ont généralement plus besoin de confirmation supplémentaire (10) (11). Avant de procéder à l'essai, le laboratoire rassemble toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, à savoir son identité et sa structure

▼M3

chimiques, ses propriétés physico-chimiques, les résultats de tous les autres essais de toxicité in vitro et in vivo, et les données toxicologiques sur des analogues de structure. Ces informations servent à déterminer s'il est pertinent d'appliquer la méthode ELGL: DA avec la substance d'essai considérée, étant donné l'incompatibilité de certains types de substances chimiques avec l'ELGL: DA (voir paragraphe 5), et aider à choisir les doses appropriées.

5. La méthode ELGL: DA, mise en œuvre in vivo, ne met donc pas un terme à l'utilisation d'animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. Néanmoins, comparée aux essais avec cobayes (B.6, LD 406 de l'OCDE), elle est susceptible de réduire le nombre d'animaux utilisés à cette même fin (14). En outre, l'ELGL: DA propose un raffinement important (réduction du stress et de la douleur) de l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact, dans la mesure où, à la différence du chapitre B.6 et de la LD 406 de l'OCDE (51), l'ELGL: DA n'est pas fondé sur le déclenchement de réactions d'hypersensibilité cutanée par une exposition de déclenchement. Malgré les avantages de l'ELGL: DA par rapport au chapitre B.6 et à la LD 406 de l'OCDE (14), certaines limites peuvent imposer de privilégier le chapitre B.6 ou la LD 406 de l'OCDE [par exemple, essai de certains métaux, résultats faussement positifs avec certaines substances irritantes pour la peau, en particulier des tensioactifs (6) (1 et chapitre B.42 de la présente annexe), solubilité de la substance d'essai.] De surcroît, certaines substances chimiques ou familles de substances d'essai comprenant des groupements fonctionnels dont il est démontré qu'ils peuvent être des facteurs de confusion (16) peuvent aussi imposer le recours aux essais avec cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (14). Il est recommandé de considérer les limites identifiées pour l'ELGL (1 et chapitre B.42 de la présente annexe) comme étant également valables pour l'ELGL: DA (10). Il se peut en outre que la méthode ELGL: DA ne convienne pas aux substances qui modifient les niveaux d'ATP (c'est-à-dire qui agissent comme inhibiteurs de l'ATP) ou perturbent la quantification précise de l'ATP intracellulaire (par exemple, présence d'enzymes dégradant l'ATP, présence d'ATP extracellulaire dans le ganglion lymphatique). Dans ces limites, l'ELGL: DA est applicable à toute substance d'essai qui ne présente pas de propriétés susceptibles d'affecter la précision de l'essai. De plus, il convient de prendre en compte l'éventualité de résultats positifs limites pour lesquels l'indice de stimulation (IS) est situé entre 1,8 et 2,5 (voir paragraphes 31-32). En effet, d'après la base de données de validation portant sur 44 substances présentant un IS $\geq$ 1,8 (voir paragraphe 6), l'ELGL: DA a correctement identifié l'ensemble des 32 sensibilisants (d'après l'ELGL), mais a donné des résultats positifs pour trois des 12 substances non sensibilisantes présentant des indices de stimulation compris entre 1,8 et 2,5 (c'est-à-dire des résultats positifs limites) (10). Cependant, comme le même ensemble de données a été utilisé pour établir les valeurs IS et pour calculer les propriétés prédictives de l'essai, les résultats indiqués pourraient surestimer les propriétés prédictives réelles.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

6. L'ELGL: DA repose sur le principe que les sensibilisants induisent une prolifération de lymphocytes dans les ganglions lymphatiques drainant le site de l'application de la substance d'essai. Cette prolifération est proportionnelle à la dose appliquée et à la puissance de l'allergène et permet d'obtenir facilement une mesure quantitative de la sensibilisation. Pour mesurer la prolifération, on compare la prolifération moyenne de chaque groupe d'essai à la prolifération moyenne du groupe témoin traité avec le véhicule (TV). On calcule le quotient de la prolifération moyenne dans chaque groupe traité sur celle du TV, pour obtenir l'indice de stimulation (IS); si cette valeur est supérieure ou égale à 1,8, on peut

▼M3

ensuite poursuivre l'évaluation du pouvoir de sensibilisation cutanée de la substance d'essai. Les procédures décrites ici s'appuient sur la quantification de l'ATP par bioluminescence (facteur connu pour être en corrélation avec le nombre de cellules vivantes) (17) pour indiquer l'augmentation du nombre de cellules en prolifération dans les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage (18) (19). Cette technique par bioluminescence utilise l'enzyme luciférase pour catalyser la formation de lumière à partir d'ATP et de luciférine selon la réaction suivante:

$$ATP + Luciférine + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxyluciférine + AMP + PP_i + CO_2 + Lumière$$

L'intensité de la lumière émise suit une pente linéaire en fonction de la concentration en ATP, et se mesure à l'aide d'un luminomètre. L'essai luciférine-luciférase constitue une méthode précise pour quantifier l'ATP et trouve de nombreuses applications (20).

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Choix des espèces animales

7. L'espèce retenue pour cet essai est la souris. Les études de validation de l'ELGL: DA ont été menées exclusivement avec la souche CBA/J, qui sera donc privilégiée pour cet essai (12) (13). On utilise de jeunes femelles adultes, nullipares et non gravides. Au début de l'étude, les animaux sont âgés de 8 à 12 semaines et affichent une variation de poids minime entre eux n'excédant pas 20 pour cent du poids moyen. Il est aussi possible d'utiliser d'autres souches ainsi que des mâles s'il existe suffisamment d'informations démontrant l'absence de différences significatives entre les souches et/ou les sexes en ce qui concerne la réaction à l'ELGL: DA.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

8. Les souris sont hébergées par groupes (21), sauf si une raison scientifique pertinente exige un encagement individuel. La température de l'animalerie d'expérience est maintenue à 22 °C ± 3 °C. L'humidité relative atteint au moins 30 % et de préférence ne dépasse pas 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit maintenue aux alentours de 50-60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux peuvent être alimentés par un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété.

Préparation des animaux

9. Les animaux sont sélectionnés au hasard, marqués pour permettre leur identification individuelle (mais jamais sur l'oreille) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours avant le commencement du traitement afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Avant de commencer le traitement, on examine tous les animaux pour vérifier qu'ils ne présentent pas de lésions cutanées observables.

Préparation des solutions d'essai

10. Les substances d'essai solides sont dissoutes ou dispersées dans des solvants/véhicules puis diluées, s'il y a lieu, avant d'être appliquées sur l'oreille des souris. Les substances d'essai liquides peuvent être appliquées pures ou préalablement diluées. Les substances d'essai insolubles, comme celles que l'on rencontre généralement dans les dispositifs médicaux, sont soumises à une extraction forcée à l'aide d'un solvant approprié pour faire ressortir tous les composants extractibles qu'il est possible d'évaluer, avant l'application sur l'oreille des souris. Les substances d'essai sont préparées chaque jour à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'elles peuvent être stockées.

▼M3

Contrôle de la fiabilité

11. Les témoins positifs (TP) servent à démontrer le bon fonctionnement de l'essai en répondant de manière adéquate et reproductible aux sensibilisants pour lesquels l'ordre de grandeur des effets est bien connu. Il est recommandé d'inclure un TP concurrent puisqu'il démontre la capacité du laboratoire à mener chaque essai correctement, et permet d'évaluer la comparabilité et la reproductibilité intra- et interlaboratoires. Par ailleurs, dans la mesure où certaines autorités réglementaires exigent un TP dans chaque essai, les expérimentateurs sont encouragés à consulter les autorités concernées avant de mener l'ELGL: DA. En conséquence, le recours systématique à un TP concurrent est recommandé pour éviter d'avoir à réaliser des essais supplémentaires sur animaux, ce qui est parfois exigé lorsqu'un laboratoire se réfère à un TP testé périodiquement (voir paragraphe 12). Le TP doit réagir positivement à l'ELGL: DA pour un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de stimulation d'au moins 1,8 point par rapport au groupe témoin négatif (TN). La dose de TP sera choisie de manière à ne pas entraîner d'irritation cutanée excessive ou de toxicité systémique, l'induction devant être reproductible sans être exagérée (un IS > 10 sera considéré comme excessif, par exemple). Les TP utilisés en priorité sont l'hexyl cinnamaldéhyde à 25 % (Nº CAS [Chemical Abstracts Service] 101-86-0) et l'eugénol à 25 % (Nº CAS 97-53-0) dans un mélange acétone/huile d'olive (4:1, v/v). Dans certains cas, d'autres substances d'essai répondant aux critères susmentionnés pourront être employées comme témoins positifs, à condition que ce choix soit correctement justifié.

12. Si l'inclusion d'un groupe TP concurrent demeure recommandée, des essais périodiques (c'est-à-dire à intervalles ≤ 6 mois) du TP peuvent dans certains cas convenir pour les laboratoires menant régulièrement (c'est-à-dire au moins une fois par mois) des ELGL: DA et disposant d'une base de données de référence montrant que le laboratoire est apte à obtenir des résultats précis et reproductibles avec les TP. La capacité d'un laboratoire à mener l'ELGL: DA est efficacement démontrée quand le TP déclenche des résultats positifs cohérents à l'issue d'un minimum de 10 essais indépendants étalés sur une période raisonnable (c'est-à-dire inférieure à un an).

13. Il convient d'inclure un groupe TP concurrent à chaque fois que le protocole de l'ELGL: DA est modifié (par exemple si des modifications interviennent au niveau du personnel qualifié, des composés et/ou réactifs utilisés pour la méthode d'essai, de l'équipement mis en œuvre, ou de la source d'animaux d'expérience), et ces changements sont documentés dans les rapports de laboratoire. Il faudra tenir compte de l'impact de ces changements sur la validité des données de la base historique pour décider de l'opportunité d'établir une nouvelle base de données afin d'évaluer la cohérence des résultats relatifs au TP.

14. Les investigateurs gardent à l'esprit que tester le TP périodiquement plutôt que systématiquement comme concurrent pèse sur la précision et l'acceptabilité des résultats négatifs obtenus à l'issue d'un essai sans TP concurrent réalisé dans l'intervalle entre chaque essai périodique du TP. Par exemple, si un essai périodique du TP donne un faux négatif, l'ensemble des résultats négatifs obtenus depuis le dernier essai de TP valable pourront être remis en question. Il faut donc soigneusement considérer les implications de telles retombées avant de décider si les TP seront des concurrents systématiques ou s'ils feront l'objet d'essais périodiques. Par ailleurs, le nombre d'animaux du groupe TP concurrent sera réduit si cela se justifie du point de vue scientifique et si le laboratoire démontre, en s'appuyant sur ses propres données historiques, que l'on peut utiliser moins de souris (22).

▼M3

15. Quoique le témoin positif soit testé dans un véhicule produisant un effet constant (par exemple acétone: huile d'olive; 4:1, v/v), certaines situations réglementaires peuvent aussi nécessiter l'utilisation d'un véhicule moins courant (mélange cliniquement ou chimiquement pertinent) (23). Si le TP concurrent est testé avec un véhicule différent de celui de la substance d'essai, il convient de mettre en place un TV indépendant pour le TP concurrent.

16. Lorsqu'il s'agit d'évaluer des substances appartenant à une classe chimique particulière, ou donnant des résultats situés dans une certaine fourchette, des substances étalons peuvent s'avérer utiles pour montrer que la méthode d'essai fonctionne correctement et permet de détecter le pouvoir de sensibilisation cutanée de ces types de substance. Les substances étalons présentent les propriétés suivantes:

— similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances à tester,

— caractéristiques physiques et chimiques connues,

— données obtenues avec l'ELGL: DA,

— données obtenues avec d'autres modèles animaux et/ou l'être humain.

MODE OPÉRATOIRE

Nombre d'animaux et doses

17. On utilise au moins quatre animaux par groupe de dose, et un minimum de trois concentrations de la substance d'essai, ainsi qu'un groupe TN concurrent ne recevant que le véhicule de cette substance d'essai et un groupe TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15). On peut envisager de tester différentes doses de TP, en particulier quand celui-ci ne fait l'objet que d'essais périodiques. Mis à part l'absence de traitement par la substance d'essai, les animaux des groupes témoins sont manipulés et traités de la même manière que les animaux des groupes d'essai.

18. La sélection des doses et du véhicule suit les recommandations données dans les références (2) et (24). Les doses successives sont normalement choisies dans une série de concentrations appropriée telle que 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0,5 %, etc. Le choix de la série utilisée est scientifiquement justifié. Le cas échéant, toutes les informations existantes d'ordre toxicologique (par exemple sur la toxicité aiguë et l'irritation cutanée), structural et physico-chimique sur la substance d'essai en question (et/ou ses analogues de structure) sont prises en compte pour choisir les trois concentrations successives de manière que la plus élevée d'entre elles offre une exposition maximale tout en évitant la toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive (24) (25). En l'absence de telles informations, un essai préliminaire peut s'avérer nécessaire (voir paragraphes 21-24).

19. Il convient que le véhicule ne perturbe pas et n'introduise pas un biais dans les résultats du test. Il est choisi de manière à optimiser la solubilité pour obtenir la concentration la plus élevée possible dans la préparation d'une solution/suspension adaptée à l'application de la substance d'essai. Les véhicules recommandés sont le mélange acétone/huile d'olive (4:1 v/v), le N,N-diméthylformamide, la méthyléthylcétone, le propylène glycol et le diméthylsulfoxyde (6) mais d'autres véhicules pourront également être utilisés à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. Certaines situations réclament un témoin supplémentaire, à savoir un solvant qui se justifie sur le plan clinique ou le mélange dans lequel la substance d'essai est commercialisée. L'expérimentateur veille tout particulièrement à ce que les substances hydrophiles soient incorporées à un véhicule qui mouille la peau et ne ruisselle pas immédiatement, ce qui peut nécessiter l'ajout de solubilisants appropriés (par exemple Pluronic® L92 à 1 %). Il convient donc d'éviter les véhicules totalement aqueux.

▼M3

20. Le traitement des ganglions lymphatiques de chaque souris permet d'évaluer la variabilité entre individus et de comparer statistiquement les réponses induites par la substance d'essai et par le véhicule témoin (voir paragraphe 33). En outre, il n'est envisageable de réduire le nombre d'animaux du groupe TP qu'en se fondant sur des données individuelles (22). Du reste, certaines autorités réglementaires exigent la collecte de données pour chaque animal. Relever régulièrement les données propres à chaque individu contribue au bien-être des animaux en évitant les essais dupliqués qui seraient nécessaires si les résultats obtenus d'une autre manière (par exemple avec des données par groupe d'animaux) devaient être soumis à des autorités réglementaires ayant d'autres exigences (en particulier la fourniture de données individuelles).

Essai préliminaire

21. En l'absence d'informations permettant d'estimer la concentration d'essai maximale (voir paragraphe 18), il convient d'effectuer un essai préliminaire afin de déterminer le niveau des doses adaptées à l'ELGL: DA. Cet essai préliminaire aide à quantifier la dose maximale à mettre en œuvre dans l'ELGL: DA lorsqu'on ne dispose pas d'informations sur la concentration induisant une toxicité systémique (voir paragraphe 24) et/ou une irritation cutanée locale excessive (voir paragraphe 23). Cette concentration maximum de la substance d'essai est de 100 % pour les liquides, ou la plus élevée possible pour les solides et suspensions.

22. Les conditions de l'essai préliminaire sont les mêmes que celles de l'ELGL: DA, à ceci près qu'il n'y a pas d'évaluation de la prolifération dans les ganglions lymphatiques et que l'on peut inclure moins d'animaux par groupe de dose. En effet, on suggère d'utiliser seulement un à deux individus par groupe de dose. Il convient d'examiner toutes les souris quotidiennement afin de déceler d'éventuels signes cliniques de toxicité systémique ou d'irritation locale sur le site d'application. Les poids corporels sont consignés préalablement à l'essai et juste avant la fin de l'essai (huitième jour). On examine les deux oreilles de chaque souris pour détecter la présence d'un éventuel érythème, le résultat étant noté conformément à l'échelle figurant dans le tableau 1 (25). L'épaisseur de l'oreille est mesurée à l'aide d'une jauge d'épaisseur (par exemple micromètre numérique ou jauge d'épaisseur Peacock Dial) le premier jour (avant toute application), le troisième jour (environ 48 heures après la première dose), le septième jour (24 heures avant la fin) et le huitième jour. De plus, au huitième jour cette épaisseur peut être déterminée à partir du poids d'un échantillon d'oreille, prélevé après l'euthanasie des animaux. Les irritations locales excessives se traduisent par une cotation de l'érythème ≥ 3 et/ou un épaississement de l'oreille d'au moins 25 %, quel que soit le jour de la mesure (26) (27). La dose maximale choisie pour l'étude ELGL: DA principale sera la dose immédiatement inférieure dans la série de concentrations utilisée pour l'essai préliminaire (voir paragraphe 18) qui n'induit pas une toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive.

Tableau 1

Cotation de l'érythème

Observation	Résultat
Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2

▼M3

Observation	Résultat
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarre empêchant la cotation de l'érythème	4

23. Outre un épaississement de l'oreille de 25 % (26) (27), une augmentation statistiquement significative de l'épaisseur de l'oreille chez les souris traitées par rapport aux individus témoins a également été utilisée pour identifier des produits irritants dans l'ELGL (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Cependant, les augmentations statistiquement significatives inférieures à 25 % ne sont pas systématiquement associées à une irritation excessive (30) (31) (32) (33) (34).

24. Les observations cliniques suivantes peuvent indiquer une toxicité systémique (35) dans le cadre d'une évaluation intégrée, et ainsi permettre d'estimer la dose maximale à utiliser dans l'ELGL: DA principal: modifications des fonctions nerveuses (par exemple, pilo-érection, ataxie, tremblements et convulsions); changements du comportement (par exemple, agressivité, activités de toilettage modifiées, changement marqué d'intensité de l'activité); troubles respiratoires (en termes de fréquence et d'intensité de la respiration, sous forme de dyspnée, halètements ou râles), et modifications de la consommation d'aliments et d'eau. En outre, l'évaluation prendra en compte les éléments suivants: signes de léthargie et/ou absence de réceptivité, et tout signe clinique autre qu'une douleur et un stress légers ou passagers; baisse du poids corporel > 5 % entre le premier et le huitième jour; mortalité. Les animaux moribonds ou montrant des signes de douleur et de stress aigus sont euthanasiés (36).

Programme expérimental de l'étude principale

25. Le programme expérimental se déroule comme suit:

— *Premier jour:* Mesurer et consigner le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Appliquer une solution aqueuse de sodium lauryl sulfate (SLS) à 1 % au dos de chaque oreille à l'aide d'un pinceau trempé dans la solution de SLS de manière à couvrir l'ensemble de la surface externe en quatre à cinq applications. Une heure après le traitement au SLS, appliquer 25 µL d'une dilution adaptée de la substance d'essai, du véhicule seul ou du TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15), au dos de chaque oreille.

— *Deuxième, troisième et septième jours:* Répéter le prétraitement avec la solution aqueuse de SLS à 1 % puis l'application de la substance d'essai en suivant la même procédure que le premier jour.

— *Quatrième, cinquième et sixième jours:* Aucun traitement.

— *Huitième jour:* Noter le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Environ 24 à 30 heures après le début des applications du septième jour, euthanasier les animaux. Exciser les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage de chaque oreille de souris et les placer séparément dans une solution saline tamponnée au phosphate [phosphate buffered saline] (PBS). Les détails et diagrammes relatifs à l'identification et à la dissection des ganglions lymphatiques sont présentés dans la référence (22). Pour approfondir le suivi de la réponse cutanée locale dans l'essai principal, des paramètres supplémentaires comme la cotation de l'érythème auriculaire ou les mesures de l'épaisseur de l'oreille (obtenues à l'aide d'une jauge d'épaisseur ou par pesée d'échantillons d'oreilles après nécropsie) peuvent être inclus dans le protocole d'étude.

▼M3

Préparation des suspensions cellulaires

26. Pour chaque souris, on prépare une suspension de cellules isolées provenant des ganglions lymphatiques (CGL) excisés bilatéralement en plaçant ces ganglions entre deux lames de verres sur lesquelles on exerce une légère pression pour écraser les échantillons. Après avoir vérifié que le tissu est bien étalé, séparer les deux lames. Pour disperser le tissu présent sur ces lames dans le PBS, incliner chacune d'elle au-dessus de la boîte de Pétri, puis racler le tissu avec un grattoir à cellules tout en rinçant avec la solution. Les ganglions lymphatiques des animaux TN étant petits, il convient de les traiter avec soin pour éviter tout artéfact sur les valeurs IS. Le volume total de PBS utilisé pour rincer les deux lames est de 1 mL. Homogénéiser doucement la suspension de CGL dans la boîte de Petri à l'aide du grattoir à cellules. Prélever alors une aliquote de 20 µL de suspension homogénéisée à l'aide d'une micropipette en prenant soin de ne pas capter la membrane, visible à l'œil nu, puis mélanger cette aliquote avec 1,98 mL de PBS pour obtenir un échantillon de 2 mL. Un second échantillon de 2 mL est ensuite préparé selon la même procédure de façon à en obtenir deux par animal.

Détermination de la prolifération cellulaire (quantification de l'ATP des lymphocytes)

27. Les augmentations de la teneur en ATP des ganglions lymphatiques sont déterminées par la méthode luciférine/luciférase avec un kit de mesure de l'ATP qui calcule la bioluminescence, exprimée en unités relatives de luminescence [relative luminescence unit] (RLU). Le temps écoulé entre la mise à mort de l'animal et la quantification de l'ATP pour chaque individu demeure uniforme, et ne dépasse pas environ 30 minutes, car la teneur en ATP est supposée diminuer progressivement à partir de l'euthanasie (12). Ainsi, l'ensemble des procédures entre l'excision des ganglions lymphatiques auriculaires et les mesures d'ATP seront réalisées en 20 minutes d'après un programme préétabli valable pour tous les animaux. Il convient de déterminer la luminescence due à l'ATP dans chacun des échantillons de 2 mL, soit deux mesures d'ATP par souris. La moyenne de ces résultats est alors établie et utilisée dans les calculs suivants (voir paragraphe 30).

OBSERVATIONS

Observations cliniques

28. Au moins une fois par jour, l'expérimentateur examine attentivement chaque souris afin de déceler d'éventuels signes cliniques, se traduisant par une irritation locale sur le site d'application ou une toxicité systémique. Toutes les observations sont systématiquement consignées pour chaque souris. Les programmes de suivi intègrent les critères permettant d'identifier rapidement les souris montrant des signes de toxicité systémique, d'irritation cutanée locale excessive ou de corrosion de la peau, afin qu'elles puissent être euthanasiées (36).

Poids corporels

29. Comme indiqué au paragraphe 25, le poids corporel de chaque animal est mesuré au début de l'essai et au moment programmé pour l'euthanasie.

CALCUL DES RÉSULTATS

30. Les résultats obtenus pour chaque groupe de traitement sont exprimés par un indice de stimulation (IS) moyen. Cet IS s'obtient en divisant la moyenne des RLU/souris dans chaque groupe ayant reçu la substance d'essai ou le TP par la moyenne des RLU/souris dans le groupe témoin traité avec le solvant/TV. L'IS moyen pour les TV est alors égal à 1.

▼M3

31. Un résultat est considéré comme positif lorsque IS ≥ 1,8 (10). Toutefois, l'intensité de la relation dose-effet, la signification statistique et la cohérence des réponses obtenues avec le solvant/véhicule et le TP constituent autant de facteurs pour décider si un résultat limite (c'est-à-dire un IS situé entre 1,8 et 2,5) est jugé positif (2) (3) (37).

32. En cas de réponse positive limite (IS entre 1,8 et 2,5), les expérimentateurs sont invités à examiner des paramètres supplémentaires comme la relation dose-effet, les manifestations de toxicité systémique ou d'irritation excessive, et, le cas échéant, la signification statistique pour définitivement conclure à un résultat positif (10). Diverses propriétés de la substance d'essai sont aussi prises en compte, parmi lesquelles une éventuelle analogie structurelle avec des sensibilisants cutanés connus, le déclenchement d'une irritation cutanée excessive chez la souris, et la nature de la relation dose-effet observée. Ces considérations, ainsi que d'autres, sont examinées en détail dans un autre document (4).

33. Le relevé des données pour chaque souris permet de déterminer statistiquement l'existence et l'intensité d'une relation dose-effet dans les résultats. Tout traitement statistique peut comprendre une évaluation de la relation dose-effet ainsi que des comparaisons des groupes d'essai convenablement adaptées (par exemple, comparaisons par paires des groupes de dose avec le groupe solvant/véhicule témoin concurrent). Les analyses statistiques peuvent notamment inclure une régression linéaire ou le test de William pour étudier la fonction dose-effet, ainsi que le test de Dunnett pour les comparaisons par paires. Pour choisir une méthode appropriée d'analyse statistique, il faut être conscient du risque d'inégalité des variances et d'autres problèmes connexes qui pourraient nécessiter une transformation des données ou une analyse statistique non paramétrique. Quoi qu'il en soit, on peut être amené à calculer les indices de stimulation et effectuer les traitements statistiques avec ou sans certains points de données (parfois appelés «valeurs aberrantes»).

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Résultats

34. Les résultats sont récapitulés sous forme de tableau présentant les RLU pour chaque animal, la moyenne des RLU/animal pour chaque groupe, la marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) et l'indice de stimulation moyen pour chaque groupe de dose par rapport au groupe solvant/véhicule témoin concurrent.

Rapport d'essai

35. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Substance et mélanges chimique d'essai et substances et mélanges chimiques témoins:

— données d'identification (par exemple numéro CAS et numéro CE, le cas échéant; source; pureté; impuretés connues; numéro de lot),

— état physique et propriétés physico-chimiques (par exemple volatilité, stabilité, solubilité),

— s'il s'agit d'un mélange: composition et pourcentages relatifs des constituants.

Solvant/véhicule:

— données d'identification (pureté; concentration, s'il y a lieu; volume utilisé),

— justification du choix du véhicule.

▼**M3**

Animaux d'essai:

— source des souris CBA,

— état microbiologique des animaux, s'il est connu,

— nombre et âge des animaux,

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Conditions d'essai:

— source, numéro de lot, données fournies par le fabricant sur l'assurance qualité/le contrôle qualité du kit ATP,

— détails concernant la préparation et l'application de la substance d'essai,

— justification du choix des doses (y compris résultats de l'essai préliminaire, le cas échéant),

— concentrations utilisées pour le véhicule et la substance d'essai, et quantité totale de substance d'essai appliquée,

— détails concernant la nourriture et la qualité de l'eau (y compris type et source de nourriture et provenance de l'eau),

— détails concernant le programme de traitement et d'échantillonnage,

— méthodes de détermination de la toxicité,

— critères de décision concernant les études positives ou négatives,

— détails concernant tout écart par rapport au protocole et explication de la manière dont l'écart modifie la conception de l'essai et ses résultats.

Vérification de la fiabilité:

— résumé des résultats du plus récent test de fiabilité, notamment informations sur la substance d'essai, sa concentration et le véhicule utilisé,

— résultats des témoins spécifiques au laboratoire pour le TP concurrent et/ou historique ainsi que pour le TN concurrent (solvant/véhicule),

— en l'absence d'un TP concurrent, date et rapport de laboratoire du dernier essai périodique du TP, et rapport détaillant les résultats historiques du TP spécifiques au laboratoire de manière à justifier pourquoi aucun TP concurrent n'a été mis en œuvre.

Résultat:

— poids corporel de chaque souris au lancement du traitement et au moment programmé pour l'euthanasie; moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) pour chaque groupe de dose,

— moment du déclenchement des effets et signes de toxicité, y compris l'irritation cutanée au site d'administration, pour chaque animal,

— heure de la mise à mort de l'animal et heure de la mesure d'ATP pour chaque animal,

— tableau des RLU et IS par souris pour chaque groupe de dose,

— moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) des RLU/souris pour chaque groupe de dose, et résultats de l'analyse des valeurs aberrantes au sein de chacun d'eux,

▼M3

— indices de stimulation obtenus, et détermination appropriée de la variabilité prenant en compte les variations entre animaux à la fois dans les groupes ayant reçu la substance d'essai et dans les groupes témoins,

— relation dose-effet,

— analyses statistiques, s'il y a lieu.

Discussion des résultats:

— bref commentaire sur les résultats, analyse de la relation dose-effet et analyses statistiques, s'il y a lieu, et conclusion quant au fait de savoir si la substance d'essai doit être considérée comme un sensibilisant cutané.

BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (2010), Sensibilisation cutanée: essai des ganglions lymphatiques locaux, Ligne directrice n° 429, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

2. Chamberlain, M. et Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem, Toxicol., 34, 999-1002.

3. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. et Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem, Toxicol., 34, 985-997.

4. Basketter, D.A., Gerberick, G.F. et Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-333.

5. Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. et Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.

6. ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

7. Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol. 34, 258-273.

8. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol. 34, 274-286.

9. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol. 34, 249-257.

10. ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼M3

11. ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

12. Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. et Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. J. Pharmacol. Toxicol. Meth., 58, 1-10.

13. Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. et Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. J. Pharmacol. Toxicol. Meth., 58, 11-26.

14. OCDE (1992), Sensibilisation de la peau, Ligne directrice n° 406, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

15. Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. et Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

16. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. et Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

17. Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. et Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. J. Immunol. Meth., 160, 81-88.

18. Ishizaka, A., Tono-oka, T. et Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. J. Immunol. Meth., 72, 127-132.

19. Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. et Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. Biomat., 24, 27-34.

20. Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. Meth. Enzymol., 305, 346-370.

21. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7e édition. Washington, DC: National Academies Press.

22. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llnaps/LLNAPerfStds.pdf]

23. McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71-89.

24. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. et Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13-31.

25. OCDE (2002), Effet irritant/corrosif aigu sur la peau, Ligne directrice No. 404, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

▼M3

26. Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. et DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

27. ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

28. Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. et Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

29. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. et Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83-94.

30. Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. et Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245-256.

31. Hayes, B.B. et Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug Chem. Toxicol., 22, 491-506.

32. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. et Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60-68.

33. Vohr, H.W. et Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

34. Patterson, R.M., Noga, E. et Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

35. ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

36. OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Série sur les essais et évaluations nº 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

37. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. et Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J, Toxicol, Environ. Health, 53 563-79.

38. OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Série de l'OCDE sur les essais et les évaluations nº 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

▼**M3**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Assurance qualité: procédé de gestion dans lequel le respect des normes d'essai, des obligations du laboratoire et des procédures d'enregistrement des données, ainsi que la précision du transfert des données, sont évalués par des personnes indépendantes de celles qui réalisent les essais.

Faux négatif: substance identifiée à tort comme négative ou inactive à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait positive ou active.

Faux positif: substance identifiée à tort comme positive ou active à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait négative ou inactive.

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoires (38).

Indice de stimulation (IS): paramètre d'évaluation du pouvoir de sensibilisation cutanée d'une substance d'essai, calculé comme le quotient de la prolifération mesurée dans les groupes traités sur celle du groupe témoin concurrent recevant le véhicule.

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (38).

Reproductibilité interlaboratoires: mesure du degré auquel différents laboratoires qualifiés qui emploient le même protocole et testent les mêmes substances d'essai peuvent produire des résultats similaires en termes de qualité et de quantité. La reproductibilité interlaboratoires est déterminée au cours des processus de prévalidation et de validation, et indique dans quelle mesure un essai peut être transféré sans problème entre laboratoires. On parle aussi de reproductibilité entre laboratoires (38).

Reproductibilité intralaboratoire: détermination du degré auquel divers membres du personnel qualifié d'un même laboratoire réussissent à obtenir des résultats identiques en ayant recours à un protocole spécifique à des moments différents. On parle aussi de reproductibilité au sein du laboratoire (38).

Risque: éventualité d'un effet indésirable sur la santé ou l'environnement. L'effet indésirable se manifeste uniquement lorsque le niveau d'exposition est suffisant.

Sensibilisation cutanée: processus immunologique résultant de l'exposition topique d'un sujet sensible à un allergène chimique inducteur, et qui se traduit par une réaction immunologique cutanée pouvant entraîner le développement d'une sensibilisation de contact.

Substance d'essai (également dénommée substance chimique d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

Substance étalon: substance sensibilisante ou non sensibilisante utilisée comme référence pour comparer les effets d'une substance d'essai. Une substance étalon présente les propriétés suivantes: i) source(s) régulières et fiables; ii) similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances à tester; iii) caractéristiques physico-chimiques connues; iv) données confirmant les effets connus; et v) puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

Valeur aberrante: une valeur aberrante est une valeur observée qui diffère nettement des autres valeurs dans un échantillon aléatoire d'une population.

▼M3

B.51. SENSIBILISATION CUTANÉE: ESSAI DE STIMULATION LOCALE DES GANGLIONS LYMPHATIQUES: BRDU-ELISA

INTRODUCTION

1. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques et les méthodes d'essai de l'Union européenne sont régulièrement mises à jour à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La première méthode d'essai (B.42) visant à déterminer la sensibilisation cutanée chez la souris, c'est-à-dire l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL, LD 429 de l'OCDE) a été révisée (1) et chapitre B.42 de la présente annexe). Les détails de la validation de l'ELGL et une synthèse des travaux qui y sont associés ont été publiés (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). La méthode ELGL s'appuie sur un marquage radioisotopique par la thymidine ou l'iode pour mesurer la prolifération des lymphocytes, ce qui limite son application dans les régions où l'acquisition, l'utilisation et l'élimination de produits radioactifs posent problème. L'ELGL: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ou dosage d'immunoadsorption par enzyme liée] constitue une variante non radioactive de la méthode d'essai ELGL, qui fait appel à la 5-bromo-2-désoxyuridine (BrdU) (Nº CAS [Chemical Abstracts Service] 59-14-3) non radiomarquée dans un essai de type ELISA pour mesurer la prolifération des lymphocytes. La méthode ELGL: BrdU-ELISA a été validée, puis évaluée et recommandée par un groupe international d'experts indépendants, qui a reconnu son utilité pour identifier, dans certaines limites, les substances ayant ou non un effet sensibilisant sur la peau (10) (11) (12). La présente méthode d'essai permet d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée de produits chimiques (substances et mélanges) chez les animaux. Le chapitre B.6 de la présente annexe et la LD 406 de l'OCDE font appel à des essais sur cobayes, notamment l'essai de maximisation sur le cobaye et l'essai de Buehler (13). L'ELGL (chapitre B.42 de la présente annexe, LD 429 de l'OCDE) et ses deux variantes non radioactives, ELGL: BrdU-ELISA (chapitre B.51 de la présente annexe, LD 442 B de l'OCDE) et ELGL: DA (chapitre B.50 de la présente annexe, LD 442 A de l'OCDE), sont plus intéressantes que les essais sur cobayes décrits dans le chapitre B.6 et dans la LD 406 de l'OCDE (13) en termes de réduction et de raffinement de l'utilisation des animaux.

2. À l'instar de l'ELGL, la méthode ELGL: BrdU-ELISA s'intéresse à la phase d'induction de la sensibilisation cutanée et fournit des données quantitatives permettant d'évaluer la relation dose-effet. Par ailleurs, en détectant les sensibilisants cutanés sans recourir au radiomarquage de l'ADN, cette technique évite les risques professionnels liés à l'exposition aux rayonnements et les problèmes de gestion des déchets. En contrepartie, elle pourrait se traduire par une hausse du nombre de souris utilisées pour repérer les sensibilisants cutanés, entraînant néanmoins la diminution du nombre de cobayes mis à contribution à ces mêmes fins (d'après le chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13).

DÉFINITIONS

3. Les définitions utilisées sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

4. La méthode ELGL: BrdU-ELISA est une variante de l'ELGL visant à identifier les substances chimiques susceptibles d'induire une sensibilisation cutanée, dans un cadre précis. Cela n'implique pas que l'ELGL: BrdU-ELISA doive systématiquement remplacer l'ELGL classique ou les essais sur cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE) (13), mais plutôt qu'il s'agit d'un outil d'une qualité égale pouvant se substituer à ces méthodes, et dont les résultats positifs et négatifs n'ont généralement plus besoin de confirmation supplémentaire (10) (11). Avant de procéder à l'essai, le

▼M3

laboratoire rassemble toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, à savoir son identité et sa structure chimiques, ses propriétés physico-chimiques, les résultats de tous les autres essais de toxicité in vitro et in vivo, et les données toxicologiques sur des analogues de structure. Ces informations servent à déterminer s'il est pertinent d'appliquer la méthode ELGL: BrdU-ELISA avec la substance d'essai considérée [étant donné l'incompatibilité de certains types de substances chimiques avec l'ELGL: BrdU-ELISA (voir paragraphe 5)], et aider à choisir les doses appropriées.

5. La méthode ELGL: BrdU-ELISA, mise en œuvre in vivo, ne met donc pas un terme à l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. Néanmoins, comparée aux essais avec cobayes (chapitre B.6, LD 406 de l'OCDE), elle est susceptible de réduire le nombre d'animaux utilisés à cette même fin (13). En outre, l'ELGL: BrdU-ELISA propose un raffinement important de l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact, dans la mesure où, à la différence du chapitre B.6 et de la LD 406 de l'OCDE, l'ELGL: BrdU-ELISA n'est pas fondé sur le déclenchement de réactions d'hypersensibilité cutanée par une exposition de déclenchement. De plus, l'ELGL: BrdU-ELISA ne requiert aucun adjuvant, contrairement à l'essai de maximisation sur le cobaye (chapitre B.6 de la présente annexe, 13). Cette méthode permet donc de réduire le stress des animaux. Malgré les avantages de l'ELGL: BrdU-ELISA par rapport au chapitre B.6 et à la LD 406 de l'OCDE (13), certaines limites peuvent imposer de privilégier l'utilisation du chapitre B6 ou de la LD 406 de l'OCDE (13) [par exemple, essai de certains métaux, résultats faussement positifs avec certaines substances irritantes pour la peau, en particulier des tensioactifs (6) (1 et chapitre B.42 de la présente annexe), solubilité de la substance d'essai]. De surcroît, certaines substances chimiques ou familles de substances chimiques comprenant des groupements fonctionnels dont il est démontré qu'ils peuvent être des facteurs de confusion (15) peuvent aussi imposer le recours aux essais avec cobayes (B.6, LD 406 de l'OCDE) (13). Il est recommandé de considérer les limites identifiées pour l'ELGL (1 et chapitre B.42 de la présente annexe) comme étant également valables pour l'ELGL: BrdU-ELISA (10). Dans ces limites, l'ELGL: BrdU-ELISA est applicable à tout produit chimique qui ne présente pas de propriétés susceptibles d'affecter la précision de l'essai. De plus, il convient de prendre en compte l'éventualité de résultats positifs limites pour lesquels l'indice de stimulation (IS) est situé entre 1,6 et 1,9 (voir paragraphes 31-32). En effet, d'après la base de données de validation portant sur 43 substances présentant un IS $\geq$ 1,6 (voir paragraphe 6), l'ELGL: BrdU-ELISA a correctement identifié l'ensemble des 32 sensibilisants (d'après l'ELGL), mais a donné des résultats positifs pour deux des 11 substances non sensibilisantes (d'après ELGL) présentant un indice de stimulation compris entre 1,6 et 1,9 (c'est-à-dire des résultats positifs limites) (10). Cependant, comme le même ensemble de données a été utilisé pour établir les valeurs IS et pour calculer les propriétés prédictives de l'essai, les résultats indiqués pourraient surestimer les propriétés prédictives réelles.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

6. L'ELGL: BrdU-ELISA repose sur le principe que les sensibilisants induisent une prolifération primaire de lymphocytes dans les ganglions lymphatiques drainant le site de l'application de la substance d'essai. Cette prolifération est proportionnelle à la dose appliquée et à la puissance de l'allergène et permet d'obtenir facilement une mesure quantitative de la sensibilisation. Pour mesurer la prolifération, on compare la prolifération moyenne de chaque groupe d'essai à la prolifération moyenne du groupe témoin traité avec le véhicule (TV). On calcule le quotient de la prolifération moyenne dans chaque groupe traité sur celle dans le groupe TV concurrent pour obtenir l'indice de stimulation (IS); si cette valeur est supérieure ou égale

▼M3

à 1,6, on peut ensuite poursuivre l'évaluation du pouvoir de sensibilisation cutanée de la substance d'essai. Les procédures décrites ici s'appuient sur la quantification de la BrdU pour indiquer l'augmentation du nombre de cellules en prolifération dans les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage. La BrdU est un analogue de la thymidine qui s'incorpore de la même manière dans l'ADN de cellules en prolifération. L'incorporation de la BrdU est quantifiée par ELISA, grâce à un anticorps spécifique de la BrdU marqué par la peroxydase. Cette enzyme réagit ensuite avec un substrat ajouté spécialement pour produire un composé coloré, dosé avec un lecteur de plaque de microtitrage à une absorbance donnée.

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Choix des espèces animales

7. L'espèce retenue pour cet essai est la souris. Les études de validation de l'ELGL: BrdU-ELISA ont été menées exclusivement avec la souche CBA/JN, qui sera donc privilégiée pour cet essai (10) (12). On utilise de jeunes femelles adultes, nullipares et non gravides. Au début de l'étude, les animaux sont âgés de 8 à 12 semaines et affichent une variation de poids minime entre eux n'excédant pas 20 pour cent du poids. Il est aussi possible d'utiliser d'autres souches ainsi que des mâles s'il existe suffisamment d'informations démontrant l'absence de différences significatives entre les souches et/ou les sexes en ce qui concerne la réaction à l'ELGL: BrdU-ELISA.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

8. Les souris sont hébergées par groupes (16), sauf si une raison scientifique pertinente exige un encagement individuel. La température de l'animalerie d'expérience est maintenue à 22 °C ± 3 °C. L'humidité relative atteint au moins 30 % et de préférence ne dépasse pas 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit maintenue aux alentours de 50-60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux peuvent être alimentés par un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété.

Préparation des animaux

9. Les animaux sont sélectionnés au hasard, marqués pour permettre leur identification individuelle (mais jamais sur l'oreille) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours avant le commencement du traitement afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Avant de commencer le traitement, on examine tous les animaux pour vérifier qu'ils ne présentent pas de lésions cutanées observables.

Préparation des solutions d'essai

10. Les substances chimiques solides sont dissoutes ou dispersées dans des solvants/véhicules puis diluées, s'il y a lieu, avant d'être appliquées sur l'oreille des souris. Les substances chimiques liquides peuvent être appliquées pures ou préalablement diluées. Les substances chimiques insolubles, comme celles que l'on rencontre généralement dans les dispositifs médicaux, sont soumises à une extraction forcée à l'aide d'un solvant approprié pour faire ressortir tous les composants extractibles qu'il est possible d'évaluer, avant l'application sur l'oreille des souris. Les substances d'essai sont préparées chaque jour à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'elles peuvent être stockées.

Contrôle de la fiabilité

11. Les témoins positifs (TP) servent à démontrer le bon fonctionnement de l'essai en répondant de manière adéquate et reproductible à une substance d'essai sensibilisante pour lequel l'ordre de grandeur des effets est bien connu. Il est recommandé d'inclure un TP concurrent puisqu'il démontre la capacité du laboratoire à mener chaque essai correctement, et permet d'évaluer la comparabilité et la reproductibilité intra- et interlaboratoires. Par ailleurs, dans la mesure où certaines autorités réglementaires exigent un TP dans chaque essai, les expérimentateurs sont encouragés à consulter les

▼M3

autorités concernées avant de mener l'ELGL: BrdU-ELISA. De même, le recours systématique à un TP concurrent est recommandé pour éviter d'avoir à réaliser des essais supplémentaires sur animaux, ce qui est parfois exigé lorsqu'un laboratoire se réfère à un TP testé périodiquement (voir paragraphe 12). Le TP doit réagir positivement à l'ELGL: BrdU-ELISA pour un niveau d'exposition supposé accroître l'indice de stimulation supérieur d'au moins 1,6 point par rapport au groupe témoin négatif (TN). La dose de TP sera choisie de manière à ne pas entraîner d'irritation cutanée excessive ou de toxicité systémique, l'induction devant être reproductible sans être exagérée (un IS > 14 sera considéré comme excessif, par exemple). Les TP utilisés en priorité sont l'hexyl cinnamaldéhyde à 25 % (N° CAS 101-86-0) et l'eugénol à 25 % (N° CAS 97-53-0) dans un mélange acétone/huile d'olive (4:1, v/v). Dans certains cas, d'autres témoins positifs répondant aux critères susmentionnés pourront être employés, à condition que ce choix soit correctement justifié.

12. Si l'inclusion d'un groupe TP concurrent demeure recommandée, des essais périodiques (à intervalles ≤ 6 mois) du TP peuvent dans certains cas convenir pour les laboratoires menant régulièrement (c'est-à-dire au moins une fois par mois) des ELGL: BrdU-ELISA et disposant d'une base de données de référence montrant que le laboratoire est apte à obtenir des résultats précis et reproductibles avec les TP. La capacité d'un laboratoire à mener l'ELGL: BrdU-ELISA est efficacement démontrée quand le TP déclenche des résultats positifs cohérents à l'issue d'un minimum de 10 essais indépendants étalés sur une période raisonnable (c'est-à-dire inférieure à un an).

13. Il convient d'inclure un groupe TP concurrent à chaque fois que le protocole de l'ELGL: BrdU-ELISA est modifié (par exemple si des modifications interviennent au niveau du personnel qualifié, des composés et/ou des réactifs utilisés pour la méthode d'essai, de l'équipement mis à contribution, ou de la source d'animaux d'expérience), et ces changements seront documentés dans les rapports de laboratoire. Il faudra tenir compte de l'impact de ces changements sur la validité des données de la base historique pour décider de l'opportunité d'établir une autre base de données afin d'évaluer la cohérence des nouveaux résultats relatives au TP.

14. Les investigateurs gardent à l'esprit que tester le TP périodiquement plutôt que systématiquement comme concurrent pèse sur la précision et l'acceptabilité des résultats négatifs obtenus à l'issue d'un essai sans TP concurrent réalisé dans l'intervalle entre chaque essai périodique du TP. Par exemple, si un essai périodique du TP donne un faux négatif, l'ensemble des résultats négatifs obtenus depuis le dernier essai de TP valable pourront être remis en question. Il faut donc soigneusement considérer les implications de telles retombées avant de décider si les TP seront des concurrents systématiques ou s'ils feront l'objet d'essais périodiques. Par ailleurs, le nombre d'animaux du groupe du TP concurrent sera réduit si cela se justifie du point de vue scientifique et si le laboratoire démontre, en s'appuyant sur ses propres données historiques, que l'on peut utiliser moins de souris (17).

15. Quoique le témoin positif soit testé dans un véhicule produisant un effet constant (par exemple acétone: huile d'olive, 4:1, v/v), certaines situations réglementaires peuvent aussi nécessiter l'essai avec un véhicule moins courant (mélange cliniquement ou chimiquement pertinent) (18). Si le TP concurrent est testé avec un véhicule différent de celui de la substance d'essai, il convient de mettre en place un TV indépendant pour le TP concurrent.

▼M3

16. Lorsqu'il s'agit d'évaluer des substances d'essai appartenant à une classe chimique particulière ou donnant des résultats situés dans une certaine fourchette, des substances étalons peuvent s'avérer utiles pour montrer que la méthode d'essai fonctionne correctement et permet de détecter le pouvoir de sensibilisation cutanée de ces types de composés. Les substances étalons adaptées présentent les propriétés suivantes:

— similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances à tester,

— caractéristiques physiques et chimiques connues,

— données obtenues avec l'ELGL: BrdU-ELISA,

— données obtenues avec d'autres modèles animaux et/ou l'être humain.

MODE OPÉRATOIRE

Nombre d'animaux et doses

17. On utilise au moins quatre animaux par groupe de dose, et un minimum de trois concentrations de la substance d'essai, ainsi qu'un groupe TN concurrent ne recevant que le véhicule de cette substance et un TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15). On peut envisager de tester différentes doses de TP, en particulier quand celui-ci ne fait l'objet que d'essais périodiques. Mis à part l'absence de traitement par la substance d'essai, les animaux des groupes témoins sont manipulés et traités de la même manière que les animaux des groupes d'essai.

18. La sélection des doses et du véhicule suit les recommandations données dans les références 2 et 19. Les doses successives sont normalement choisies dans une série de concentrations appropriées telles que 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0,5 %, etc. Le choix de la série utilisée est scientifiquement justifié. Le cas échéant, toutes les informations existantes d'ordre toxicologique (par exemple sur la toxicité aiguë et l'irritation cutanée), structural et physico-chimique sur la substance d'essai en question (et/ou ses analogues de structure) sont prises en compte pour choisir les trois concentrations successives de manière que la plus élevée d'entre elles offre une exposition maximale tout en évitant la toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive (19) (20 et chapitre B.4 de la présente annexe). En l'absence de telles informations, un essai préliminaire peut s'avérer nécessaire (voir paragraphes 21-24).

19. Il convient que le véhicule ne perturbe pas et n'introduise pas un biais dans les résultats du test. Il doit être choisi de manière à optimiser la solubilité pour obtenir la concentration la plus élevée possible dans la préparation d'une solution/suspension adaptée à l'application de la substance d'essai. Les véhicules recommandés sont le mélange acétone/huile d'olive (4:1, v/v), le N,N-diméthylformamide, la méthyléthylcétone, le propylèneglycol et le diméthylsulfoxyde (6) mais d'autres véhicules pourront également être utilisés à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. Certaines situations réclament un témoin supplémentaire, à savoir un solvant qui se justifie sur le plan clinique ou le mélange dans lequel la substance d'essai est commercialisée. L'expérimentateur veille tout particulièrement à ce que les substances d'essai hydrophiles soient incorporées à un véhicule qui mouille la peau et ne ruisselle pas immédiatement, ce qui peut nécessiter l'ajout de solubilisants appropriés (par exemple Pluronic® L92 à 1 %). Il convient donc d'éviter les véhicules totalement aqueux.

▼M3

20. Le traitement des ganglions lymphatiques de chaque souris permet d'évaluer la variabilité entre individus et de comparer statistiquement les réponses induites par la substance d'essai et par le véhicule témoin (voir paragraphe 33). En outre, il n'est envisageable de réduire le nombre d'animaux du groupe TP qu'en se fondant sur des données individuelles (17). Du reste, certaines autorités réglementaires exigent la collecte de données pour chaque animal. Relever régulièrement les données propres à chaque individu contribue au bien-être des animaux en évitant les essais dupliqués qui seraient nécessaires si les résultats obtenus d'une autre manière (par exemple avec des données par groupe d'animaux) devaient être soumis à des autorités réglementaires ayant d'autres exigences (en particulier la fourniture de données individuelles).

Essai préliminaire

21. En l'absence d'informations permettant d'estimer la concentration d'essai maximale (voir paragraphe 18), il convient d'effectuer un essai préliminaire afin de déterminer le niveau des doses adaptées à l'ELGL: BrdU-ELISA. Cet essai préliminaire aide à quantifier la dose maximale à mettre en œuvre dans l'ELGL: BrdU-ELISA lorsqu'on ne dispose pas d'informations sur la concentration induisant une toxicité systémique (voir paragraphe 24) et/ou une irritation cutanée locale excessive (voir paragraphe 23). Cette concentration maximum de la substance d'essai est de 100 % pour les liquides, ou la plus élevée possible pour les solides et les suspensions.

22. Les conditions de l'essai préliminaire sont les mêmes que celles de l'ELGL: BrdU-ELISA, à ceci près qu'il n'y a pas d'évaluation de la prolifération dans les ganglions lymphatiques et que l'on peut inclure moins d'animaux par groupe de dose. En effet, on suggère d'utiliser seulement un à deux individus par groupe de dose. Il convient d'examiner toutes les souris quotidiennement afin de déceler d'éventuels signes cliniques de toxicité systémique ou d'irritation locale sur le site d'application. Les poids corporels sont consignés préalablement à l'essai et juste avant la fin de l'essai (sixième jour). On examine les deux oreilles de chaque souris pour détecter la présence d'un éventuel érythème, le résultat étant noté conformément à l'échelle figurant dans le tableau 1 (20 et chapitre B.4 de la présente annexe). L'épaisseur de l'oreille est mesurée à l'aide d'une jauge d'épaisseur (par exemple micromètre numérique ou jauge d'épaisseur Peacock Dial) le premier jour (avant toute application), le troisième jour (environ 48 heures après la première dose) et le sixième jour. De plus, au sixième jour, cette épaisseur peut être déterminée à partir du poids d'un échantillon d'oreille, prélevé après l'euthanasie des animaux. Les irritations locales excessives se traduisent par une cotation de l'érythème ≥ 3 et/ou un épaississement de l'oreille d'au moins 25 %, quel que soit le jour de la mesure (21) (22). La dose maximale choisie pour l'étude ELGL: BrdU-ELISA principale sera la dose immédiatement inférieure dans la série de concentrations utilisée pour l'essai préliminaire (voir paragraphe 18) qui n'induit pas une toxicité systémique et/ou une irritation cutanée locale excessive.

Tableau 1

Cotation de l'érythème

Observation	Résultat
Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2

▼M3

Observation	Résultat
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarre empêchant la cotation de l'érythème	4

23. Outre un épaississement de l'oreille de 25 % (21) (22), une augmentation statistiquement significative de l'épaisseur de l'oreille chez les souris traitées par rapport aux individus témoins a également été utilisée pour identifier des produits irritants dans l'ELGL (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Cependant, les augmentations statistiquement significatives inférieures à 25 % ne sont pas systématiquement associées à une irritation excessive (25) (26) (27) (28) (29).

24. Les observations cliniques suivantes peuvent indiquer une toxicité systémique (30) dans le cadre d'une évaluation intégrée, et ainsi permettre d'estimer la dose maximale à utiliser dans l'ELGL: BrdU-ELISA: modifications des fonctions nerveuses (par exemple, piloérection, ataxie, tremblements et convulsions); changements du comportement (par exemple, agressivité, activités de toilettage modifiées, changement marqué d'intensité de l'activité); troubles respiratoires (en termes de fréquence et d'intensité de la respiration, sous forme de dyspnée, halètements ou râles), et modifications de la consommation d'aliments et d'eau. En outre, l'évaluation prendra en compte les éléments suivants: signes de léthargie et/ou absence de réceptivité, et tout signe clinique autre qu'une douleur et un stress légers ou passagers; baisse du poids corporel > 5 % entre le premier et le sixième jour; mortalité. Les animaux moribonds ou montrant des signes de douleur et de stress aigus sont euthanasiés (31).

Programme expérimental de l'étude principale

25. Le programme expérimental se déroule comme suit:

— *Premier jour:* Mesurer et consigner le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Appliquer 25 µL d'une dilution adaptée de la substance d'essai, du véhicule seul ou du TP (concurrent ou récent selon les pratiques du laboratoire, voir paragraphes 11-15) au dos de chaque oreille.

— *Deuxième et troisième jours:* Répéter la procédure d'application pratiquée le premier jour.

— *Quatrième jour:* Aucun traitement.

— *Cinquième jour:* Injecter 0,5 mL (5 mg/souris) d'une solution de BrdU (10 mg/mL) par voie intrapéritonéale.

— *Sixième jour:* Noter le poids de chaque animal ainsi que toute observation clinique. Euthanasier les animaux environ 24 heures (24 h) après l'injection de BrdU. Exciser les ganglions lymphatiques auriculaires de drainage de chaque oreille de souris et les placer séparément dans une solution saline tamponnée au phosphate [phosphate buffered saline] (PBS). Les détails et diagrammes relatifs à l'identification et à la dissection des ganglions lymphatiques sont présentés dans la référence (17). Pour approfondir le suivi de la réponse cutanée locale dans l'essai principal, des paramètres supplémentaires comme la cotation de l'érythème auriculaire ou les mesures de l'épaisseur de l'oreille (obtenues à l'aide d'une jauge d'épaisseur ou par pesée d'échantillons d'oreilles après nécropsie) peuvent être inclus dans le protocole d'étude.

▼M3

Préparation des suspensions cellulaires

26. Pour chaque souris, les cellules de ganglions lymphatiques (CGL) excisés bilatéralement sont dispersées par le biais d'une désagrégation mécanique douce à travers un tamis en acier inoxydable à 200 microns, ou de toute autre technique acceptable pour obtenir une suspension unicellulaire (par exemple en broyant les ganglions dans un mortier en plastique jetable avant de les passer dans un tamis en nylon de 70 microns). La procédure de dispersion des CGL constitue une étape cruciale de l'essai, et est maîtrisée préalablement par chaque opérateur. En outre, les ganglions lymphatiques des animaux du groupe TN étant petits, il importe de les manipuler avec précaution afin d'éviter toute perturbation des valeurs IS. Dans chaque cas, le volume de suspension de CGL visé correspond à un volume optimisé préétabli (environ 15 mL). Le volume optimisé est celui pour lequel l'absorbance moyenne du groupe TN se situe entre 0,1 et 0,2.

Détermination de la prolifération cellulaire (quantification de la BrdU dans l'ADN des lymphocytes)

27. La BrdU est quantifié à l'aide d'un kit de dosage ELISA commercial (par exemple Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne, référence 11 647 229 001). Placer rapidement 100 µL de suspension de CGL dans les puits d'une microplaque à fond plat, en triplicats. Après fixation et dénaturation des CGL, ajouter les anticorps anti-BrdU dans chaque puits et laisser réagir. Éliminer ensuite les anticorps anti-BrdU par lavage, puis ajouter la solution de substrat et laisser le chromogène être synthétisé. Mesurer l'absorbance à 370 nm, pour une longueur d'onde de référence fixée à 492 nm. Dans tous les cas, il convient d'optimiser les conditions de l'essai (voir paragraphe 26).

OBSERVATIONS

Observations cliniques

28. Au moins une fois par jour, l'expérimentateur examine attentivement chaque souris afin de déceler d'éventuels signes cliniques, se traduisant par une irritation locale sur le site d'application ou une toxicité systémique. Toutes les observations sont systématiquement consignées pour chaque souris. Les programmes de suivi intègrent les critères permettant d'identifier rapidement les souris montrant des signes de toxicité systémique, d'irritation excessive ou de corrosion locale de la peau, afin qu'elles puissent être euthanasiées (31).

Poids corporels

29. Comme indiqué au paragraphe 25, le poids corporel de chaque animal est mesuré au début de l'essai et au moment programmé pour l'euthanasie.

CALCUL DES RÉSULTATS

30. Les résultats obtenus pour chaque groupe de traitement sont exprimés par un indice de stimulation (IS) moyen. Cet IS s'obtient en divisant l'indice de marquage BrdU moyen de chaque groupe ayant reçu la substance d'essai ou le TP par l'indice de marquage BrdU moyen du groupe témoin traité avec le solvant/TV. L'IS moyen pour les TV est alors égal à 1.

L'indice de marquage BrdU est calculé comme suit:

$$\text{Indice de marquage BrdU} = (\text{ABSem} - \text{ABS blancem}) - (\text{ABSréf} - \text{ABS blancréf})$$

Où em = longueur d'onde d'émission et réf = longueur d'onde de référence.

▼M3

31. Un résultat est considéré comme positif lorsque IS ≥ 1,6 (10). Toutefois, l'intensité de la relation dose-effet, la signification statistique et la cohérence des réponses obtenues avec le solvant/véhicule et le TP constituent autant de facteurs pour décider si un résultat limite (c'est-à-dire un IS situé entre 1,6 et 1,9) est jugé positif (3) (6) (32).

32. En cas de réponse positive limite (IS entre 1,6 et 1,9), les expérimentateurs sont invités à examiner des paramètres supplémentaires comme la relation dose-effet, les manifestations de toxicité systémique ou d'irritation excessive, et, le cas échéant, la signification statistique pour définitivement conclure à un résultat positif (10). Diverses propriétés de la substance d'essai sont aussi prises en compte, parmi lesquelles une éventuelle analogie structurelle avec des sensibilisants cutanés connus, le déclenchement d'une irritation cutanée excessive chez la souris, et la nature de la relation dose-effet observée. Ces considérations, ainsi que d'autres, sont examinées en détail dans un autre document (4).

33. Le relevé des données pour chaque souris permet de déterminer statistiquement l'existence et l'intensité d'une relation dose-effet dans les résultats. Tout traitement statistique peut comprendre une évaluation de la relation dose-effet ainsi que des comparaisons des groupes d'essai convenablement adaptées (par exemple, comparaisons par paires des groupes de dose avec le groupe solvant/véhicule témoin concurrent). Les analyses statistiques peuvent notamment inclure une régression linéaire ou le test de William pour étudier la fonction dose-effet, ainsi que le test de Dunnett pour les comparaisons par paires. Pour choisir une méthode appropriée d'analyse statistique, il faut être conscient du risque d'inégalité des variances et d'autres problèmes connexes qui pourraient nécessiter une transformation des données ou une analyse statistique non paramétrique. Quoi qu'il en soit, on peut être amené à calculer les indices de stimulation et effectuer les traitements statistiques avec ou sans certains points de données (parfois appelés «valeurs aberrantes»).

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Résultats

34. Les résultats sont récapitulés sous forme de tableau présentant les indices de marquage BrdU pour chaque animal, la moyenne des indices de marquage BrdU/animal pour chaque groupe, la marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) et l'indice de stimulation moyen pour chaque groupe de dose par rapport au groupe solvant/véhicule témoin concurrent.

Rapport d'essai

35. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Substance et mélanges chimique d'essai et substances et mélanges chimiques témoins:

— données d'identification (par exemple numéro CAS et numéro CE, le cas échéant; source; pureté; impuretés connues; numéro de lot),

— état physique et propriétés physico-chimiques (par exemple volatilité, stabilité, solubilité),

— s'il s'agit d'un mélange: composition et pourcentages relatifs des constituants.

Solvant/véhicule:

— données d'identification (pureté; concentration, s'il y a lieu; volume utilisé),

— justification du choix du véhicule.

▼**M3**

Animaux d'essai:

— source des souris CBA,

— état microbiologique des animaux, s'il est connu,

— nombre et âge des animaux,

— source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Conditions d'essai:

— source, numéro de lot et données du fabricant en matière d'assurance et de contrôle qualité (sensibilité et spécificité des anticorps, limites de détection) pour le kit ELISA,

— détails concernant la préparation et l'application de la substance d'essai,

— justification du choix des doses (y compris résultats de l'essai préliminaire, le cas échéant),

— concentrations utilisées pour le véhicule et la substance d'essai, et quantité totale de substance d'essai appliquée,

— détails concernant la nourriture et la qualité de l'eau (y compris type et source de nourriture et provenance de l'eau),

— détails concernant le programme de traitement et d'échantillonnage,

— méthodes de détermination de la toxicité,

— critères de décision concernant les études positives ou négatives,

— détails concernant tout écart par rapport au protocole et explication de la manière dont l'écart modifie la conception de l'essai et ses résultats.

Vérification de la fiabilité:

— résumé des résultats du dernier test de fiabilité, notamment informations sur la substance d'essai, sa concentration et le véhicule utilisé,

— résultats des témoins spécifiques au laboratoire pour le TP concurrent et/ou historique ainsi que pour le TN concurrent (solvant/véhicule),

— en l'absence d'un TP concurrent, date et rapport de laboratoire du dernier essai périodique du TP, et rapport détaillant les résultats historiques du TP spécifiques au laboratoire de manière à justifier pourquoi aucun TP concurrent n'a été mis en œuvre.

Résultats:

— poids corporel de chaque souris au lancement du traitement et au moment programmé pour l'euthanasie; moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) pour chaque groupe de dose,

— moment du déclenchement des effets et signes de toxicité, y compris l'irritation cutanée sur le site d'administration, pour chaque animal,

— tableau des indices de marquage BrdU et IS par souris pour chaque groupe de traitement,

— moyenne et marge d'erreur associée (par exemple, écart type, erreur type de la moyenne) des indices de marquage BrdU par souris pour chaque groupe de dose, et résultats de l'analyse des valeurs aberrantes au sein de chacun d'eux,

▼M3

— indices de stimulation obtenus, et détermination appropriée de la variabilité prenant en compte les variations entre animaux à la fois dans les groupes ayant reçu la substance d'essai et dans les groupes témoins,

— relation dose-effet,

— analyses statistiques, s'il y a lieu.

Discussion des résultats:

— bref commentaire sur les résultats, analyse de la relation dose-effet et analyses statistiques, s'il y a lieu, et conclusion quant au fait de savoir si la substance d'essai doit être considérée comme un sensibilisant cutané.

BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (2010), Sensibilisation cutanée: essai des ganglions lymphatiques locaux, Ligne directrice n° 429, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

2. Chamberlain, M. et Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol*., 34, 999-1002.

3. Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. et Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985-997.

4. Basketter, D.A., Gerberick, G.F. et Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327-33.

5. Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. et Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49-59.

6. ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM), NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

7. Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Biochem. Pharmacol., 34, 3-258.*

8. Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.

9. Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249- 257.

10. ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA), NIH Publication No. 10-7552A/B, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

▼**M3**

11. ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]

12. Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. et Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay, *j. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.

13. OCDE (1992), *Sensibilisation de la peau*, Ligne directrice nº 406, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

14. Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. et Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896-1904.

15. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. et Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol.Pharmacol*., 55, 90-96.

16. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

17. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante:[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llnaps/LLNAPerfStds.pdf]

18. McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.

19. Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. et Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13-31.

20. OCDE (2002), *Effet irritant/corrosif aigu sur la peau*, Ligne directrice nº 404, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

21. Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. et DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologis*t, 96 (S-1), 235.

22. ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

23. Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. et Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.

24. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. et Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

25. Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. et Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

▼**M3**

26. Hayes, B.B. et Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.

27. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. et Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round, *Toxicol.*, 212, 60-68.

28. Vohr, H.W. et Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.

29. Patterson, R.M., Noga, E. et Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.

30. ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible à l'adresse suivante: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

31. OCDE (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

32. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. et Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ.l Health*, 53, 563-79.

33. OCDE (2005), *Guidance Document on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Série sur les essais et évaluations No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCDE, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices]

▼**M3**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Assurance qualité: procédé de gestion dans lequel le respect des normes d'essai, des obligations du laboratoire et des procédures d'enregistrement des données, ainsi que la précision du transfert des données, sont évalués par des personnes indépendantes de celles qui réalisent les essais.

Faux négatif: substance d'essai identifiée à tort comme négative ou inactive à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait positive ou active (33).

Faux positif: substance d'essai identifiée à tort comme positive ou active à l'issue de l'essai, alors qu'elle est en fait négative ou inactive (33).

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoires (33).

Indice de stimulation (IS): paramètre d'évaluation du pouvoir de sensibilisation cutanée d'une substance d'essai, calculé comme le quotient de la prolifération mesurée dans les groupes traités sur celle du groupe témoin concurrent recevant le véhicule.

Précision: degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (33).

Reproductibilité interlaboratoires: mesure du degré auquel différents laboratoires qualifiés qui emploient le même protocole et testent les mêmes substances d'essai peuvent produire des résultats similaires en termes de qualité et de quantité. La reproductibilité interlaboratoires est déterminée au cours des processus de prévalidation et de validation, et indique dans quelle mesure un essai peut être transféré sans problème entre laboratoires. On parle aussi de reproductibilité entre laboratoires (33).

Reproductibilité intralaboratoire: détermination du degré auquel divers membres du personnel qualifié d'un même laboratoire réussissent à obtenir des résultats identiques en ayant recours à un protocole spécifique à des moments différents. On parle aussi de reproductibilité au sein du laboratoire (33).

Risque: éventualité d'un effet indésirable sur la santé ou l'environnement. L'effet indésirable se manifeste uniquement lorsque le niveau d'exposition est suffisant.

Sensibilisation cutanée: processus immunologique résultant de l'exposition topique d'un sujet sensible à un allergène chimique, et qui se traduit par une réaction immunologique cutanée pouvant entraîner le développement d'une sensibilisation de contact.

Substance d'essai (également dénommée substance chimique d'essai): toute substance et tout mélange testés selon la présente méthode d'essai.

Substance étalon: substance sensibilisante ou non sensibilisante utilisée comme référence pour comparer les effets d'une substance d'essai. Une substance étalon présente les propriétés suivantes: i) source(s) régulières et fiables; ii) similitude structurale et fonctionnelle avec la catégorie des substances à tester; iii) caractéristiques physiques et chimiques connues; iv) données confirmant les effets connus; et v) puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

Valeur aberrante: une valeur aberrante est une valeur observée qui diffère nettement des autres valeurs dans un échantillon aléatoire d'une population.

▼M4

B.52. TOXICITÉ AIGUË PAR INHALATION – MÉTHODE PAR CLASSE DE TOXICITÉ AIGUË

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 436 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Une première ligne directrice pour les essais de toxicité aiguë par inhalation (403) avait été adoptée en 1981 et a été révisée depuis [voir chapitre B.2 de la présente annexe (1)]. À la suite de l'adoption, en 2001, de la méthode par classe de toxicité aiguë par voie orale [chapitre B.1 *ter* de la présente annexe (5)], il est apparu approprié de développer une méthode par classe de toxicité aiguë par inhalation (2) (3) (4). Une évaluation rétrospective des performances de la méthode d'essai par classe de toxicité aiguë pour la toxicité aiguë par inhalation a montré que cette méthode était utilisable à des fins de classification et d'étiquetage (6). La méthode d'essai pour les essais de toxicité par inhalation faisant appel à la méthode par classe de toxicité aiguë permettra l'utilisation d'étapes successives de concentrations cibles fixées pour déterminer la classe de toxicité de la substance d'essai. Bien que la létalité soit le principal effet mesuré, les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance ou de détresse sévère sont euthanasiés afin de minimiser leur souffrance. Des précisions concernant les effets mesurés éthiquement acceptables sont disponibles dans le document d'orientation nº 19 de l'OCDE (7).

2. On trouvera dans le document d'orientation nº 39 sur les essais de toxicité aiguë par inhalation des indications pour la conduite et l'interprétation de la présente méthode d'essai (8).

3. Les définitions utilisées dans la présente méthode d'essai figurent à l'appendice 1 et dans le document d'orientation nº 39 (8).

4. Cette méthode d'essai fournit des informations qui permettent à la fois l'évaluation des dangers et le classement de la substance d'essai conformément au règlement (CE) nº 1272/2008 relatif à la classification pour les substances présentant une toxicité aiguë (9). Si des estimations ponctuelles des valeurs de la CL_{50} ou des analyses de la courbe concentration- réponse sont nécessaires, il convient de se reporter au chapitre B.2 de la présente annexe (1). Pour plus d'informations sur le choix des méthodes d'essai, il convient de se reporter au document d'orientation nº 39 (8). La présente méthode d'essai n'est pas spécifiquement destinée à tester des articles spéciaux comme les substances isométriques ou fibreuses faiblement solubles ou les nanomatériaux manufacturés.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

5. Avant d'entreprendre un essai conformément à la présente méthode d'essai, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, y compris les études existantes dont les résultats éviteraient des essais supplémentaires, afin de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination de l'espèce, de la souche, du sexe, du mode d'exposition et des concentrations d'essai appropriés, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les résultats de tous les essais de toxicité in vitro ou in vivo auxquels elle a été soumise; son (ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées. Les concentrations susceptibles d'engendrer une souffrance ou une détresse sévères, du fait de propriétés corrosives [1] ou fortement irritantes, ne sont pas testées à l'aide de cette méthode d'essai, voir document d'orientation 39 (8).

[1] L'évaluation de la corrosivité peut reposer sur un avis d'expert basé sur les éléments suivants: données expérimentales sur l'homme et l'animal, données (in vitro) existantes [voir, par exemple, le chapitre B.40 (11) de la présente annexe ou la ligne directrice 435 de l'OCDE (12), valeurs du pH, informations concernant des substances analogues ou toute autre donnée pertinente].

▼M4

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Le principe de cet essai est d'obtenir, avec un processus séquentiel, des informations suffisantes sur la toxicité aiguë par inhalation de la substance d'essai, pour parvenir à son classement avec une exposition de 4 heures. Des objectifs règlementaires spécifiques peuvent nécessiter de recourir à d'autres durées d'exposition. Les essais pour chacun des niveaux de concentration définis porteront sur 3 animaux de chaque sexe. En fonction de la mortalité et/ou de l'état moribond des animaux, 2 étapes peuvent suffire pour permettre de juger de la toxicité aiguë de la substance d'essai. S'il est prouvé que l'un des sexes est plus sensible à la substance d'essai, l'essai peut se poursuivre avec seulement les animaux de ce sexe. Le résultat de l'étape précédente détermine l'étape suivante, c'est-à-dire:

   a) l'arrêt de l'essai;

   b) un essai sur trois animaux par sexe; ou

   c) un essai sur 6 animaux, tous du sexe le plus sensible à la substance d'essai, la limite inférieure de la classe de toxicité devant être déterminée à partir d'essais portant sur 6 animaux par groupe de concentration d'essai, indépendamment du sexe.

7. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés, et sont pris en compte dans l'interprétation des résultats de l'essai au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation de l'OCDE n° 19 sur les effets mesurés éthiquement acceptables détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente (7).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces animales

8. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

9. Les femelles sont nullipares et non gravides. Le jour de leur exposition, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 8 à 12 semaines. Leur poids corporel ne devra pas excéder, pour chaque sexe, ± 20 % du poids moyen des animaux du même âge précédemment exposés. Sélectionnés au hasard, les animaux sont marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, ils seront conservés dans leur cage pour une période d'au minimum 5 jours avant le début de l'essai. Les animaux sont également acclimatés aux appareils d'essai, pendant une courte période précédant l'essai, afin d'atténuer le stress causé par leur introduction dans un nouvel environnement.

Conditions d'élevage des animaux

10. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est de 22 ± 3 °C. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal, et ne doit engendrer qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés «nez seul», il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne doivent pas provoquer chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données

▼M4

génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable, alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés «corps entier» à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour empêcher la filtration de l'aérosol par la fourrure de leurs congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

Chambres d'inhalation

11. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de la substance d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition «nez seul» (qui inclut les dispositifs «tête seule», «nez seul» et «museau seul») est privilégié. Le mode d'exposition «nez seul» est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition «corps entier» peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais elle est justifiée dans le rapport de l'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition «corps entier», on veillera à ce que le «volume» total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (8) décrit les principes des techniques d'exposition «corps entier» ou «nez seul», ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques

CONDITIONS D'EXPOSITION

Administration des concentrations

12. Il est recommandé une durée fixe d'exposition de quatre heures, sans compter le temps d'équilibration. D'autres durées d'exposition sont possibles pour répondre à des besoins spécifiques, cependant une justification devra être apportée dans le rapport d'étude, voir document d'orientation 39 (8). Les animaux exposés «corps entier» demeurent seuls dans la chambre afin d'éviter l'ingestion de la substance d'essai par le toilettage de leurs compagnons. Les animaux sont privés de nourriture pendant la période d'exposition. Dans une exposition «corps entier», les animaux peuvent boire de l'eau.

13. Les animaux sont exposés à la substance d'essai présentée sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou sous une forme mixte. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, de la concentration choisie, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion.

Répartition granulométrique

14. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles de se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 4 μm, avec un écart type géométrique (σ_g) compris entre 1,5 et 3,0 (8) (13) (14). Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques peuvent avoir une taille inférieure à cette norme, tandis que les particules chargées, les fibres et les substances hygroscopiques (dont la taille augmente dans l'environnement humide du tractus respiratoire) peuvent avoir une taille supérieure.

▼M4

Préparation de la substance d'essai dans un véhicule

15. Pour atteindre la concentration et la taille granulométrique appropriées de la substance d'essai, il est possible d'avoir recours à un véhicule; en règle générale l'eau est choisie de préférence. Les substances particulaires peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin d'atteindre la répartition granulométrique requise, mais un soin particulier devra être pris de ne pas décomposer ou altérer la substance d'essai. Lorsque les procédés mécaniques sont suspectés d'avoir altéré la composition de la substance d'essai (température extrême due aux frictions d'un broyage excessif, par exemple), la composition de la substance d'essai devra être vérifiée analytiquement. On prendra soin de ne pas contaminer la substance d'essai. Il n'est pas nécessaire de tester les substances granulaires non friables qui sont élaborées précisément pour ne pas être inhalables. Un test d'usure de surface est réalisé pour démontrer que la manipulation de la substance granulaire ne produit pas de particules respirables. Dans le cas contraire, un essai de toxicité par inhalation est réalisé.

Animaux témoins

16. Un groupe témoin négatif (air) n'est pas nécessaire. Lorsqu'un véhicule autre que l'eau est utilisé pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est utilisé seulement quand on ne dispose pas de données historiques sur la toxicité. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude de la substance d'essai préparée dans un véhicule, celui-ci est considéré comme non toxique à la concentration testée; il n'y a donc pas lieu d'utiliser de témoin du véhicule.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION

Débit d'air dans la chambre d'exposition

17. Le débit d'air dans la chambre est contrôlé avec soin, suivi en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les paramètres dynamiques pertinents de la production de l'atmosphère d'essai. On prendra particulièrement soin d'éviter toute re-respiration dans les chambres d'exposition «nez seul» lorsque le débit d'air à travers le système d'exposition ne permet pas de produire une circulation dynamique de l'atmosphère contenant la substance d'essai. Des méthodologies sont prévues pour démontrer l'absence de re-respiration dans les conditions expérimentales choisies (8) (15). La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasse pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées.

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

18. La température de la chambre d'exposition est maintenue à 22 ± 3 °C. Dans les cas d'exposition «nez seul» et «corps entier» l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est suivie et enregistrée trois fois au minimum pour les durées allant jusqu'à 4 heures, et toutes les heures pour les durées plus courtes. Le taux d'humidité relative est idéalement compris entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple, dans le cas d'un mélange à base d'eau), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences de la substance d'essai avec la méthode d'essai.

▼M4

Substance d'essai: concentration nominale

19. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de la substance d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai: concentration réelle

20. La concentration réelle est la concentration de la substance d'essai dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à la substance d'essai sont également effectuées par une pré-étude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre la substance d'essai (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie. Les concentrations cibles, nominales et réelles sont fournies dans le rapport d'étude, mais seules les concentrations réelles sont utilisées dans les analyses statistiques pour calculer la valeur des concentrations létales.

21. Il est recommandé de n'employer si possible qu'un seul lot de la substance d'essai, et l'échantillon de la substance est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il convient de réaliser une caractérisation de la substance d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes: temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de la substance d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).

22. L'atmosphère d'exposition est maintenue aussi constante que possible, et suivie soit en continu, soit par intermittence en fonction de la méthode d'analyse. Lorsque l'injection s'effectue de façon intermittente, les échantillons d'atmosphère de la chambre sont prélevés au moins deux fois sur une étude de quatre heures. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, le recueil d'un échantillon pour toute la période d'exposition est acceptable. Si des fluctuations nettes apparaissent d'un échantillon à un autre, la prochaine concentration d'essai devra utiliser quatre échantillons par exposition. Les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas ± 10 % pour les gaz et vapeurs et ± 20 % pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de la substance d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition t_{95}. Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (8).

▼M4

23. Pour des mélanges très complexes constitués de gaz ou vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion ou substances d'essai propulsées à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisira donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général le principe actif du mélange. Quand la substance d'essai est un mélange, la concentration analytique devra être indiquée pour le mélange global et pas uniquement pour le principe actif ou le composant (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (8).

Substance d'essai: répartition granulométrique

24. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum deux fois pour chaque exposition de 4 heures, à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques. Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade ou un autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, voir document d'orientation 39 (8). Si cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au minimum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter une exposition. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes (voir paragraphe 14).

MODE OPÉRATOIRE

Essai principal

25. Pour chaque étape, trois animaux de chaque sexe, ou six animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, seront utilisés. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées «nez seul», il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le niveau de concentration à utiliser comme dose initiale est choisi parmi les quatre niveaux fixés; le niveau de concentration initiale est celui le plus susceptible de présenter une toxicité pour certains des animaux traités. Les schémas d'essai pour les gaz, les vapeurs et les aérosols (présentés dans les appendices 2 à 4) correspondent aux essais effectués aux valeurs limites des catégories 1 à 4 du règlement relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage (9), pour les gaz (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 h) (appendice 2), pour les vapeurs (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 h) (appendice 3) et pour les aérosols (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4 h) (appendice 4). La catégorie 5, que ne prévoit pas le règlement (CE) n° 1272/2008 (9), se rapporte à des concentrations dépassant les concentrations limites respectives. Chacune des concentrations de départ possède son propre schéma d'essai. En fonction du nombre d'animaux morts ou euthanasiés, le mode opératoire d'essai suit les flèches indiquées jusqu'à ce qu'une catégorisation puisse être établie.

26. L'intervalle de temps entre l'exposition des différents groupes est déterminé par le moment d'apparition, la durée et la gravité des signes de toxicité observés. L'exposition des animaux au niveau de concentration supérieur est retardée jusqu'à ce que l'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Il est recommandé d'espacer de trois à quatre jours les expositions à chaque niveau de concentration afin de permettre l'observation d'une toxicité retardée. L'intervalle de temps peut être ajusté, par exemple en cas de réponses peu concluantes.

▼M4

Essai limite

27. L'essai limite est utilisé si l'on sait ou si l'on prévoit que la substance d'essai sera virtuellement non toxique, c'est-à-dire qu'elle ne suscitera une réponse de toxicité qu'au-delà de la concentration limite réglementaire. Des informations sur la toxicité de la substance d'essai peuvent être tirées d'essais déjà pratiqués sur des substances ou mélanges analogues, en tenant compte de l'identité et du pourcentage des composants dont la toxicité est avérée. Si l'on manque d'informations sur la toxicité de la substance d'essai, ou si l'on s'attend à ce qu'elle soit toxique, l'essai principal est réalisé; le document d'orientation 39 fournit de plus amples informations à ce sujet (8).

28. Selon le mode opératoire normal, trois animaux par sexe, ou six animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont exposés à des concentrations de 20 000 ppm pour les gaz, 20 mg/l pour les vapeurs et 5 mg/l pour les poussières/brouillards. Si elles sont atteintes, ces concentrations servent de limite d'essai pour la présente méthode d'essai. Pour les essais d'aérosols, le principal objectif est d'atteindre une taille de particule qui soit respirable (c'est-à-dire un DAMM de 1 à 4 μm), ce qui est possible avec la plupart des substances d'essai à des concentrations de 2 mg/l. Les essais sur des aérosols à des concentrations supérieures à 2 mg/l ne sont tentés que si l'on peut obtenir des particules de taille respirable, voir document d'orientation 39 (8). Selon le SGH (16), il est déconseillé de réaliser des essais au-delà des concentrations limites, pour des raisons de bien-être des animaux. Les essais en catégorie 5 du SGH (16), non prévue par le règlement (CE) n° 1272/2008 (9), ne sont envisagés que s'il est très probable que leurs résultats présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé humaine, et une justification est alors fournie dans le rapport d'essai. En cas de substance potentiellement explosive, on prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de provoquer une explosion. Afin d'éviter le recours inutile à des animaux, un essai sans animaux est effectué avant l'essai limite pour s'assurer qu'il est possible d'atteindre dans la chambre les conditions expérimentales d'un essai limite.

OBSERVATIONS

29. Un examen clinique des animaux est pratiqué régulièrement pendant la période d'exposition. Après l'exposition, des examens cliniques sont réalisés au minimum deux fois le jour de l'exposition, ou plus fréquemment suivant la réponse des animaux au traitement, et au minimum une fois par jour par la suite pendant une période de 14 jours. La durée de la période d'observation n'est pas fixée, mais est déterminée par la nature et le moment d'apparition des signes cliniques, ainsi que par la durée de la période de récupération. Les moments d'apparition et de disparition des signes de toxicité sont importants, en particulier lorsque les signes de toxicité ont tendance à être retardés. Toutes les observations sont systématiquement enregistrées individuellement pour chaque animal. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés pour des raisons de bien-être animal. Lors de l'examen clinique des signes de toxicité, il convient de veiller à ne pas confondre une piètre apparence initiale et des troubles respiratoires passagers, imputables à la procédure d'exposition, avec les effets liés au traitement. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets mesurés éthiquement acceptables sont pris en considération (7). Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.

▼M4

30. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, mais aussi sur les changements affectant l'appareil respiratoire, le système circulatoire, les systèmes nerveux autonome et central, ainsi que l'activité somatomotrice et le comportement. Toute différentiation entre les effets locaux et systémiques est consignée autant que possible. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma doivent retenir l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement.

Poids corporel

31. Le poids corporel de chacun des animaux est enregistré une fois lors de la période d'acclimatation, le jour de l'exposition (jour 0) juste avant celle-ci, et au moins les jours 1, 3 et 7 (puis de façon hebdomadaire par la suite) ainsi qu'au moment de la mort ou de l'euthanasie, s'il est postérieur au jour 1. Le poids corporel est un indicateur critique reconnu de la toxicité, on surveillera donc attentivement les animaux, dont le poids reste constamment inférieur de 20 % ou plus à celui précédant l'étude. Les animaux survivants sont pesés et euthanasiés à la fin de la période postexposition.

Pathologie

32. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai ou euthanasiés et écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une autopsie macroscopique. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.

33. D'autres observations, ajoutées a priori à dessein, peuvent être envisagées afin d'élargir l'interprétation de l'étude, comme la mesure du poids pulmonaire des rats survivants et/ou la mise en évidence d'une irritation par examen de l'appareil respiratoire au microscope. Les organes examinés peuvent être ceux pour lesquels une réaction au traitement est connue ou attendue et ceux montrant une pathologie macroscopique chez les animaux survivant au moins 24 heures. Un examen microscopique de l'intégralité de l'appareil respiratoire peut fournir des informations utiles pour les substances d'essai réactives à l'eau, comme les acides et les substances hygroscopiques.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

34. Pour chacun des animaux, le poids corporel et les conclusions de l'autopsie sont fournis. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquer pour chaque groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie.

▼M4

Rapport d'essai

35. Le rapport d'essai contient, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage:

— description des conditions d'encagement, y compris: nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire,

— espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat,

— nombre, âge et sexe des animaux,

— méthode de randomisation,

— détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau),

— description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

Substance d'essai:

— nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation),

— données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule:

— justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau),

— données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation:

— description de la chambre d'inhalation avec ses dimensions et son volume,

— source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère,

— équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle,

— source d'air, traitement de l'air fourni/évacué et système de climatisation utilisé,

— méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai,

— différence de pression (positive ou négative),

— orifices d'exposition par chambre («nez seul») ou emplacement des animaux dans le système («corps entier»),

— homogénéité/stabilité temporelle de l'atmosphère d'essai,

— situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition,

— débits d'air, débit d'air/orifice d'exposition («nez seul») ou rapport du volume de l'animal à la chambre («corps entier»),

— informations sur l'équipement utilisé, le cas échéant, pour mesurer l'oxygène et le dioxyde de carbone,

▼**M4**

— temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}),

— nombre de changements de volume par heure,

— doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition:

— justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale,

— concentrations nominales (masse totale de substance d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre),

— concentrations réelles de la substance d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges à tester produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément,

— toutes les concentrations atmosphériques sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m^3, etc.); les unités de volume (ppm, ppb) peuvent aussi être indiquées entre parenthèses,

— répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique (σ_g), ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales

— détails sur la préparation de la substance d'essai, y compris sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des substances solides ou pour préparer les solutions de la substance d'essai. Lorsque des procédés mécaniques sont susceptibles d'avoir altéré la composition de la substance d'essai, inclure les résultats des analyses effectuées pour vérifier la composition de la substance d'essai,

— description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci,

— détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération de la substance d'essai à partir du milieu d'échantillonnage),

— justification du choix des concentrations d'essai.

Résultats:

— tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation,

— tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation,

— tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g,

— tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de mortalité, et nature, sévérité et durée des effets),

— poids corporel de chacun des animaux enregistrés lors de l'essai, date et heure de leur mort si celle-ci intervient avant l'euthanasie prévue; moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et, le cas échéant, leur réversibilité,

▼M4

— pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques disponibles,

— classement dans les catégories du règlement (CE) nº 1272/2008 et valeur limite de la CL_{50}.

Discussion et interprétation des résultats:

— un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente méthode d'essai, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules,

— la respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis,

— la cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude,

— la cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés,

— une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (7).

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Chapitre B.2 de la présente annexe, Toxicité aiguë (inhalation).

(2) Holzhütter H.-G., Genschow E., Diener W., and Schlede E. (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Évaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.

(3) Diener W., Kayser D. and Schlede E. (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Évaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

(4) Diener W. and Schlede E. (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129-134.

(5) Chapitre B.1 *ter* de la présente annexe, Toxicité orale aiguë — méthode de la classe de toxicité aiguë.

(6) OCDE (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations nº 105, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(7) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Évaluation. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations nº 19, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations nº 39, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(9) Règlement (CE) nº 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) nº 1907/2006 (JO L 353 du 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

(10) Chapitre B.40 de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: essai de résistance électrique transcutanée (RET).

(11) Chapitre B.40 *bis* de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: essai sur modèle de peau humaine.

(12) OCDE (2005). Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques nº 435, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (http://www.oecd.org/env/testguidelines).

(13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

(14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.

(15) Pauluhn J. and Thiel A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167

(16) Nations unies (2007), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), ST/SG/AC.10/30, Nations unies, New York et Genève. Disponible sur l'internet (http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html).

▼**M4**

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M4

Appendice 2

Procédure à suivre pour chacune des concentrations initiales dans le cas des gaz (ppm/4 h)

Remarques générales ([1])

Pour chaque concentration initiale, les schémas d'essai figurant dans le présent appendice indiquent la procédure à suivre.

Appendice 2 bis: concentration initiale de 100 ppm.

Appendice 2 ter: concentration initiale de 500 ppm.

Appendice 2 quater: concentration initiale de 2 500 ppm.

Appendice 2 quinquies: concentration initiale de 20 000 ppm.

Selon le nombre d'animaux morts ou euthanasiés, la procédure d'essai se poursuit en suivant les flèches indiquées.

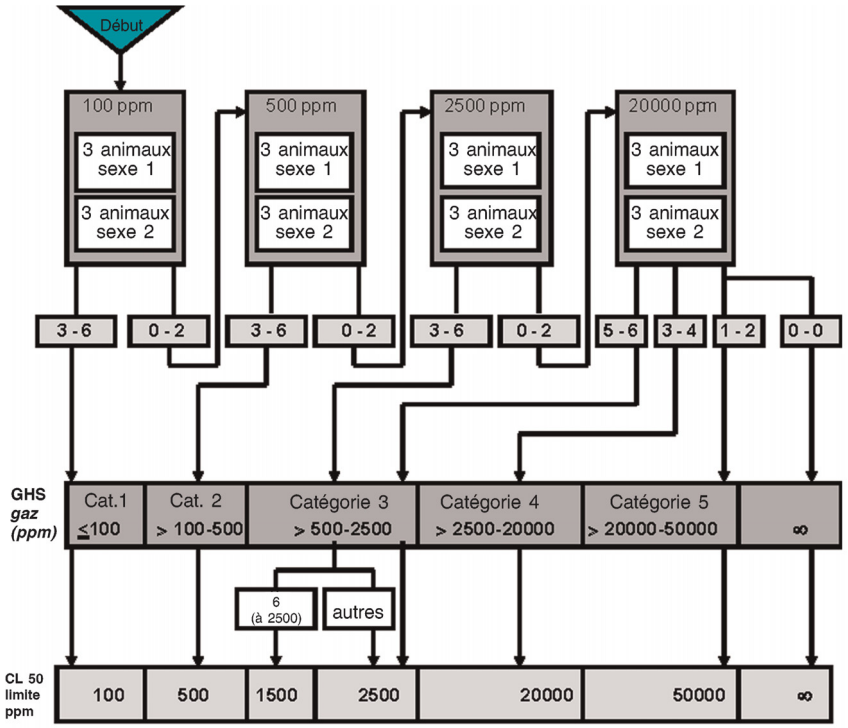
([1]) Les tableaux ci-après renvoient au système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). L'équivalent de ce système au sein de l'Union européenne est le règlement (CE) nº 1272/2008. Dans le cas de la toxicité aiguë par inhalation, le règlement (CE) nº 1272/2008 (9) ne prévoit pas la catégorie 5.

▼M4

Appendice 2 bis

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 100 ppm/4 h pour les gaz



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

— 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/ concentration testée

— GHS: Système général harmonisé de classification

— ∞: non classé

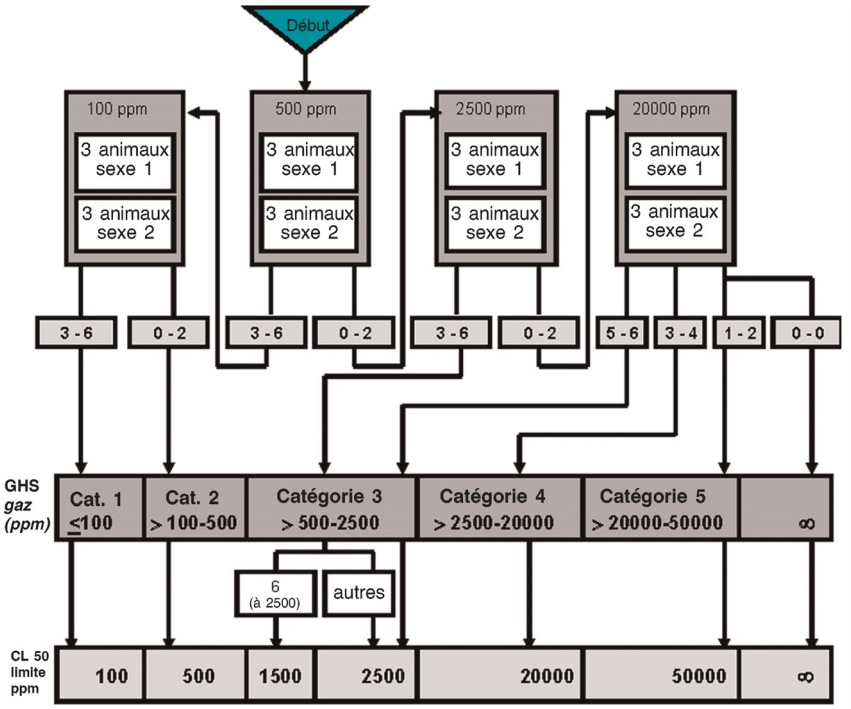
— Essai à ≥ 20 000 ppm/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 2 ter

Toxicité aiguë par inhalation:

procédure d'essai avec une concentration initiale de 500 ppm/4h pour les gaz



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

— 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/ concentration testée

— SGH: Système général harmonisé de classification

— ∞: non classé

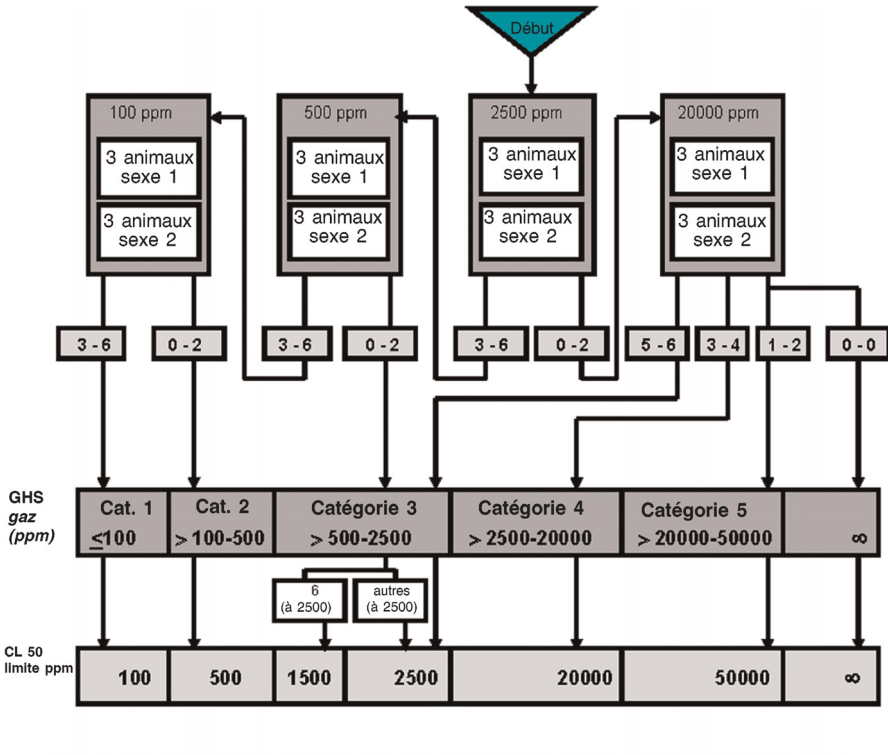
— Essai à ≥ 20 000 ppm/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 2 quater

Toxicité aiguë par inhalation:

procédure d'essai avec une concentration initiale de 2 500 ppm/4h pour les gaz



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

— 0–6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée

— SGH: Système général harmonisé de classification

— ∞: non classé

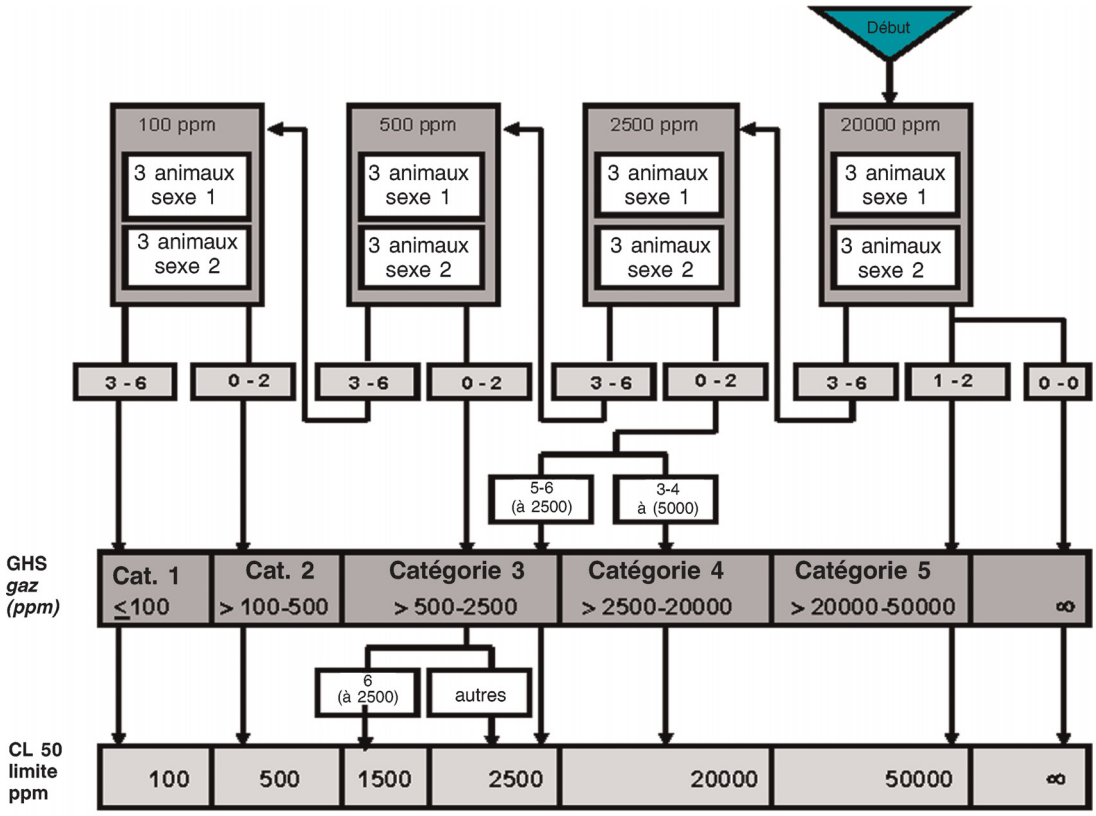
— Essai à ≥ 20 000 ppm/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 2 quinquies

Toxicité aiguë par inhalation:

procédure d'essai avec une concentration initiale de 20 000 ppm/4h pour les gaz



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

— 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée

— SGH: Système général harmonisé de classification

— ∞: non classé

— Essai à ≥ 20 000 ppm/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 3

Procédure à suivre pour chacune des concentrations initiales dans le cas des vapeurs (mg/l/4 h)

Remarques générales ([1])

Pour chaque concentration initiale, les schémas d'essai figurant dans le présent appendice indiquent la procédure à suivre.

Appendice 3 *bis*: concentration initiale de 0,5 mg/l.

Appendice 3 *ter*: concentration initiale de 2,0 mg/l.

Appendice 3 *quater*: concentration initiale de 10 mg/l.

Appendice 3 *quinquies*: concentration initiale de 20 mg/l.

Selon le nombre d'animaux morts ou euthanasiés, la procédure d'essai se poursuit en suivant les flèches indiquées.

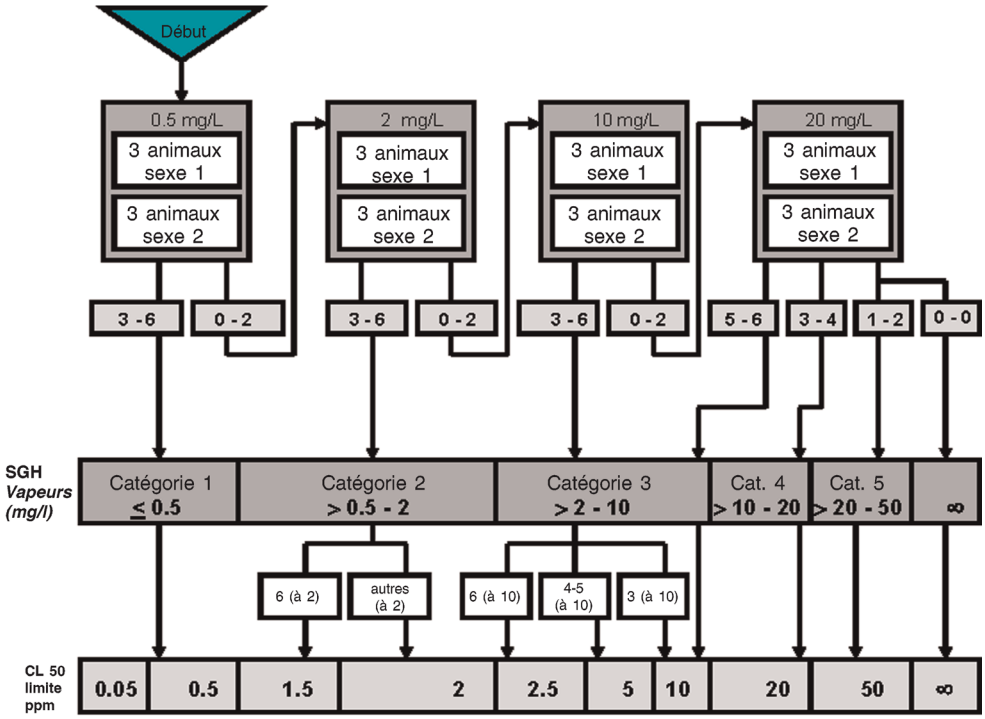
([1]) Les tableaux ci-après renvoient au système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). L'équivalent de ce système au sein de l'Union européenne est le règlement (CE) nº 1272/2008. Dans le cas de la toxicité aiguë par inhalation, le règlement (CE) nº 1272/2008 (9) ne prévoit pas la catégorie 5.

▼M4

Appendice 3 bis

Toxicité aiguë par inhalation:

procédure d'essai avec une concentration initiale de 0,5 mg/l/4h pour les vapeurs



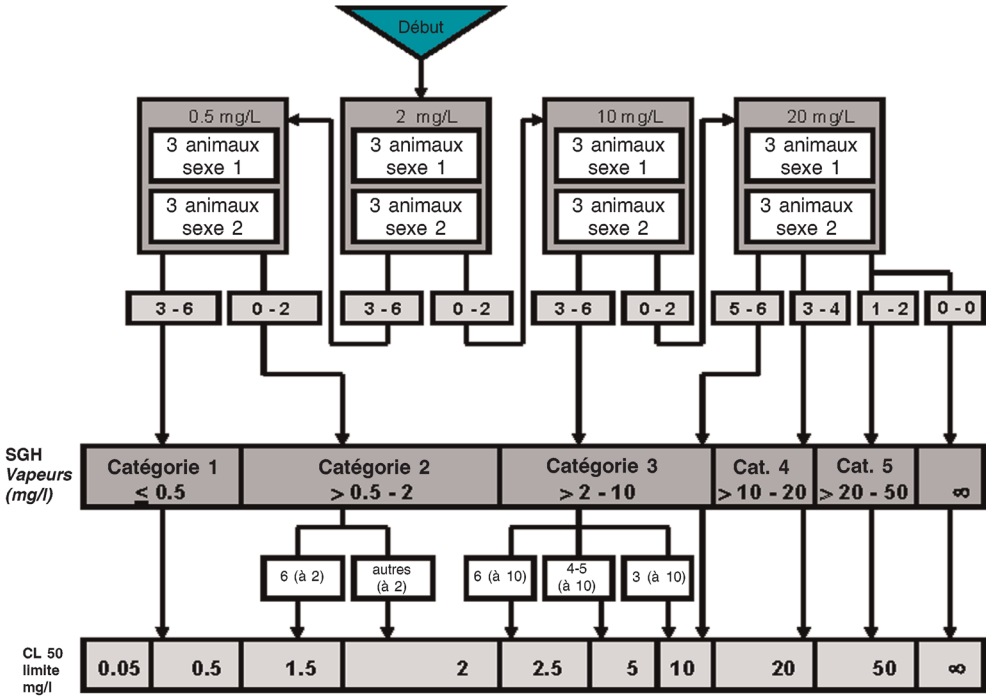
- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à 50 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 3 ter

Toxicité aiguë par inhalation:

procédure d'essai avec une concentration initiale de 2 mg/l/4h pour les vapeurs



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

— 0–6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée

— SGH: Système général harmonisé de classification

— ∞: non classé

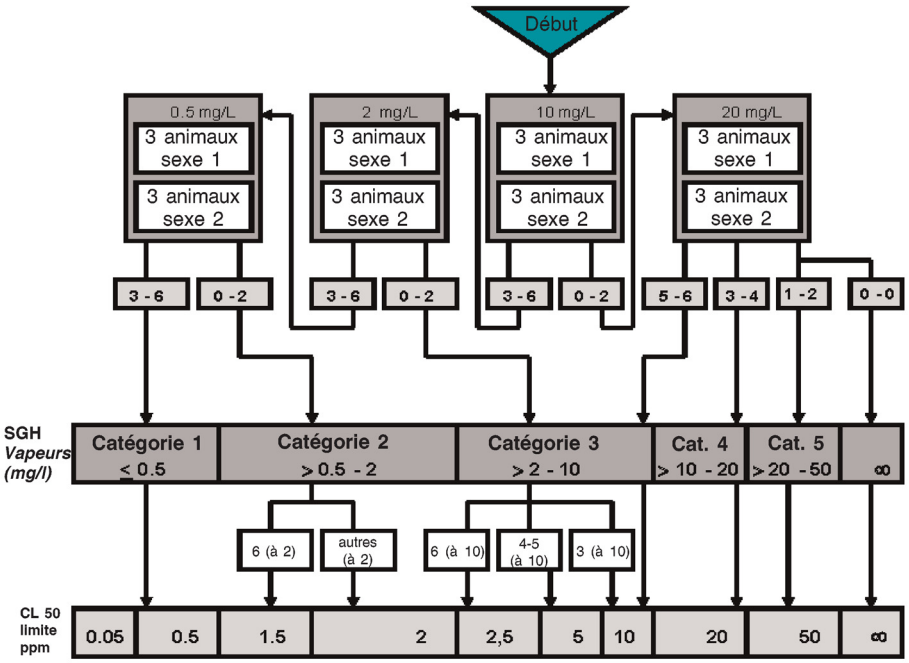
— Essai à 50 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 3 quater

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 10 mg/l/4h pour les vapeurs



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

— 0–6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée

— SGH: Système général harmonisé de classification

— ∞: non classé

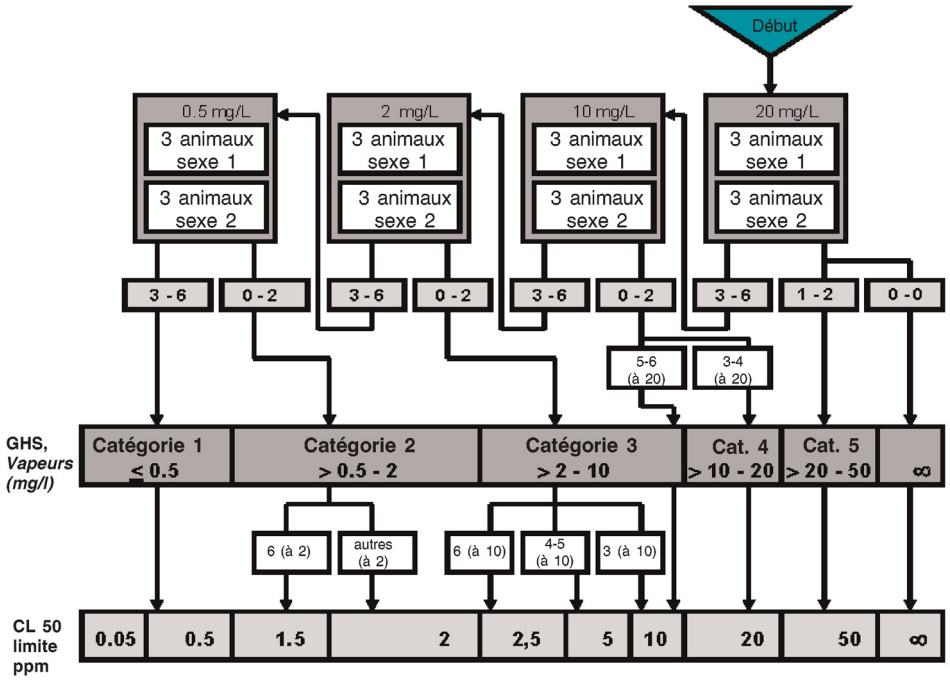
— Essai à 50 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 3 quinquies

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initialede 20 mg/l/4h pour les vapeurs



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

— 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée

— SGH: Système général harmonisé de classification

— ∞: non classé

— Essai à 50 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 4

Procédure à suivre pour chacune des concentrations initiales dans le cas des aérosols (mg/l/4 h)

Remarques générales ([1])

Pour chaque concentration initiale, les schémas d'essai figurant dans le présent appendice indiquent la procédure à suivre.

Appendice 4 *bis*: concentration initiale de 0,05 mg/l.

Appendice 4 *ter*: concentration initiale de 0,5 mg/l.

Appendice 4 *quater*: concentration initiale de 1 mg/l.

Appendice 4 *quinquies*: concentration initiale de 5 mg/l.

Selon le nombre d'animaux morts ou euthanasiés, la procédure d'essai se poursuit en suivant les flèches indiquées.

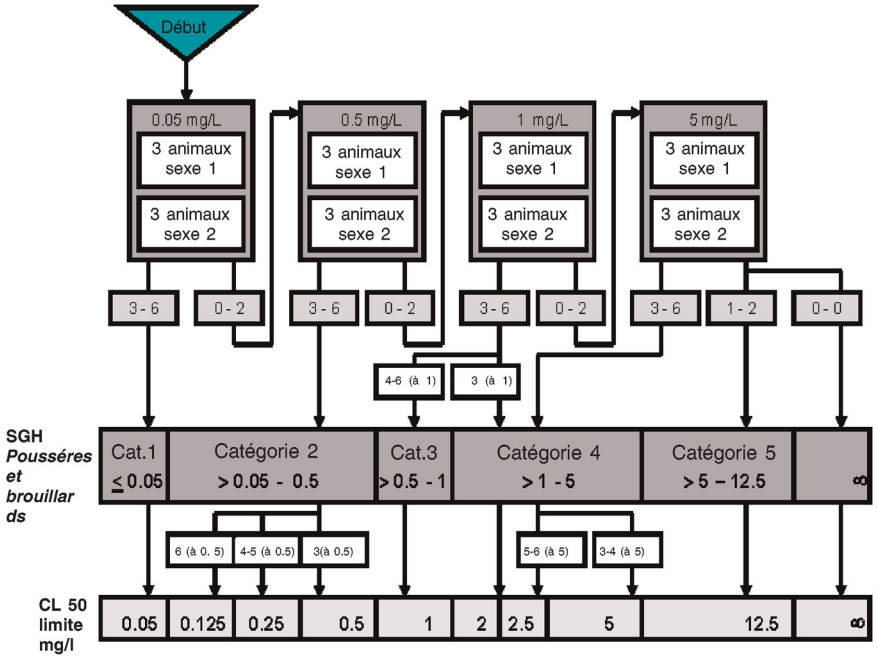
([1]) Les tableaux ci-après renvoient au système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). L'équivalent de ce système au sein de l'Union européenne est le règlement (CE) nº 1272/2008. Dans le cas de la toxicité aiguë par inhalation, le règlement (CE) nº 1272/2008 (9) ne prévoit pas la catégorie 5.

▼M4

Appendice 4 bis

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 0.05 mg/l/4h pour les vapeurs



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape

— 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée

— SGH: Système général harmonisé de classification

— ∞: non classé

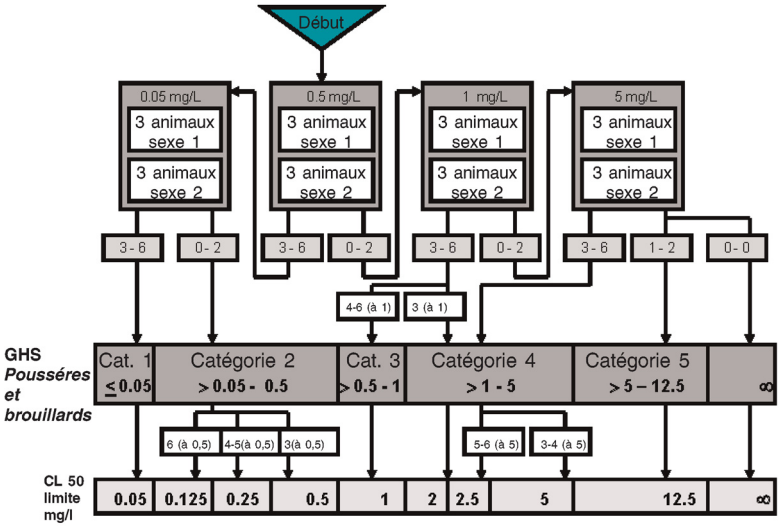
— Essai à 12,5 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 4 ter

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 0,5 mg/l/4h pour les aérosols



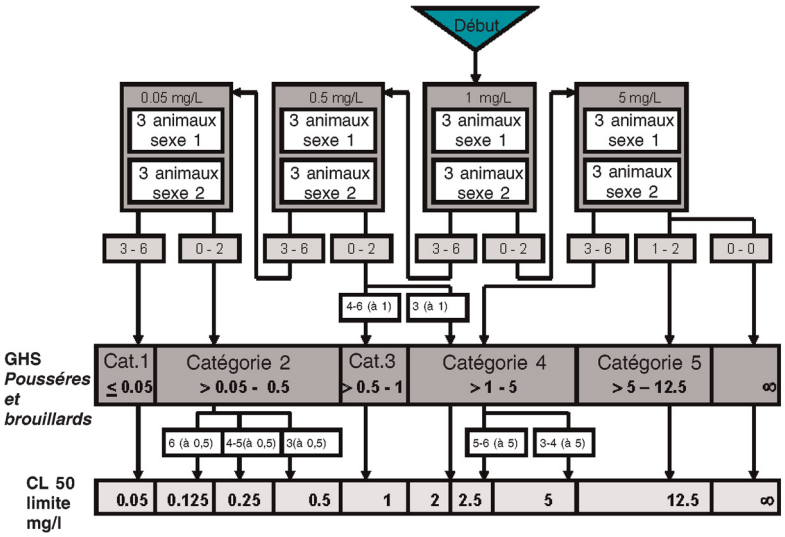
— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
— 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
— GHS: Système général harmonisé de classification
— ∞: non classé
— Essai à 12,5 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 4 quater

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 1 mg/l/4h pour les aérosols



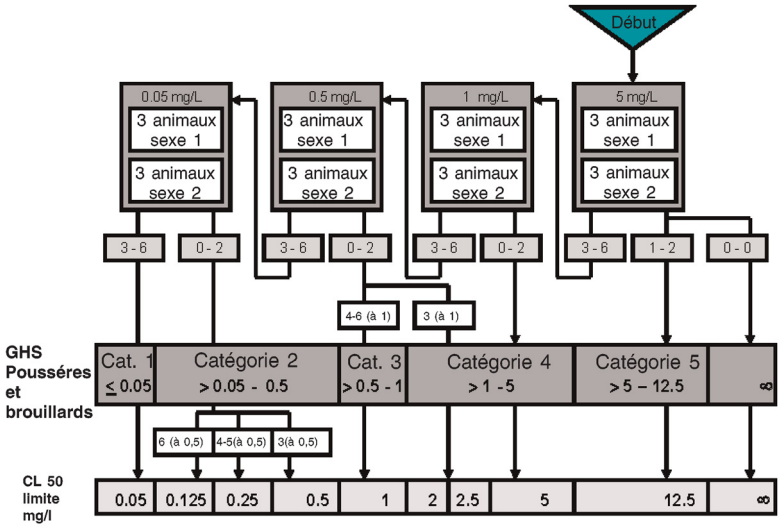
— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
— 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
— GHS: Système général harmonisé de classification
— ∞: non classé
— Essai à 12,5 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

▼M4

Appendice 4 quinquies

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 5 mg/l/4h pour les aérosols



— 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
— 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
— GHS: Système général harmonisé de classification
— ∞: non classé
— Essai à 12,5 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)»

▼B

PARTIE C: MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE L'ÉCOTOXICITÉ

TABLE DES MATIÈRES

C.1.	TOXICITÉ AIGUË VIS-À-VIS DES POISSONS
C.2.	*DAPHNIA* SP., ESSAI D'IMMOBILISATION IMMÉDIATE
C.3.	ALGUES D'EAU DOUCE ET CYANOBACTÉRIES, ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE
C.4.	DÉTERMINATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ «FACILE»
PARTIE I.	GÉNÉRALITÉS
PARTIE II.	ESSAI DE DISPARITION DU COD (Méthode C.4-A)
PARTIE III.	ESSAI DE SCREENING MODIFIÉ DE L'OCDE (Méthode C.4-B)
PARTIE IV.	ESSAI DE DÉGAGEMENT DE CO_2 (Méthode C.4-C)
PARTIE V.	ESSAI DE RESPIROMÉTRIE MANOMÉTRIQUE (Méthode C.4-D)
PARTIE VI.	ESSAI EN FIOLES FERMÉES (Méthode C.4-E)
PARTIEVII-.	ESSAI MITI (Méthode C.4-F)
C.5	DÉGRADATION — DEMANDE BIOCHIMIQUE EN OXYGÈNE
C.6.	DÉGRADATION — DEMANDE CHIMIQUE EN OXYGÈNE
C.7.	DÉGRADATION — DÉGRADATION ABIOTIQUE: HYDROLYSE EN FONCTION DU PH
C. 8.	TOXICITÉ POUR LES VERS DE TERRE
C. 9.	BIODÉGRADATION — ESSAI DE ZAHN ET WELLENS
C. 10.	ESSAI DE SIMULATION – TRAITEMENT AÉROBIE DES EAUX USÉES: C.10-A: UNITÉS DE TRAITEMENT PAR BOUES ACTIVÉES – C.10-B: BIOFILMS
C.11.	BIODÉGRADATION — BOUES ACTIVÉES: ESSAI D'INHIBITION DE LA RESPIRATION
C. 12.	BIODÉGRADATION — TEST S.C.A.S. MODIFIÉ
C.13	BIOCONCENTRATION: ESSAI AVEC RENOUVELLEMENT CONTINU SUR LES POISSONS
C. 14.	POISSON, ESSAI SUR LA CROISSANCE DES JUVÉNILES
C. 15.	POISSON, ESSAI DE TOXICITÉ À COURT TERME AUX STADES DE L'EMBRYON ET DE L'ALEVIN
C.16.	ABEILLE DOMESTIQUE — ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË PAR VOIE ORALE
C.17.	ABEILLE DOMESTIQUE — ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË PAR CONTACT
C. 18.	DÉTERMINATION DE L'ADSORPTION/DÉSORPTION AU MOYEN DE LA MÉTHODE PAR AGITATION

▼**B**

C. 19.	ESTIMATION DU COEFFICIENT D'ADSORPTION (K_{OC}) SUR LE SOL ET LES BOUES D'ÉPURATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)
C.20	*DAPHNIA MAGNA,* ESSAI DE REPRODUCTION
C.21.	MICRO-ORGANISMES DU SOL: ESSAI DE TRANSFORMATION DE L'AZOTE
C.22.	MICRO-ORGANISMES DU SOL: ESSAI DE TRANSFORMATION DU CARBONE
C.23.	TRANSFORMATION AÉROBIE ET ANAÉROBIE DANS LE SOL
C.24.	TRANSFORMATION AÉROBIE ET ANAÉROBIE DANS LES SYSTÈMES SÉDIMENTAIRES AQUATIQUES
C.25.	MINÉRALISATION AÉROBIE DANS LES EAUX SUPERFICIELLES — ESSAI DE SIMULATION DE LA BIODÉGRADATION
C.26.	*LEMNA* SP. ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE

▼**M4**

C.27.	ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES CHIRONOMES DANS UN SYSTÉME EAU-SÉDIMENT DOPÉ
C.28.	ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES CHIRONOMES DANS UN SYSTÈME EAU CHARGÉE-SÉDIMENT
C.29.	BIODÉGRADABILITÉ FACILE – DÉGAGEMENT DE CO_2 DANS DES FLACONS HERMÉTIQUEMENT CLOS (ESSAI DE L'ESPACE DE TÊTE AU-DESSUS DU LIQUIDE)
C.30.	BIOACCUMULATION CHEZ LES OLIGOCHÈTES TERRESTRES

▼B

C.1. TOXICITÉ AIGUË VIS-À-VIS DES POISSONS

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Cet essai a pour objet de déterminer la toxicité aiguë létale d'une substance vis-à-vis des poissons en eau douce. Dans la mesure du possible, il est souhaitable de disposer d'informations sur l'hydrosolubilité, la pression de vapeur, la stabilité chimique, les constantes de dissociation et la biodégradabilité de la substance d'essai en vue du choix de la méthode d'essai la plus appropriée (statique, semi-statique ou dynamique), permettant d'assurer des concentrations constantes satisfaisantes de la substance d'essai pendant la période expérimentale.

Des informations supplémentaires (par exemple, la formule développée, le degré de pureté, la nature et le pourcentage des impuretés significatives, la présence et la quantité d'additifs, le coefficient de partage n-octanol/eau) doivent être prises en considération lors de la conception de l'essai et de l'interprétation des résultats.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

La toxicité aiguë est l'effet préjudiciable et observable provoqué dans un organisme pendant une courte durée (jours) d'exposition à une substance donnée. Dans le présent essai, la toxicité aiguë est exprimée comme la concentration létale médiane (CL_{50}), c'est-à-dire la concentration qui, dans l'eau, est responsable de la mort de 50 % des poissons d'un lot soumis aux essais pendant une période d'exposition continue qui est à indiquer.

Toutes les concentrations de la substance d'essai sont indiquées en poids par volume (mg/l). Elles peuvent également être exprimées en poids par poids (mg/kg^{-1}).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

On pourra soumettre à essai une substance de référence afin de démontrer que, dans les conditions d'essai en laboratoire, la réponse de l'espèce utilisée pour l'essai n'a pas varié de façon significative.

Aucune substance de référence n'est indiquée pour cet essai.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Un essai limite peut être effectué à 100 mg/l afin de démontrer que la CL_{50} est supérieure à cette concentration.

Les poissons sont exposés à la substance d'essai ajoutée à l'eau, dans une série de concentrations pendant une période de 96 heures. Les mortalités sont notées au moins toutes les 24 heures et les concentrations responsables de la mort de 50 % des poissons (CL_{50}) sont calculées si possible à chaque moment d'observation.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Les critères de qualité doivent s'appliquer à l'essai limite aussi bien qu'à l'essai complet.

La mortalité des témoins ne doit pas dépasser 10 % (ou un poisson, si le nombre d'animaux utilisés pour l'essai est inférieur à 10) à la fin de l'essai.

La concentration en oxygène doit être supérieure à 60 % de la concentration saturante pendant toute la durée de l'essai.

▼B

La concentration de la substance d'essai sera maintenue au moins à 80 % de la concentration initiale pendant toute la durée de l'essai.

Pour les substances qui se dissolvent facilement dans le milieu d'essai et qui donnent des solutions stables, c'est-à-dire les substances qui ne se volatilisent pas, ne se dégradent pas, ne s'hydrolysent pas ou ne s'adsorbent pas en quantité significative, on peut considérer que la concentration initiale est la même que la concentration nominale. Il faudra prouver que la concentration a été maintenue constante pendant la durée de l'essai et que les critères de qualité ont été respectés.

Pour les substances qui sont:

i) peu solubles dans le milieu d'essai, ou

ii) susceptibles de former des émulsions ou des dispersions stables, ou

iii) instables en solution aqueuse,

la concentration initiale retenue sera la concentration mesurée dans la solution (ou si cela s'avère techniquement impossible, mesurée dans la colonne d'eau) au début de l'essai. La concentration doit être mesurée après une période d'équilibrage mais avant l'introduction des organismes d'essai.

Dans tous les cas cités ci-dessus, il y a lieu d'effectuer des mesures supplémentaires au cours de l'essai pour confirmer les concentrations réelles d'exposition et que les critères de qualité ont été respectés.

Le pH ne doit pas varier de plus d'une unité.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Trois types de systèmes peuvent être utilisés:

Essai en statique:

Essai de toxicité au cours duquel n'intervient pas de renouvellement de la solution à étudier (les solutions restent inchangées pendant toute la durée de l'essai.)

Essai en semi-statique:

Essai sans renouvellement continu de la solution, mais avec un renouvellement régulier de la solution d'essai après des périodes prolongées (par exemple toutes les 24 heures).

Essai en dynamique:

Essai de toxicité au cours duquel l'eau est constamment renouvelée dans les récipients d'essai, le produit chimique soumis à essai étant transporté par l'eau utilisée pour renouveler le milieu d'essai.

1.6.1. **Réactifs**

1.6.1.1. *Solutions de substance à tester*

Les solutions mères de concentration requise sont préparées par dissolution de la substance dans de l'eau désionisée, ou dans de l'eau répondant aux conditions fixées au point 1.6.1.2.

Les concentrations choisies pour l'essai sont préparées par dilution de la solution mère. Si l'on procède à des essais à concentrations élevées, la substance peut être dissoute directement dans l'eau de dilution.

▼B

Les substances ne doivent normalement être testées que jusqu'à la limite de solubilité. Pour certaines substances (par exemple, les substances qui sont peu hydrosolubles, ou qui ont un P_{ow} élevé, ou qui forment dans l'eau une dispersion stable plutôt qu'une véritable solution), il est possible d'utiliser une concentration supérieure à la limite de solubilité de la substance pour être sûr que la concentration soluble/stable maximale a bien été atteinte. Il est toutefois important que cette concentration ne perturbe pas, par ailleurs, les conditions de l'essai (par exemple, formation d'un film de substance à la surface de l'eau empêchant l'oxygénation de l'eau, etc.).

Dans le cas de substances à faible hydrosolubilité, on peut avoir recours à la dispersion ultrasonique, à des solvants organiques, des émulsifiants ou des dispersants, pour préparer les solutions mères ou également pour faciliter la dispersion de ces substances dans le milieu d'essai. Quand des substances auxiliaires de ce type sont utilisées, toutes les concentrations d'essai doivent contenir la même quantité de substance auxiliaire, et un lot témoin supplémentaire de poissons doit être exposé à la même concentration de substance auxiliaire que celle qui est utilisée dans les séries d'essais. La concentration de tels auxiliaires doit être limitée et ne doit en aucun cas excéder 100 mg/l dans le milieu d'essai.

L'essai doit être effectué sans ajustement du pH. S'il apparaît un changement significatif du pH, il est souhaitable de répéter l'essai avec ajustement du pH et d'en consigner les résultats. Dans ce cas, la valeur du pH de la solution mère doit être ajustée à la valeur du pH de l'eau de dilution à moins que des raisons particulières ne s'y opposent. Pour ce faire, on utilisera de préférence HCl et NaOH. Cet ajustement doit être effectué de manière que la concentration de la substance d'essai dans la solution mère ne soit pas sensiblement modifiée. Si l'ajustement entraîne une réaction chimique ou une précipitation de la substance d'essai, il faut consigner ces observations dans le procès-verbal.

1.6.1.2. *Eau d'élevage et de dilution*

On peut utiliser de l'eau potable (non contaminée par des concentrations potentiellement nocives de chlore, de métaux lourds ou d'autres substances), de l'eau naturelle de bonne qualité ou de l'eau reconstituée (voir annexe 1). On utilisera de préférence des eaux dont la dureté totale est comprise entre 10 et 250 milligrammes par litre (en $CaCO_3$), et dont le pH est compris entre 6,0 et 8,5.

1.6.2. **Appareillage**

Tout l'appareillage doit être en matériau chimiquement inerte:

— système de dilution automatique (pour essai en dynamique),

— dispositif de mesure de l'oxygène,

— équipement pour la détermination de la dureté de l'eau,

— appareillage approprié pour le contrôle de la température,

— pHmètre.

1.6.3. **Poissons soumis à l'essai**

Les poissons doivent être en bonne santé et ne présenter aucune malformation apparente.

▼B

Les espèces utilisées doivent être choisies sur la base de critères pratiques, tels que leur disponibilité toute l'année, leur facilité d'entretien, leur commodité pour l'essai, leur sensibilité relative aux produits chimiques et tous facteurs significatifs sur le plan économique, biologique ou écologique. Dans le choix des espèces de poissons, il faut également prendre en considération la nécessité de pouvoir comparer les résultats et l'harmonisation internationale existante (référence 1).

Une liste des espèces de poissons recommandées pour la réalisation de cet essai figure à l'annexe 2; le poisson zèbre et la truite arc-en-ciel sont les espèces à utiliser de préférence.

1.6.3.1. *Élevage*

Les poissons soumis à l'essai doivent provenir de préférence d'un seul et même lot, dont les individus ont la même longueur et le même âge. Ils doivent être conservés pendant au moins 12 jours dans les conditions suivantes:

charge biologique:

appropriée au système utilisé (avec recirculation ou en dynamique) et aux espèces de poissons,

eau:

voir point 1.6.1.2,

lumière:

photopériode de 12 à 16 heures par jour,

concentration en oxygène dissous:

au moins 80 % de la saturation en air,

alimentation:

quotidienne ou trois fois par semaine, avec arrêt de 24 heures avant le début de l'essai.

1.6.3.2. *Mortalité*

Après une période d'adaptation de 48 heures, enregistrer les morts et appliquer les critères suivants:

— mortalité en 7 jours supérieure à 10 % de la population:

rejet de l'ensemble du lot,

— mortalité en 7 jours comprise entre 5 et 10 % de la population:

prolonger la période d'observation pendant 7 jours.

Si l'on ne constate aucun autre cas de mortalité, le lot est acceptable, sinon, il doit être rejeté,

— mortalité en 7 jours inférieure à 5 % de la population:

acceptation du lot.

1.6.4. **Adaptation**

Les poissons doivent être maintenus pendant au moins 7 jours avant leur utilisation dans les mêmes conditions que celles de l'essai (eau et température).

▼B

1.6.5. **Mode opératoire**

Avant l'essai définitif, on pourra procéder à un essai visant à déterminer l'intervalle de concentrations à utiliser lors de l'essai définitif.

Procéder, en plus de la série d'essais, à un essai témoin sans substance à étudier et, le cas échéant, à un essai témoin contenant le produit auxiliaire.

En fonction des propriétés physiques et chimiques de la substance à étudier, on choisira une méthode appropriée statique, semi-statique ou dynamique, qui réponde aux critères de qualité.

Les poissons sont exposés à la substance d'essai dans les conditions suivantes:

— durée: 96 heures,

— nombre d'animaux: au moins 7 par concentration,

— récipients: d'une capacité appropriée, en fonction de la charge biologique recommandée,

— charge biologique: charge maximale recommandée pour l'essai statique ou semi-statique: 1,0 gramme par litre; pour les essais dynamiques, une charge plus élevée peut être acceptable,

— concentrations d'essai: au moins cinq concentrations qui diffèrent d'un facteur constant n'excédant pas 2,2 et couvrent, dans la mesure du possible, l'intervalle de mortalité de 0 à 100 %,

— eau: voir point 1.6.1.2,

— lumière: photopériode de 12 à 16 heures par jour,

— température: convenant à l'espèce choisie (annexe 2), mais constante à ± 1 °C près, quel que soit le système d'essai,

— concentration en oxygène dissous: au moins 60 % de la concentration saturante en air à la température choisie,

— nourriture: aucune.

Les poissons sont examinés après les 2 à 4 premières heures et au moins à intervalles de 24 heures. Ils sont considérés comme morts si le fait de toucher le pédoncule caudal ne produit aucune réaction et si aucun mouvement respiratoire n'est visible. Les poissons morts sont éliminés à chaque observation et les mortalités enregistrées. Les anomalies visibles (par exemple, perte d'équilibre, perturbations au niveau de la nage, des fonctions respiratoires, de la pigmentation, etc.) seront consignées.

Les mesures du pH, de l'oxygène dissous et de la température doivent être effectuées quotidiennement.

Essai limite

Un essai limite peut être effectué à une concentration de 100 mg/l, en suivant les procédures décrites dans cette méthode d'essai, afin de montrer que la CL_{50} est supérieure à cette concentration.

Si la nature de la substance est telle qu'il est impossible d'obtenir une concentration de 100 mg/l dans l'eau d'essai, l'essai limite doit être effectué à une concentration égale à la solubilité de la substance (ou à la concentration maximale formant une dispersion stable) dans le milieu utilisé (voir également le point 1.6.1.1).

▼B

L'essai limite doit être effectué avec 7 à 10 poissons, et avec un nombre identique dans le(s) lot(s) témoin(s). (Selon la théorie binomiale, lorsque l'on utilise 10 poissons avec une mortalité nulle, il y a 99,9 % de chance que la CL_{50} soit supérieure à la concentration utilisée dans l'essai limite. Avec 7, 8 ou 9 poissons et une mortalité nulle, il y a 99 % de chance que la CL_{50} soit supérieure à la concentration utilisée.)

En cas de mortalité, il convient d'effectuer un essai complet. Si des effets sublétaux sont observés, ceux-ci doivent être consignés.

2. **ÉVALUATION DES DONNÉES**

Reporter, sur un papier log-probit, le pourcentage de mortalité pour chaque période d'exposition recommandée (24, 48, 72 et 96 heures) en fonction de la concentration.

Pour chaque temps d'observation, estimer, lorsque cela est possible, la CL_{50} et l'intervalle de confiance ($p = 0,05$) par les méthodes classiques; les valeurs obtenues doivent être arrondies à un ou deux (maximum) chiffres significatifs (exemples de nombres arrondis à deux chiffres: 170 pour 173,5; 0,13 pour 0,127; 1,2 pour 1,21).

Dans le cas où la pente de la courbe de pourcentage en fonction de la concentration est trop forte pour permettre de calculer la CL_{50}, il suffit de procéder à une estimation graphique de cette valeur.

Lorsque deux concentrations consécutives dans un rapport de 2,2 donnent 0 et 100 % de mortalité, ces deux valeurs suffisent à indiquer l'intervalle dans lequel se situe la CL_{50}.

Si l'on constate que la stabilité ou l'homogénéité de la substance d'essai ne peut pas être maintenue, cette observation doit être mentionnée et les résultats seront interprétés avec prudence.

3. **RÉSULTATS**

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants:

— des informations sur les poissons soumis à essai (nom scientifique, souche, fournisseur, tout prétraitement, taille et nombre utilisé pour chaque concentration d'essai),

— origine et principales caractéristiques de l'eau de dilution (pH, dureté, température),

— dans le cas de substances faiblement hydrosolubles, méthode de préparation de la solution mère et de la solution d'essai,

— concentration de tout produit auxiliaire,

— liste des concentrations utilisées et toute information disponible sur la stabilité de la substance d'essai dans la solution d'essai à ces concentrations,

— si on procède à des analyses chimiques, méthodes utilisées et résultats,

— éventuellement, résultats de l'essai limite,

— motifs du choix et description détaillée de la méthode utilisée (par exemple système statique, semi-statique, taux d'administration, taux de renouvellement, aération ou non, charge en poisson, etc.),

▼B

— description du matériel d'essai,

— régime d'éclairement,

— concentration en oxygène dissous, pH et température des solutions d'essai toutes les 24 heures,

— preuves que les critères de qualité ont été respectés,

— tableau contenant la mortalité cumulée pour chaque concentration et pour le témoin (et, au besoin, le témoin contenant la substance auxiliaire) à chaque temps d'observation recommandé,

— représentation graphique du pourcentage de mortalité en fonction de la concentration à la fin de l'essai,

— si possible, valeurs de la CL_{50} pour chacun des temps d'observation recommandés (avec l'intervalle de confiance à 95 %),

— méthodes statistiques employées pour déterminer les valeurs de la CL_{50},

— si une substance de référence est utilisée, les résultats obtenus,

— la concentration d'essai la plus élevée qui ne cause pas de mortalité pendant la durée de l'essai,

— la concentration d'essai la plus basse qui cause une mortalité de 100 % des poissons pendant la durée de l'essai.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) OCDE, Paris, 1981, ligne directrice nº 203, décision du Conseil C(81) 30 final et mises à jours.

(2) AFNOR — NFT 90-303, juin 1985 — Détermination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis du *Brachydanio rerio* — Méthode statique et dynamique.

(3) AFNOR — NFT 90-305, juin 1985 — Détermination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis du *Salmo gairdneri* — Méthode statique et dynamique.

(4) ISO 7346/1/2 and/3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae).* Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenôssisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungs-methoden — Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L(15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata,* 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxiciry of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. and Exp. Therap., 1949, vol 96, p. 99.

(16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K, 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, p. 793-821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, p. 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hasard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, 1977, p. 65-84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W.A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Annexe 1

Eau reconstituée

Exemple d'eau de dilution appropriée

Tous les produits chimiques doivent être de qualité analytique.

L'eau doit être une eau distillée de bonne qualité, ou de l'eau désionisée d'une conductivité inférieure à 5 μScm-1.

L'appareillage pour la distillation de l'eau ne doit contenir aucun élément en cuivre.

Solutions mères

$CaCl_2$. 2 H_2O (chlorure de calcium dihydraté):	11,76 g
dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre	
$MgSO_4$. 7 H_2O (sulfate de magnésium heptahydraté):	4,93 g
dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre	
$NaHCO_3$ (hydrogénocarbonate de sodium):	2,59 g
dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre	
KCI (chlorure de potassium):	0,23 g
dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre	

Eau de dilution reconstituée

Mélanger 25 ml de chacune des quatre solutions mères et compléter à 1 litre avec de l'eau.

Aérer jusqu'à saturation en oxygène dissous 1qy.

Le pH doit être de 7,8 ± 0,2.

Si nécessaire, ajuster le pH avec NaOH (hydroxyde de sodium) ou HC1 (acide chlorhydrique).

L'eau de dilution ainsi préparée est laissée au repos pendant environ 12 heures et ne doit pas être aérée ultérieurement.

La somme des ions Ca et Mg dans cette solution est égale à 2,5 mmol/l. Le rapport des ions Ca:Mg est de 4:1, celui des ions Na:K de 10:1. L'alcalinité totale de cette solution est égale à 0,8 mmol/l.

Les déviations éventuelles dans la préparation de l'eau de dilution ne doivent pas modifier la composition ou les propriétés de cette eau.

▼B

Annexe 2

Espèces de poissons recommandées pour l'essai

Espèces recommandées	Intervalles des températures d'essai recommandé (°C)	Longueur totale recommandée de l'animal soumis à l'essai (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Danio zébré	20 à 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Tête de boule	20 à 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae} (Linnaeus 1758) Carpe commune	20 à 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliiae) Cyprinodonti-dae (Tomminck et Schlegel 1850) Nedaka	20 à 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 à 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) Rafinesque Linnaeus 1758) Crapet arlequin	20 à 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Truite arc-en-ciel	12 à 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Ide mélanote	20 à 24	6,0 ± 2,0

Approvisionnement

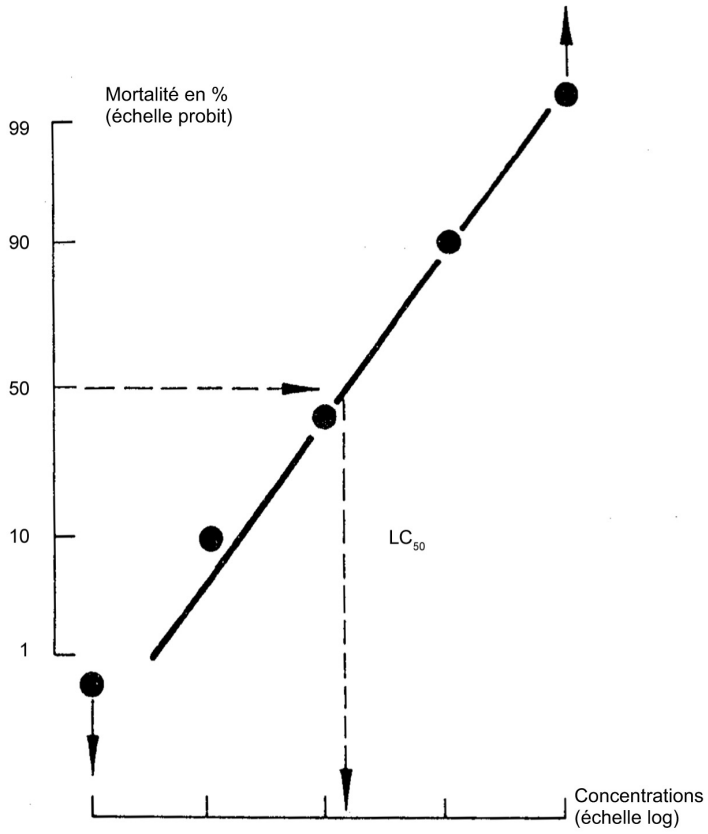
Les poissons mentionnés ci-dessus sont faciles à élever et/ou largement disponibles pendant toute l'année. Ils peuvent se reproduire et se développer soit dans des exploitations piscicoles, soit en laboratoire, dans des conditions sanitaires contrôlées. L'animal soumis à essai doit être sain et d'origine connue. Ces poissons sont disponibles partout dans le monde.

▼B

Annexe 3

Exemple de courbe de pourcentage de mortalité en fonction de la concentration

Exemple de détermination de la CL_{50} sur papier log-probit



▼B

C.2. *DAPHNIA* SP., ESSAI D'IMMOBILISATION IMMÉDIATE

1. MÉTHODE

Cette méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 202 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Cette méthode décrit un essai de toxicité aiguë visant à évaluer les effets des substances chimiques sur des daphnies. Les méthodes d'essai existantes ont été utilisées dans toute la mesure du possible (1) (2) (3).

1.2. DÉFINITIONS

Les définitions suivantes sont utilisées aux fins de la présente méthode:

CE_{50}: estimation de la concentration capable d'immobiliser 50 % des daphnies après une période d'exposition définie. Si une autre définition est utilisée, elle doit être indiquée avec sa référence.

Immobilisation: les animaux incapables de nager au bout de 15 secondes après agitation douce du récipient utilisé pour l'essai sont considérés comme immobiles (même s'ils sont toujours capables de bouger leurs antennes).

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

De jeunes daphnies, âgées de moins de 24 heures au début de l'essai, sont exposées à la substance d'essai à différentes concentrations pendant une période de 48 heures. L'immobilisation est enregistrée à 24 et à 48 heures, puis comparée à des valeurs de contrôle. Les résultats sont analysés pour calculer la CE_{50} à 48 heures (voir point 1.2 pour les définitions). La détermination de la CE_{50} à 24 heures est facultative.

1.4. INFORMATION CONCERNANT LA SUBSTANCE D'ESSAI

La solubilité dans l'eau et la pression de vapeur de la substance d'essai doivent être connues. De même, il faut disposer d'une méthode d'analyse fiable pour doser la substance dans les solutions d'essai dont le rendement de récupération et la limite de détermination sont connus. Les informations utiles comprennent la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité dans l'eau ou à la lumière, le P_{oe} et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir méthode C.4).

Remarque: Un document d'orientation (4) fournit des indications pour les substances qu'il est difficile de tester à cause de leurs propriétés physico-chimiques.

1.5. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Il est possible de déterminer la CE_{50} d'une substance de référence, de manière à s'assurer que les conditions d'essai sont fiables. Les toxiques utilisés dans les essais tournants internationaux (1) (5) sont recommandés à cet effet ([1]). Les essais avec une substance de référence doivent être effectués de préférence tous les mois et au moins deux fois par an.

([1]) Les résultats de ces essais interlaboratoires, ainsi qu'un corrigendum technique à l'ISO 6341, donnent une CE_{50} 24 h du dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) comprise entre 0,6 mg/l et 1,7 mg/l.

▼B

1.6. CRITÈRES DE QUALITÉ

Pour qu'un essai soit valide, les critères de performance suivants s'appliquent:

— pas plus de 10 % des daphnies ne doivent être immobilisées dans le groupe témoin, y compris le témoin contenant l'agent solubilisant,

— la concentration d'oxygène dissous à la fin de l'essai doit être ≥ 3 mg/l dans les récipients d'essai et les récipients témoins.

Remarque: Pour le premier critère, pas plus de 10 % des daphnies du témoin ne doivent être immobilisées ou montrer d'autres signes de défaillance ou de stress, tels qu'une décoloration ou un comportement inhabituel (piégées à la surface de l'eau, par exemple).

1.7. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.7.1. **Appareillage**

Les récipients et autres équipements qui sont amenés à entrer en contact avec les solutions d'essai doivent être intégralement en verre, ou en un autre matériau chimiquement inerte. Les récipients d'essai sont le plus souvent des éprouvettes ou des béchers en verre. Avant chaque usage, ils doivent être nettoyés selon les procédures de laboratoire standard. Afin de réduire la déperdition d'eau par évaporation et de prévenir l'entrée de poussière dans les solutions, les récipients d'essai doivent être couverts. Les essais sur les substances volatiles doivent être réalisés dans des récipients complètement remplis et fermés, suffisamment grands pour éviter que la concentration d'oxygène ne soit trop faible ou ne devienne un facteur limitant (voir point 1.6 et premier paragraphe du point 1.8.3).

Par ailleurs, tout ou partie des équipements suivants est nécessaire: un appareil pour mesurer la concentration de l'oxygène (à l'aide d'une microélectrode ou d'un autre dispositif destiné à mesurer l'oxygène dissous dans des échantillons de faible volume); un pH-mètre; un thermostat adéquat; un appareil pour déterminer la concentration de carbone organique totale (COT); un appareil pour déterminer la demande chimique en oxygène (DCO); un appareil pour déterminer la dureté de l'eau, etc.

1.7.2. **Organisme d'essai**

L'espèce à utiliser de préférence dans cet essai est *Daphnia magna* Straus, mais d'autres espèces de *Daphnia* peuvent aussi être utilisées *(Daphnia pulex,* par exemple). Au début de l'essai, les animaux doivent être âgés de 24 heures au maximum, et, pour réduire la variabilité, il est fortement recommandé qu'ils ne proviennent pas d'une première génération de descendants. Ils doivent être issus d'un lot sain (c'est-à-dire qui ne présente pas de signes de stress, tels qu'une mortalité élevée, la présence de mâles et d'éphippies, un retard dans la production des premiers descendants, des animaux décolorés, etc.). Tous les organismes utilisés dans un essai donné doivent provenir de cultures établies à partir d'un même lot de daphnies. Le lot d'animaux doit être maintenu dans des conditions de culture (lumière, température, milieu) semblables à celles qui seront appliquées au cours de l'essai. Si le milieu utilisé dans l'essai est différent de celui où sont normalement élevées les daphnies, il convient de leur laisser une période d'acclimatation avant l'essai. En l'occurrence, il convient de les maintenir dans de l'eau de dilution à la température de l'essai pendant au moins 48 heures avant le début de l'essai.

▼B

1.7.3. **Eau d'acclimatation et de dilution**

On peut utiliser, comme eau d'acclimatation et de dilution, de l'eau naturelle (eau de surface ou eau souterraine), de l'eau reconstituée ou de l'eau du robinet déchlorée, du moment que les daphnies y survivent sans montrer de signes de stress pendant toute la durée de l'élevage, de l'acclimatation et de l'essai. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable données dans la liste de l'annexe 1 convient pour cet essai. Sa qualité doit rester constante tout au long de l'essai. Les eaux reconstituées peuvent être composées d'eau distillée ou désionisée auxquelles on ajoute certaines quantités spécifiques de réactifs de qualité pour analyse. Des exemples d'eau reconstituée sont donnés dans les documents (1) (6) et dans l'annexe 2. Il convient de noter que les milieux contenant des agents chélatants connus, tels que les milieux M4 et M7 présentés dans l'annexe 2, doivent être évités pour les essais de substances contenant des métaux. Le pH doit être compris entre 6 et 9. Une dureté comprise entre 140 et 250 mg/l (en $CaCO_3$) est recommandée pour les *Daphnia magna,* mais des duretés inférieures conviennent également pour d'autres espèces de *Daphnia.* L'eau de dilution peut être aérée avant utilisation dans l'essai, de façon que la concentration de l'oxygène dissous atteigne la saturation.

Lorsque de l'eau naturelle est utilisée, les paramètres de sa qualité doivent être mesurés au moins deux fois par an, ou chaque fois que ses caractéristiques sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées (voir point précédent et annexe 1). Les métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple) doivent être mesurés. Si de l'eau du robinet déchlorée est utilisée, il est souhaitable de procéder chaque jour à une analyse de sa teneur en chlore. Si l'eau de dilution provient d'une eau souterraine ou d'une eau de surface, sa conductivité et son carbone organique total (COT) ou sa demande chimique en oxygène (DCO) doivent être mesurés.

1.7.4. **Solutions d'essai**

Les solutions d'essai sont généralement amenées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. De préférence, les solutions mères doivent être préparées par dissolution de la substance d'essai dans l'eau de dilution. Le recours à des solvants, émulsifiants ou dispersants doit être évité dans toute la mesure du possible. Néanmoins, ces additifs sont parfois nécessaires pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Le document guide (4) donne des informations sur le choix des solvants, émulsifiants et dispersants appropriés. En tout cas, la substance d'essai dans la solution d'essai ne doit pas excéder sa limite de solubilité dans l'eau de dilution.

L'essai doit être mené sans ajustement du pH. Si le pH ne reste pas dans la plage comprise entre 6 et 9, alors il convient de procéder à un deuxième essai, en ajustant le pH de la solution mère à celui de l'eau de dilution avant d'ajouter la substance d'essai. Lors de l'ajustement du pH, il faut que la concentration de la solution mère ne soit quasiment pas modifiée, ni qu'aucune réaction chimique, ni précipitation de la substance d'essai ne soit provoquée. De préférence, il convient d'employer du HCl et du NaOH.

▼B

1.8. PROCÉDURE

1.8.1. **Conditions d'exposition**

1.8.1.1. *Témoins et groupes d'essai*

On remplit les récipients d'essai avec les volumes voulus d'eau de dilution et de solutions de la substance d'essai. Le rapport air/volume d'eau à l'intérieur des récipients doit être identique pour les groupes témoins et les groupes d'essai. On place ensuite les daphnies dans les récipients. Il faut utiliser, pour chaque concentration d'essai et pour les témoins, au moins 20 animaux, répartis de préférence en quatre groupes de cinq animaux. Un volume d'au moins 2 ml de solution d'essai doit être prévu pour chaque animal (soit un volume de 10 ml pour cinq daphnies par récipient). Si la concentration de la substance d'essai n'est pas stable, un système de renouvellement semi-statique ou continu peut être utilisé pour l'essai.

Parallèlement aux séries traitées, il faut tester une série de témoins de l'eau de dilution et, le cas échéant, une série de témoins contenant l'agent solubilisant (solvant) en quantité utilisée dans les séries traitées.

1.8.1.2. *Concentrations d'essai*

À moins qu'une information ne soit déjà disponible sur la toxicité de la substance d'essai, un essai peut le cas échéant être mené pour déterminer la plage des concentrations de l'essai définitif. À cette fin, les daphnies sont exposées à une série de concentrations de la substance d'essai largement espacées. Cinq daphnies sont exposées à chaque concentration pendant 48 heures ou moins. Aucun essai identique n'est nécessaire. La période d'exposition peut être raccourcie (24 heures ou moins, par exemple) s'il est possible d'obtenir plus rapidement les données voulues.

Il faut utiliser au moins cinq concentrations formant une série géométrique de concentrations successives séparées, de préférence, par un facteur inférieur ou égal à 2,2. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. De préférence, la concentration la plus élevée doit provoquer 100 % d'immobilisation, et la moins élevée ne doit donner lieu à aucun effet observable.

1.8.1.3. *Conditions d'incubation*

La température doit être comprise entre 18 et 22 °C, et, pour chaque essai, elle doit être constante à ± 1 °C. Une alternance de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité est recommandée. Une obscurité complète est également acceptable, en particulier pour les substances d'essai instables à la lumière.

Les récipients d'essai ne doivent pas être aérés durant l'essai. L'essai est mené sans ajustement du pH. Les daphnies ne doivent pas être nourries pendant l'essai.

1.8.1.4. *Durée*

La durée de l'essai est de 48 heures.

1.8.2. **Observations**

À échéances de 24 et 48 heures après le début de l'essai, la présence de daphnies immobiles doit être contrôlée dans chaque récipient d'essai (voir définitions au point 1.2). Outre l'immobilité, tout comportement ou signe anormal doit être signalé.

▼B

1.8.3. **Mesures analytiques**

L'oxygène dissous et le pH sont mesurés au début et à la fin de l'essai dans les récipients témoins et dans ceux contenant la concentration de la substance d'essai la plus élevée. La concentration de l'oxygène dissous dans les témoins doit être conforme au critère de validité (voir le point 1.6). Normalement, le pH ne doit pas varier de plus de 1,5 unité au cours d'un essai. En règle générale, on mesure la température dans les récipients témoins ou la température ambiante, et de préférence il y a lieu de l'enregistrer en continu au cours de l'essai ou, au minimum, au début et à la fin de l'essai.

La concentration de la substance d'essai doit être mesurée, au minimum, dans les récipients contenant la concentration la plus élevée et la concentration la plus basse, au début et à la fin de l'essai (4). Il est recommandé de fonder les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si l'on peut démontrer de façon suffisamment convaincante que la concentration de la substance d'essai a été maintenue tout au long de l'essai de manière satisfaisante dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale ou de la concentration initiale mesurée, alors les résultats peuvent être fondés sur les valeurs nominales ou les valeurs initiales mesurées.

1.9. ESSAI LIMITE

Sur la base du mode opératoire décrit dans la présente méthode, un essai limite peut être conduit à 100 mg/l de substance d'essai ou jusqu'à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (selon la valeur la plus basse), de façon à démonter que la CE_{50} est supérieure à cette concentration. L'essai limite doit être mené sur 20 daphnies (de préférence réparties en quatre groupes de cinq), avec un nombre équivalent d'animaux dans les récipients témoins. Si des daphnies sont immobilisées, il y a lieu de mener une étude complète. Tout comportement anormal observé doit être enregistré.

2. **RÉSULTATS**

Les résultats doivent être synthétisés dans des tableaux mettant en évidence, pour chaque groupe d'essai et chaque témoin, le nombre de daphnies utilisées et l'immobilisation à chaque observation. En outre, une représentation graphique doit montrer les pourcentages immobilisés à 24 et 48 heures par concentration d'essai. Les résultats sont analysés au moyen des méthodes statistiques appropriées (analyse probit, par exemple) permettant de calculer les pentes des courbes et la CE_{50} avec des limites de confiance de 95 % (p = 0,05) (7) (8).

Lorsque les données obtenues ne se prêtent pas au calcul de la CE_{50} par les méthodes standard, on doit utiliser la concentration la plus élevée qui ne donne aucune immobilisation et la concentration la plus faible qui donne 100 % d'immobilisation pour en déduire une valeur approximative de la CE_{50} (en prenant la moyenne géométrique de ces deux concentrations).

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes,

▼B

— données permettant l'identification chimique, y compris la pureté.

Espèce d'essai:

— source et espèce de *Daphnia,* fournisseur (s'il est connu) et conditions de culture appliquées (notamment source, type et quantités de nourriture, fréquence de l'alimentation).

Conditions d'essai:

— description des récipients d'essai: type et volume des récipients, volume de la solution, nombre de daphnies par récipient, nombre de récipients d'essai (essais identiques) par concentration,

— méthodes de préparation des solutions mères et d'essai, et notamment utilisation éventuelle de tout solvant ou agent dispersant, et concentrations utilisées,

— détails concernant l'eau de dilution: source et caractéristiques (pH, dureté, rapport Ca/Mg, rapport Na/K, alcalinité, conductivité, etc.); le cas échéant, composition de l'eau reconstituée,

— conditions d'incubation: température, intensité et périodicité de la lumière, oxygène dissous, pH, etc.

Résultats:

— nombre et pourcentage de daphnies immobilisées ou ayant manifesté un effet adverse quelconque (y compris un comportement anormal) parmi les témoins et les groupes traités à chaque période d'observation, et une description de la nature des effets constatés,

— résultats et date de l'essai effectué avec une substance de référence, le cas échéant,

— concentrations d'essai nominales et résultat de toutes les analyses visant à déterminer la concentration de la substance d'essai dans les récipients d'essai; l'efficacité de la méthode de récupération et la limite de détermination doivent également être précisées,

— toutes les mesures physico-chimiques (température, pH et oxygène dissous) effectuées au cours de l'essai,

— CE_{50} à 48 heures (immobilisation) avec les intervalles de confiance et les graphiques du modèle utilisé pour le calcul, les pentes des courbes dose-effet et leur erreur standard; procédures statistiques utilisées pour déterminer la CE_{50} (ces informations doivent aussi être précisées pour l'immobilisation à 24 heures lorsque les mesures ont été effectuées),

— explication de tout écart par rapport à la méthode d'essai, et conséquences éventuelles sur les résultats de l'essai.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(21) ISO 6341 (1996). Qualité de l'eau — Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Essai de toxicité aiguë. Troisième édition, 1996.

(22) EPA OPPTS 850.1010 (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

(23) Environnement Canada (1996). Méthode d'essai biologique. Essai de létalité aiguë sur *Daphnia* spp. EPS 1/RM/1 1. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

(24) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No 23. Paris 2000.

(25) Commission des Communautés européennes. Étude D8369 (1979). Programme d'essais interlaboratoires concernant l'étude de l'écotoxicité d'une substance chimique vis-à-vis de la *Daphnia.*

(26) OCDE, ligne directrice pour les essais de produits chimiques. Ligne directrice 211: *Daphnia magna,* essai de reproduction, adoptée en septembre 1998.

(27) Stephan, C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials, p. 65-84.

(28) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

Annexe 1

QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

Substance	Concentration
Particules	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Total des pesticides organophosphorés	< 50 ng/l
Total des pesticides organochlorés plus biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

▼B

Annexe 2

EXEMPLES D'EAU D'ESSAI RECONSTITUÉE ACCEPTABLE

Eau d'essai ISO (1)

Solutions mères (substance unique)		Pour préparer l'eau reconstituée, ajouter les volumes suivants de solutions mères à 1 litre d'eau (*)
Substance	Quantité ajoutée à 1 litre d'eau (*)	
Chlorure de calcium $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Sulfate de magnésium $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Bicarbonate de sodium $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Chlorure de potassium KCl	0,23 g	25 ml

(*) Eau de pureté adéquate, par exemple, eau désionisée, distillée ou obtenue par osmose inverse, de conductivité de préférence inférieure à 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Milieux Elendt M7 et M4

Acclimatation aux milieux Elendt M4 et M7

Certains laboratoires ont rencontré des difficultés pour transférer directement les *Daphnia* dans les milieux M4 et M7. Ils sont toutefois parvenus à un certain résultat en les acclimatant progressivement, c'est-à-dire en les transférant de leur milieu vers un milieu à 30 % d'Elendt, puis à 60 % d'Elendt et enfin à 100 % d'Elendt. Les périodes d'acclimatation peuvent prendre jusqu'à un mois.

Préparation

Éléments en traces

Différentes solutions mères (I), contenant chacune une seule substance en traces, sont tout d'abord préparées avec une eau d'une pureté adéquate, par exemple de l'eau désionisée, distillée ou obtenue par osmose inverse. À partir de ces différentes solutions mères (I), on prépare une deuxième solution mère unique (II) renfermant toutes les substances en traces (solution combinée), à savoir:

Solution(s) mère(s) I (substance unique)	Quantité ajoutée à l'eau (mg/l)	Concentration (par rapport au milieu M4)	Pour préparer la solution mère combinée II, ajouter la quantité suivante de solution mère I à l'eau (ml/l)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000 fois	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000 fois	1,0	0,25
LiC1	6 120	20 000 fois	1,0	0,25

▼B

Solution(s) mère(s) I (substance unique)	Quantité ajoutée à l'eau (mg/l)	Concentration (par rapport au milieu M4)	Pour préparer la solution mère combinée II, ajouter la quantité suivante de solution mère I à l'eau (ml/l)	
			M4	M7
RbC1	1 420	20 000 fois	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000 fois	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 fois	1,0	0,25
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000 fois	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000 fois	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 fois	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000 fois	1,0	1,0
KI	65	20 000 fois	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20 000 fois	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000 fois	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000 fois	–	–
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000 fois	–	–

Les solutions de Na_2EDTA et de $FeSO_4$ sont préparées séparément, puis mélangées et immédiatement autoclavées.

Cela donne:

2 1 solution Fe-EDT		1 000 fois	20,0	5,0

Milieux M4 et M7

Les milieux M4 et M7 sont préparés à partir de la solution mère II, de macronutriments et de vitamines, de la façon suivante:

	Quantité ajoutée à l'eau (mg/l)	Concentration (par rapport au milieu M4)	Quantité de solution mère II ajoutée pour préparer le milieu (ml/l)	
			M4	M7
Solution mère II (combinaison de substances en traces)		20 fois	50	50
Solutions mères contenant les macronutriments (une substance par solution)				
$CaCl_2.2H_20$	293 800	1 000 fois	1,0	1,0
$MgSO_4.7H_2O$	246 600	2 000 fois	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 fois	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 fois	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3.9H_2O$	50 000	5 000 fois	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 fois	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000 fois	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 fois	0,1	0,1

▼B

	Quantité ajoutée à l'eau (mg/l)	Concentration (par rapport au milieu M4)	Quantité de solution mère II ajoutée pour préparer le milieu (ml/l)	
			M4	M7
Solution mère de vitamines combinées	–	10 000 fois	0,1	0,1

La solution mère de vitamines combinées est préparée en additionnant 3 vitamines à 1 litre d'eau, comme indiqué ci-dessous:

Chlorhydrate de thiamine	750	10 000 fois		
Cyanocobalamine (B12)	10	10 000 fois		
Biotine	7,5	10 000 fois		

La solution mère de vitamines combinées est congelée par petites parties aliquotes. Les vitamines sont ajoutées au milieu peu avant son utilisation.

NB: Afin d'éviter que les sels ne se précipitent lorsqu'on prépare le milieu complet, il faut ajouter les parties aliquotes de solution mère à quelque 500 à 800 ml d'eau désionisée et amener le volume à 1 litre.

NB: La première publication relative au milieu M4 se trouve dans Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, p. 25-33.

▼M1

C.3. ALGUES D'EAU DOUCE ET CYANOBACTÉRIES, ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE

1. MÉTHODE

La présente méthode est équivalente à la ligne directrice TG 201 (2006) (1) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Les méthodes d'essai sont régulièrement revues et mises à jour en fonction des progrès scientifiques. En ce qui concerne la méthode d'essai C.3, il s'est avéré nécessaire d'ajouter des espèces et de la remanier conformément aux exigences nouvelles en matière d'évaluation des dangers et de classification des substances chimiques. Cette révision s'est appuyée sur la somme des informations recueillies, depuis l'adoption initiale, qui résultent d'une solide expérience concrète, des avancées scientifiques dans le domaine des études de toxicité sur les algues et d'une longue pratique réglementaire.

1.2. DÉFINITIONS

Les définitions et abréviations suivantes sont utilisées aux fins de cette méthode d'essai.

Biomasse: poids sec de la matière vivante présente dans une population, exprimé en fonction d'un volume donné, par exemple en mg d'algues/litre de solution d'essai. D'habitude la biomasse est définie comme une masse, mais dans cet essai, le terme «biomasse» fait référence à une masse par unité de volume. Remarquons également que, dans cet essai, la biomasse est en général mesurée indirectement, par la numération des cellules, la fluorescence, etc., si bien que le terme «biomasse» recouvre également ces mesures de substitution.

Coefficient de variation: mesure sans dimension de la variabilité d'un paramètre, définie par le rapport de l'écart-type à la moyenne. Il s'exprime également en pourcentage. Le coefficient moyen de variation du taux de croissance spécifique moyen des expériences identiques du groupe témoin se calcule comme suit:

1. calculer le coefficient de variation (en %) du taux de croissance spécifique moyen en fonction des taux de croissance quotidiens (section par section) pour chaque expérience identique;

2. calculer la valeur moyenne de toutes les valeurs calculées au point 1, afin d'obtenir le coefficient moyen de variation du taux de croissance spécifique quotidien (section par section) des cultures témoins identiques.

CE_x: concentration de la substance d'essai dissoute dans le milieu d'essai entraînant une réduction de x % (par exemple 50 %) de la croissance des organismes d'essai durant une période d'exposition définie (à mentionner explicitement si elle s'écarte de la durée normale ou totale de l'essai). Afin de distinguer les valeurs de la CE mesurées en fonction du taux de croissance de celles mesurées en fonction du rendement, on utilise les abréviations CE_t, s'agissant du taux de croissance, et CE_r, lorsqu'il s'agit du rendement.

Milieu de croissance: milieu de culture synthétique complet dans lequel les algues se développent lorsqu'elles sont exposées à la substance d'essai, celle-ci étant généralement dissoute dans le milieu d'essai.

Taux de croissance (taux de croissance spécifique moyen): accroissement logarithmique de la biomasse durant la période d'exposition.

▼M1

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration d'essai la plus faible à laquelle on observe que la substance exerce un effet statistiquement significatif de réduction de la croissance (à $p < 0,05$) par comparaison avec le témoin, durant une période d'exposition donnée. Néanmoins, toutes les concentrations supérieures à la CMEO doivent avoir un effet néfaste supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Lorsque ces deux conditions ne peuvent pas être remplies, il faut expliquer en détail la façon dont la CMEO (et donc la CSEO) a été choisie.

Concentration sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

Variable étudiée: variable permettant d'estimer la toxicité à partir de n'importe quelle variable mesurée décrivant la biomasse, selon différentes méthodes de calcul. Dans cette méthode d'essai, les taux de croissance et le rendement représentent les variables étudiées déduites de la mesure directe de la biomasse ou de sa mesure indirecte d'après l'un des paramètres de substitution mentionnés précédemment.

Taux de croissance spécifique: variable étudiée correspondant au quotient de la différence des logarithmes népériens d'un paramètre observé (la biomasse, dans cette méthode d'essai) par la période de temps respective.

Rendement: différence entre la valeur d'une variable mesurée à la fin de la période d'exposition et la valeur de cette variable mesurée au début de la période d'exposition, utilisée pour exprimer l'accroissement de biomasse durant l'essai.

1.3. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

Cette méthode d'essai se prête mieux aux substances hydrosolubles qui, dans les conditions de l'essai, sont susceptibles de rester dans l'eau. Les substances volatiles, s'adsorbant fortement, colorées ou peu solubles dans l'eau ou les substances susceptibles d'influer sur la disponibilité des nutriments ou des minéraux dans le milieu d'essai appellent éventuellement certaines modifications du procédé décrit (par exemple, un système fermé, le conditionnement des récipients d'essai). Certaines modifications appropriées sont abordées dans les références (2), (3) et (4).

1.4. PRINCIPE DE L'ESSAI

Cet essai vise à déterminer les effets d'une substance sur la croissance d'algues microscopiques dulcicoles et/ou de cyanobactéries. Des organismes d'essai en phase de croissance exponentielle sont exposés à la substance d'essai dans des cultures en lots sur une période durant normalement 72 heures. La relative brièveté de l'essai permet néanmoins d'évaluer les effets sur plusieurs générations.

L'effet observé est la réduction de la croissance dans une série de cultures d'algues (unités expérimentales) exposées à différentes concentrations de la substance d'essai. L'effet est évalué en fonction de la concentration d'exposition, en comparaison avec la croissance moyenne d'une série de cultures témoins identiques et non traitées. Afin que les effets toxiques puissent pleinement s'exprimer (sensibilité optimale des cultures), les cultures d'algues sont placées dans des conditions propres à une croissance exponentielle non limitée: éléments nutritifs en suffisance et lumière continue, et ce, sur une période assez longue pour que la réduction du taux de croissance spécifique puisse être mesurée.

▼M1

La croissance et l'inhibition de la croissance sont quantifiées d'après des mesure de la biomasse algale en fonction du temps. La biomasse des algues est définie en poids sec par volume, par exemple des milligrammes d'algues par litre de solution expérimentale. Le poids sec étant difficile à mesurer, on recourt à d'autres paramètres tels que la numération cellulaire, qui est le plus souvent utilisée, ou encore le volume, la fluorescence et la densité optique cellulaires, etc. Le facteur de conversion du paramètre de substitution mesuré en biomasse doit être connu.

L'effet étudié est l'inhibition de la croissance, exprimée par l'accroissement logarithmique de la biomasse (taux de croissance spécifique moyen) durant la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage x donné d'inhibition du taux de croissance (par exemple 50, %) est déterminée en fonction des taux de croissance spécifiques moyens relevés dans une série de solutions expérimentales, et exprimée sous la forme C_xE_t (par exemple, $C_{50}E_t$).

Pour l'application de cette méthode dans le cadre réglementaire de l'UE, le calcul des résultats doit être fondé sur un taux de croissance spécifique moyen, pour les raisons décrites au point 2.2 ci-dessous. La présente méthode d'essai comporte une variable étudiée supplémentaire, le rendement, requise par la réglementation de certains pays. Il est défini comme étant la différence entre la valeur de la biomasse à la fin de la période d'exposition et cette valeur au début de la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage x donné d'inhibition du rendement (par exemple, 50 %) est calculée à partir du rendement enregistré dans une série de solutions expérimentales, et exprimée sous la forme C_xE_r (par exemple, $C_{50}E_r$).

En outre, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la concentration sans effet observé (CSEO) peuvent être déterminées par un calcul statistique.

1.5. INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Les informations sur la substance d'essai pouvant être utiles à l'établissement des conditions expérimentales comprennent la formule structurale, la pureté, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pouvoir d'absorption lumineuse, le pKa et les résultats d'études de transformation, notamment la biodégradabilité dans l'eau.

Il faut connaître l'hydrosolubilité, le coefficient de partage octanol-eau (P_{oe}) et la pression de vapeur de la substance d'essai, et disposer d'une méthode validée pour quantifier la substance dans les solutions expérimentales, méthode dont le rendement de récupération et le seuil de détection seront mentionnés dans le rapport.

1.6. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Le procédé expérimental peut être vérifié au moyen de substance(s) de référence telle(s) que le 3,5-dichlorphénol, utilisé dans l'essai tournant international (4). Le dichromate de potassium peut également servir de substance de référence pour les algues vertes. Il est recommandé de mettre une substance de référence à l'essai au moins deux fois par an.

1.7. VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai repose sur les critères de performance suivants:

▼**M1**

— l'accroissement exponentiel de la biomasse des cultures témoins doit être d'un facteur au moins égal à 16 en l'espace de 72 heures (durée de l'essai), ce qui correspond à un taux de croissance spécifique de 0,92/jour^{-1}. Le taux de croissance des espèces les plus fréquemment utilisées est généralement nettement supérieur (voir appendice 1). Ce critère ne sera pas forcément rempli avec les espèces à croissance plus lente que celles énumérées à l'appendice 1. Dans ce cas, il convient d'allonger la durée de l'essai, afin d'obtenir un facteur de multiplication de la croissance au moins égal à 16 dans les cultures témoins, la croissance devant être exponentielle tout au long de l'essai. La durée de l'essai peut être ramenée à au moins 48 heures pour maintenir une croissance exponentielle non limitée durant l'essai, pourvu que le facteur de multiplication minimal, à savoir 16, soit atteint,

— le coefficient de variation moyen des taux de croissance spécifiques section par section (jours 0-1, 1-2 et 2-3, pour les essais de 72 heures) dans les cultures témoins (voir «coefficient de variation» au paragraphe 1.2) ne peut pas excéder 35 %. Voir le calcul du taux de croissance spécifique section par section au paragraphe 2.2.1, deuxième alinéa. Ce critère s'applique à la valeur moyenne des coefficients de variation calculés pour les expériences identiques du groupe témoin,

— le coefficient de variation des taux de croissance spécifiques moyens sur toute la durée de l'essai dans les cultures témoins identiques ne peut pas dépasser 7 % pour les essais menés sur *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Desmodesmus subspicatus*. S'agissant des autres espèces moins souvent testées, cette valeur ne doit pas dépasser 10 %.

1.8. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.8.1. **Appareillage**

Les récipients expérimentaux et les autres appareils entrant en contact avec les solutions d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte. Il convient de les nettoyer à fond afin qu'aucun contaminant organique ou minéral n'interfère avec la croissance des algues ou la composition des solutions expérimentales.

Généralement en verre, les récipients d'essai possèdent des dimensions autorisant un volume de culture suffisant pour les mesures à effectuer durant l'essai et un transfert massique suffisant de CO_2 depuis l'atmosphère (voir paragraphe 1.8.9, deuxième alinéa). Notons que le volume de liquide doit être assez grand pour les déterminations analytiques (voir paragraphe 1.8.11, cinquième alinéa).

Une partie ou la totalité du matériel suivant est également nécessaire:

— appareillage destiné aux cultures: il est recommandé d'utiliser une armoire ou une enceinte dans laquelle la température d'incubation choisie peut être maintenue à ± 2 °C près,

— instruments de mesure de la lumière: il est important de savoir que la méthode de mesure de l'intensité lumineuse, et en particulier le type de capteur (collecteur), aura une influence sur la valeur mesurée. Il est préférable d'effectuer les mesures à l'aide d'un capteur sphérique 4 π (sensible à la lumière directe et réfléchie provenant de tous les angles situés au-dessus et en dessous du plan de mesure) ou d'un capteur 2 π (sensible à la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus du plan de mesure),

▼M1

— dispositif permettant de déterminer la biomasse des algues: la numération cellulaire, qui est le paramètre de substitution le plus fréquemment utilisé pour déterminer la biomasse des algues, peut être effectuée avec un compteur électronique de particules, un microscope équipé d'une enceinte de comptage ou un cytomètre à flux. D'autres paramètres de substitution de la biomasse peuvent être mesurés au moyen d'un cytomètre à flux, d'un fluorimètre, d'un spectrophotomètre ou d'un colorimètre. Il est utile de calculer le facteur de conversion du nombre de cellules en poids sec de biomasse. Afin d'obtenir des mesures utiles pour les faibles concentrations de biomasse quand on utilise un spectrophotomètre, il peut s'avérer nécessaire d'employer des cuves d'une longueur d'au moins 4 cm.

1.8.2. **Organismes d'essai**

Plusieurs espèces d'algues microscopiques et de cyanobactéries ne formant pas d'agrégats peuvent être utilisées. Il a été démontré que les souches énumérées à l'appendice 1 convenaient au protocole expérimental de cette méthode d'essai.

Si l'on utilise d'autres espèces, il faut mentionner leur souche et/ou leur origine. Il y a lieu de confirmer que la croissance exponentielle des algues d'essai sélectionnées peut être maintenue tout au long de l'essai dans les conditions appliquées.

1.8.3. **Milieu de croissance**

Deux milieux de croissance possibles sont préconisés: celui de l'OCDE et le milieu AAP. Les compositions de ces milieux sont détaillées à l'appendice 2. Il faut noter que la valeur initiale du pH et le pouvoir tampon (régulation de l'augmentation du pH) de ces deux milieux sont différents. En conséquence, les résultats des essais risquent d'être différents suivant le milieu employé, notamment avec des substances d'essai ionisantes.

Il peut parfois s'avérer nécessaire de modifier le milieu de croissance, par exemple si la substance d'essai est un métal ou un agent chélatant ou si l'essai est mené à différents pH. L'utilisation d'un milieu modifié doit être décrite en détail et justifiée (3)(4).

1.8.4. **Concentration initiale de la biomasse**

La biomasse initiale doit être identique dans toutes les cultures de l'essai et suffisamment basse pour autoriser une croissance exponentielle tout au long de la période d'incubation sans risque d'épuisement des éléments nutritifs. La biomasse initiale ne dépassera pas 0,5 mg/l en poids sec. On recommande les concentrations cellulaires initiales suivantes:

Pseudokirchneriella subcapitata	5×10^3-10^4	cellules/ml
Desmodesmus subspicatus	2-5 $\times 10^3$	cellules/ml
Navicula pelliculosa	10^4	cellules/ml
Anabaena flos-aquae	10^4	cellules/ml
Synechococcus leopoliensis	5×10^4-10^5	cellules/ml

1.8.5. **Concentrations de la substance d'essai**

La gamme de concentrations dans laquelle des effets sont susceptibles de se produire peut être déterminée d'après les résultats d'essais de détermination de l'ordre de grandeur. L'essai proprement dit comprend au moins cinq concentrations formant une série géométrique et séparées par un facteur n'excédant pas 3,2. Un facteur supérieur peut se justifier pour les substances d'essai dont la courbe concentration-effet a une pente nulle. Il est préférable que la gamme de concentrations couvre des valeurs entraînant une inhibition de 5 à 75 % du taux de croissance des algues.

▼M1

1.8.6. **Expériences identiques et témoins**

L'essai comprend trois expériences identiques à chaque concentration expérimentale. S'il n'est pas nécessaire de déterminer la CSEO, l'essai peut être modifié de manière à inclure un plus grand nombre de concentrations et un plus petit nombre d'expériences identiques par concentration. Le nombre d'expériences identiques pour le témoin doit être au moins trois et, idéalement, le double du nombre d'expériences identiques utilisées à chaque concentration expérimentale.

Un ensemble séparé de solutions d'essai peut être préparé pour les déterminations analytiques des concentrations de la substance d'essai (voir paragraphe 1.8.11, quatrième et sixième alinéas).

Si la substance d'essai est solubilisée à l'aide d'un solvant, on inclura des témoins supplémentaires contenant le solvant à la même concentration que celle appliquée dans les cultures expérimentales.

1.8.7. **Préparation de la culture de l'inoculum**

Afin que les algues soumises à l'essai soient adaptées aux conditions expérimentales et soient bien en phase de croissance exponentielle lorsqu'on les utilise pour ensemencer les solutions d'essai, on prépare une culture d'inoculum dans le milieu expérimental, deux à quatre jours avant le début de l'essai. La biomasse des algues doit être ajustée afin que la culture de l'inoculum présente une croissance exponentielle jusqu'au moment où l'essai débute. La culture de l'inoculum est incubée dans les mêmes conditions que les cultures expérimentales. On mesure l'accroissement de la biomasse dans la culture de l'inoculum pour vérifier qu'elle présente une croissance normale pour la souche expérimentale en question dans les conditions de culture. Un exemple de méthode de culture des algues est décrit à l'appendice 3. Pour éviter des divisions cellulaires synchrones durant l'essai, il est parfois nécessaire de lancer une seconde étape de propagation de la culture de l'inoculum.

1.8.8. **Préparation des solutions expérimentales**

Toutes les solutions expérimentales doivent contenir les mêmes concentrations de milieu de croissance et la même biomasse initiale d'algues d'essai. On prépare généralement les solutions expérimentales aux concentrations choisies en mélangeant une solution mère de la substance d'essai avec le milieu de croissance et la culture de l'inoculum. Les solutions mères sont normalement préparées par dissolution de la substance dans le milieu d'essai.

Des solvants, par exemple de l'acétone, de l'alcool t-butylique et du diméthylformamide, peuvent être utilisés comme véhicules pour ajouter des substances peu solubles dans l'eau au milieu expérimental (2)(3). La concentration de solvant ne doit pas excéder 100 µl/l et doit être identique dans toutes les cultures (y compris les témoins) de l'essai.

1.8.9. **Incubation**

Les récipients expérimentaux sont munis de bouchons perméables à l'air. Les récipients sont agités et placés dans l'appareil destiné aux cultures. Durant l'essai, il est nécessaire de garder les algues en suspension et de faciliter le transfert de CO_2. À cette fin, les récipients sont agités ou leur contenu remué en permanence. Les cultures doivent être maintenues à une température comprise entre 21 et 24 °C, maintenue à ± 2 °C près. Des températures plus élevées peuvent être appliquées pour des espèces autres que celles reprises à l'appendice 1, par exemple des espèces tropicales, à condition que les critères de validité soient respectés. Il est recommandé de disposer les récipients de façon aléatoire et de modifier quotidiennement leur emplacement dans l'incubateur.

▼M1

Le pH du milieu témoin ne doit pas augmenter de plus de 1,5 unité durant l'essai. Dans le cas des métaux et des substances qui s'ionisent partiellement à un pH proche de celui de l'essai, il peut s'avérer nécessaire de limiter l'évolution du pH, afin d'obtenir des résultats reproductibles et bien définis. Il est techniquement possible de limiter l'évolution du pH à < 0,5 unité en induisant un taux adéquat de transfert massique de CO_2 de l'air environnant à la solution d'essai, par exemple en augmentant l'intensité de l'agitation. Une autre possibilité consiste à diminuer la demande en CO_2 en réduisant la biomasse initiale ou la durée de l'essai.

La surface sur laquelle les cultures sont incubées reçoit un éclairage continu, uniforme et fluorescent, par exemple de type «lumière blanche froide» ou «lumière naturelle». Les besoins lumineux varient selon les souches d'algues et de cyanobactéries. L'intensité lumineuse doit être choisie en fonction de l'organisme d'essai utilisé. Pour les espèces d'algues vertes recommandées, l'intensité lumineuse au niveau des solutions d'essai doit être choisie dans l'intervalle 60-120 $\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$ lorsqu'elle est mesurée dans le domaine de longueur d'onde autorisant la photosynthèse (400 à 700 nm) avec un capteur approprié. Certaines espèces, en particulier *Anabaena flos-aquae*, se développent bien sous des intensités lumineuses plus faibles et peuvent être endommagées par des intensités plus fortes. Pour ces espèces, il convient d'appliquer une intensité lumineuse moyenne comprise dans la gamme 40-60 $\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$ (en ce qui concerne les instruments de mesure de la lumière étalonnés en lux, la gamme de 4 440-8 880 lux pour la lumière blanche froide correspond approximativement à l'intensité lumineuse recommandée de 60-120 $\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$). L'intensité lumineuse ne s'écartera pas de plus de ± 15 % de l'intensité lumineuse moyenne dans la zone de l'incubation.

1.8.10. **Durée de l'essai**

L'essai dure normalement soixante-douze heures. Néanmoins, des durées plus ou moins longues peuvent être appliquées, à condition que tous les critères de validité mentionnés au paragraphe 1.7 soient respectés.

1.8.11. **Mesures et déterminations analytiques**

La biomasse des algues contenue dans chaque flacon est déterminée au moins une fois par jour durant la période d'essai. Si les mesures sont effectuées sur de petits volumes extraits de la solution d'essai avec une pipette, ceux-ci ne doivent pas être réintroduits dans le récipient d'essai.

La biomasse est mesurée par comptage manuel des cellules au microscope ou au moyen d'un compteur électronique de particules (dénombrement des cellules et/ou biovolume). D'autres techniques, par exemple la cytométrie à flux, la fluorescence chlorophyllienne in vitro ou in vivo (6)(7) ou la densité optique, peuvent être utilisées, à condition de pouvoir démontrer qu'il existe une corrélation satisfaisante avec la biomasse dans la gamme de valeurs de la biomasse de l'essai.

Le pH des solutions est mesuré au début et à la fin de l'essai.

Si l'on dispose d'une méthode permettant d'analyser la substance d'essai dans la gamme de concentrations appliquées, il faut analyser les solutions expérimentales afin de vérifier les concentrations initiales et le maintien des concentrations d'exposition durant l'essai.

▼**M1**

L'analyse de la concentration de la substance d'essai, au début et à la fin de l'essai, dans des récipients renfermant une concentration élevée, une concentration faible et une concentration proche de la CE_{50} escomptée peut suffire si les concentrations d'exposition ne sont pas censées s'écarter de plus de 20 % des valeurs nominales durant l'essai. Il est préconisé d'analyser toutes les concentrations d'essai au début et à la fin de l'essai si les concentrations ne sont pas supposées demeurer dans l'intervalle de 80-120 % de la concentration nominale. S'agissant des substances d'essai volatiles, instables ou s'adsorbant fortement, on recommande de prélever des échantillons à analyser toutes les vingt-quatre heures durant la période d'exposition, afin de préciser la perte de substance d'essai. Pour ces substances, le nombre d'expériences identiques devra être augmenté. Dans tous les cas, il suffira de déterminer la concentration de la substance d'essai dans un seul récipient traité de manière identique pour chaque concentration expérimentale (ou dans le mélange du contenu de tous les récipients traités de manière identique).

Les milieux d'essai destinés spécialement à l'analyse des concentrations d'exposition durant l'essai doivent être traités de la même manière que les milieux utilisés pour l'essai: ils doivent être ensemencés avec les algues et incubés dans des conditions identiques. Si l'on doit analyser la concentration de la substance d'essai dissoute, les algues devront peut-être être séparées du milieu. À cette fin, il est préférable de procéder par centrifugation à une faible force d'accélération, suffisante pour sédimenter les algues.

S'il s'avère que la concentration de la substance d'essai a pu se maintenir tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale ou mesurée initialement, l'analyse des résultats peut s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement. Si l'écart à la concentration nominale ou mesurée initialement est supérieur à ± 20 %, l'analyse des résultats devra reposer sur la moyenne géométrique de la concentration relevée durant l'exposition ou sur des modèles décrivant la baisse de la concentration de la substance d'essai (3)(8).

L'essai d'inhibition de la croissance des algues est un système expérimental plus dynamique que la plupart des autres essais de toxicité à court terme sur des organismes aquatiques. En conséquence, les concentrations d'exposition réelles risquent d'être difficiles à définir, en particulier pour les substances s'adsorbant testées à faibles concentrations. Dans ces circonstances, la disparition de la substance de la solution par adsorption sur la biomasse croissante des algues ne signifie pas que la substance d'essai a disparu du système d'essai. En analysant le résultat de l'essai, il y a lieu de vérifier si la diminution de la concentration de la substance d'essai au cours de l'essai s'est accompagnée d'une baisse de l'inhibition de la croissance. Si tel est le cas, on peut envisager d'appliquer un modèle décrivant convenablement la baisse de la concentration de la substance d'essai (8). Dans le cas contraire, il sera peut-être pertinent de fonder l'analyse des résultats sur les concentrations initiales (nominales ou mesurées).

1.8.12. **Autres observations**

On observe au microscope la culture de l'inoculum pour vérifier si elle présente un aspect normal et sain ainsi que l'aspect des algues pour détecter la présence éventuelle d'anomalies (susceptibles de résulter de l'exposition à la substance d'essai) à la fin de l'essai.

▼M1

1.8.13. **Essai limite**

Dans certaines circonstances, par exemple lorsqu'un essai préliminaire indique que la substance d'essai n'exerce aucun effet toxique à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/l ou à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (suivant celle qui est la plus basse), on peut réaliser un essai limite afin de comparer les réactions d'un groupe témoin avec celles d'un groupe traité (à 100 mg/l ou à une concentration égale à la limite de solubilité). Il est fortement recommandé d'étayer cet essai par une analyse de la concentration d'exposition. Tous les critères de validité et conditions expérimentales décrits précédemment s'appliquent à l'essai limite, si ce n'est que le nombre de récipients traités de manière identique doit être au moins égal à six. Les variables étudiées dans le groupe témoin et le groupe traité peuvent être analysées au moyen d'un test statistique permettant de comparer les moyennes, par exemple un test t de Student. Si les variances des deux groupes sont inégales, on effectue un test t ajusté en fonction des variances inégales.

1.8.14. **Modification pour les substances fortement colorées**

L'irradiation (intensité lumineuse) doit être réalisée dans le haut de l'intervalle imposé dans cette méthode d'essai: 120µE m^{-2} s^{-1} ou une valeur plus élevée.

Le trajet des rayons lumineux doit être raccourci en réduisant le volume des solutions expérimentales (de l'ordre de 5-25 ml).

Un mouvement suffisant (par exemple, par une agitation modérée) doit être assuré pour obtenir une fréquence d'exposition élevée des algues à une forte irradiation à la surface de la culture.

2. **RÉSULTATS**

2.1. TRACÉ DES COURBES DE CROISSANCE

La biomasse des récipients d'essai peut être exprimée en unités du paramètre de substitution utilisé pour la mesurer (nombre de cellules, fluorescence, par exemple).

Porter dans un tableau la concentration estimée de la biomasse dans les cultures expérimentales et les cultures témoins, les concentrations de la substance d'essai et les temps de mesure enregistrés avec une précision minimale de l'ordre de l'heure, afin d'obtenir les points des courbes de croissance. Les échelles tant logarithmiques que linéaires peuvent être utiles à ce premier stade, mais les échelles logarithmiques sont indispensables et représentent généralement mieux les variations du rythme de la croissance durant l'essai. Notons que la croissance exponentielle produit une droite lorsqu'elle est portée sur une échelle logarithmique et que la pente de cette droite indique le taux de croissance spécifique.

À l'aide des points portés sur le graphique, examiner si les cultures témoins se développent au rythme exponentiel prévu tout au long de l'essai. Étudier attentivement tous les points et l'allure des graphiques et vérifier si les données brutes et les méthodes employées ne sont entachées d'aucune erreur. Vérifier en particulier tous les points qui semblent s'écarter du tracé suivant une erreur systématique. Si, à l'évidence, la manière dont on a procédé comporte des erreurs identifiables ou très probables, le point concerné est à signaler comme une valeur aberrante et ne doit pas être pris en compte dans l'analyse statistique ultérieure (une concentration nulle d'algues dans un des récipients traités de manière identique sur deux ou trois peut révéler que le récipient n'a pas été ensemencé correctement ou qu'il n'a pas été suffisamment bien nettoyé). Les raisons pour lesquelles on a décidé d'exclure un point parce qu'on le considère comme une valeur aberrante doivent être exposées clairement dans le rapport d'essai. Les raisons acceptées ne représentent que des erreurs méthodologiques (rares) et non un manque de précision. Les méthodes statistiques d'identification des valeurs aberrantes sont d'un usage limité pour ce type de problème et ne peuvent remplacer le jugement d'un expert. Il est préférable de conserver les valeurs aberrantes (signalées comme telles) parmi les données présentées ultérieurement sur un graphique ou un tableau.

▼M1

2.2. VARIABLES ÉTUDIÉES

Cet essai a pour but de déterminer les effets de la substance d'essai sur la croissance des algues. Cette méthode d'essai décrit deux variables étudiées, de manière à répondre aux différentes préférences et exigences réglementaires des pays membres. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables dans tous les pays membres, les effets doivent être évalués en fonction des deux variables étudiées (a) et (b) définies ci-dessous.

a) Taux de croissance spécifique moyen: cette variable étudiée est calculée d'après l'accroissement logarithmique de la biomasse pendant la durée de l'essai, exprimé par jour.

b) Rendement: cette variable étudiée correspond à la valeur de la biomasse à la fin de l'essai diminuée de la valeur de la biomasse au début de l'essai.

Pour l'application de cette méthode dans le cadre réglementaire de l'UE, le calcul des résultats doit être fondé sur un taux de croissance spécifique moyen, pour les raisons décrites ci-dessous. Notons que les valeurs de toxicité calculées avec ces deux variables étudiées ne sont pas comparables et qu'il faut tenir compte de cette différence lorsqu'on utilise les résultats de l'essai. Les valeurs de la CE_x fondées sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) seront généralement supérieures à celles fondées sur le rendement (C_xE_r) si les conditions expérimentales de cette méthode d'essai sont respectées, en raison de la base mathématique de chacune de ces approches. Cette différence n'est due qu'au calcul mathématique, il ne s'agit pas d'une différence de sensibilité entre les deux variables étudiées. Le concept du taux de croissance spécifique moyen repose sur le type général de croissance exponentielle des algues dans des cultures non limitées, où la toxicité est estimée d'après les effets sur le taux de croissance, sans tenir compte du niveau absolu du taux de croissance spécifique du témoin, de la pente de la courbe concentration-effet ni de la durée de l'essai. En revanche, les résultats fondés sur la variable de rendement dépendent de toutes ces autres variables. La C_xE_r dépend du taux de croissance spécifique de l'espèce d'algue utilisée dans chaque essai et du taux de croissance spécifique maximal, susceptible de varier d'une espèce d'algue à une autre, voire d'une souche à une autre. Cette variable ne doit pas être utilisée pour comparer la sensibilité des espèces d'algues, voire de différentes souches d'algue, à des substances toxiques. S'il est préférable, du point de vue scientifique, d'estimer la toxicité d'après le taux de croissance spécifique moyen, la présente méthode propose également des estimations fondées sur le rendement afin de satisfaire à la réglementation en vigueur dans certains pays.

2.2.1. **Taux de croissance spécifique moyen**

Le taux de croissance spécifique moyen durant une période donnée est calculé comme l'accroissement logarithmique de la biomasse, pour chaque expérience identique des groupes traités et témoins, au moyen de l'équation présentée ci-dessous:

$$\mu_{i\text{-}j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \quad (\text{jour}^{-1})$$

où:

$\mu_{i\text{-}j}$ est le taux de croissance spécifique moyen du temps *i* au temps *j*

X_i est la biomasse au temps *i*;

X_j est la biomasse au temps *j*.

▼M1

Pour chaque groupe traité et témoin, calculer un taux de croissance moyen et les estimations de la variance.

Calculer le taux de croissance spécifique moyen sur toute la durée de l'essai (normalement du jour 0 au jour 3), en prenant, comme valeur de départ, la valeur nominale de la biomasse ensemencée plutôt que sa valeur mesurée, car cela permet généralement d'obtenir une plus grande précision. Si l'instrument utilisé pour mesurer la biomasse autorise des déterminations suffisamment précises d'une petite biomasse d'inoculum (par exemple, un cytomètre à flux), la concentration initiale mesurée de la biomasse peut alors être utilisée. Évaluer également les taux de croissance section par section en considérant, pour ce calcul, qu'ils équivalent aux taux de croissance spécifiques de chaque jour de l'essai (jours 0-1, 1-2 et 2-3) et vérifier si le taux de croissance des témoins reste constant (voir critères de validité, paragraphe 1.7). Le fait que le taux de croissance spécifique du premier jour soit sensiblement inférieur au taux de croissance spécifique moyen peut indiquer une phase de latence. S'il est possible de réduire presque à néant la phase de latence dans les cultures témoins par une propagation appropriée de la préculture, la présence d'une phase de latence dans les cultures exposées peut refléter un rétablissement après un choc toxique initial ou une exposition réduite due à une perte de substance d'essai (notamment par sorption sur la biomasse des algues) après l'exposition initiale. Le taux de croissance section par section permet ainsi d'étudier les différents effets de la substance d'essai durant la période d'exposition, d'où son intérêt. Des différences sensibles entre le taux de croissance section par section et le taux de croissance moyen traduisent un écart par rapport à la croissance exponentielle constante et appellent un examen attentif des courbes de croissance.

Calculer le pourcentage d'inhibition du taux de croissance pour chaque expérience identique de chaque groupe traité à l'aide de l'équation suivante:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

où:

$\%I_t$ est le pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique moyen;

μ_C est la valeur moyenne du taux de croissance spécifique moyen (μ) dans le groupe témoin;

μ_T est le taux de croissance spécifique moyen d'une des expériences identiques du groupe traité.

Si les solutions d'essai sont préparées à l'aide d'un solvant, c'est le témoin au solvant plutôt que le témoin sans solvant qui doit être utilisé pour calculer le pourcentage d'inhibition.

2.2.2. **Rendement**

Le rendement est calculé d'après la différence entre la valeur de la biomasse à la fin de l'essai et sa valeur au début de l'essai pour chaque expérience identique des groupes traités et témoins. Pour chaque concentration expérimentale et le témoin, calculer un rendement moyen ainsi que les estimations de la variance. Le pourcentage d'inhibition du rendement ($\%I_r$) peut être calculé pour chaque expérience identique de chaque groupe traité d'après la formule suivante:

$$\%I_r = \frac{(R_C - R_T)}{R_C} \times 100$$

▼**M1**

où:

$\%I_r$ est le pourcentage d'inhibition du rendement;

R_C est la valeur moyenne du rendement dans le groupe témoin;

R_T est la valeur du rendement dans l'une des expériences identiques du groupe traité.

2.3. TRACÉ DES COURBES CONCENTRATION-EFFET

Porter sur un graphique le pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration de la substance d'essai et examiner les points obtenus attentivement, sans tenir compte des points ayant été éliminés parce que considérés comme des valeurs aberrantes au cours de la première phase. Faire passer une courbe régulière entre les points, à vue d'œil ou par interpolation informatique, afin d'obtenir une première impression de la relation concentration-effet et poursuivre par une méthode plus détaillée, de préférence une méthode statistique informatisée. En fonction de l'usage auquel on destine les données, de la qualité (précision) et de la quantité des données ainsi que de la disponibilité des outils d'analyse des données, on pourra décider (et cela se justifiera parfaitement dans certains cas) d'arrêter l'analyse des données à ce stade et de ne retenir que les chiffres clés, à savoir la CE_{50} et la CE_{10} (et/ou la CE_{20}), de la courbe ajustée à vue d'œil (voir également le paragraphe ci-après sur les effets stimulants). Citons quelques raisons valables de ne pas recourir à une méthode statistique:

— traitées par des méthodes informatisées, les données ne livreront pas de résultats plus fiables que ceux obtenus par une analyse d'expert — dans ces circonstances, certains programmes informatiques risquent même d'être incapables de produire une solution fiable (les itérations peuvent ne pas converger, etc.),

— les effets stimulant la croissance ne peuvent être traités correctement par les programmes informatiques disponibles (voir plus bas).

2.4. MÉTHODES STATISTIQUES

L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de la régression. Il est possible d'appliquer une régression linéaire pondérée après avoir effectué une transformation linéarisant les valeurs décrivant l'effet observé — par exemple, en unités probit ou logit ou Weibull (9), mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression non linéaire, celles-ci traitant mieux les irrégularités inévitables des valeurs et les écarts par rapport aux distributions régulières. Proches de zéro ou de l'inhibition totale, ces irrégularités risquent d'être amplifiées par la transformation et d'interférer avec l'analyse (9). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull se prêtent aux effets par tout ou rien (mortalité ou survie, par exemple) et doivent être modifiées pour pouvoir être utilisées avec les valeurs de croissance ou de biomasse. Les références (10)(11) et (12) décrivent des procédures permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues. L'utilisation d'une analyse de la régression non linéaire est détaillée à l'appendice 4.

▼M1

Pour chaque variable étudiée à analyser, utiliser la relation concentration-effet pour calculer des estimations ponctuelles des valeurs de CE_x. Déterminer, si possible, les limites de confiance à 95 % pour chaque estimation. La validité de l'ajustement des données décrivant les effets au modèle de régression est à évaluer par un procédé statistique ou graphique. L'analyse de la régression doit s'appuyer sur les effets relevés dans chaque récipient traité de manière identique et non sur les moyennes des groupes traités. Si toutefois, l'ajustement d'une courbe non linéaire est difficile ou échoue parce que les données sont trop dispersées, une régression peut alors être effectuée sur les moyennes des groupes, ce qui permet de réduire l'influence des valeurs que l'on soupçonne aberrantes. Le recours à cette option doit être signalé dans le rapport d'essai en tant qu'écart par rapport à la procédure normale, dû au fait que l'ajustement de la courbe avec les valeurs individuelles des expériences identiques n'a pas livré un bon résultat.

Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec *bootstrap* (rééchantillonnage) (13) si les modèles ou les méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.

Afin d'estimer la CMEO, et par conséquent la CSEO, pour les effets de la substance d'essai sur le taux de croissance, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par des techniques d'analyse de la variance (ANOVA). La moyenne de chaque concentration doit ensuite être comparée avec la moyenne du témoin à l'aide d'un test approprié à comparaisons multiples ou de tendance. Les tests de Dunnett ou de William peuvent être utiles (14)(15)(16)(17)(18). Il est nécessaire de vérifier si l'hypothèse de l'ANOVA de l'homogénéité de la variance se confirme. Cette vérification peut être pratiquée par un procédé graphique ou par un test formel (18), notamment les tests de Levene ou de Bartlett. L'infirmation de l'hypothèse de l'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance est extrême et ne peut être rectifiée par une transformation, on envisagera des méthodes d'analyse telles que les tests de tendance régressifs de Jonkheere. La référence (12) fournit des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.

Des découvertes récentes ont conduit les scientifiques à préconiser l'abandon de la notion de CSEO au profit d'estimations ponctuelles de la CE_x fondées sur la régression. Aucune valeur de x appropriée n'a encore été établie pour cet essai sur les algues. Néanmoins, une gamme de 10 à 20 % semble convenir (suivant la variable étudiée sélectionnée) et il est préférable de mentionner à la fois la CE_{10} et la CE_{20} dans le rapport.

2.5. STIMULATION DE LA CROISSANCE

On observe quelquefois une stimulation de la croissance (inhibition négative) aux faibles concentrations. Ce phénomène peut résulter d'une hormèse («stimulation toxique») ou de l'introduction de facteurs de stimulation de la croissance, véhiculés par la substance d'essai, dans le milieu minimal utilisé. Notons que l'ajout de nutriments minéraux ne devrait exercer aucun effet direct, étant donné que le milieu d'essai doit contenir un excès de nutriments tout au long de l'essai. La stimulation à faible dose peut habituellement être ignorée dans les calculs de la CE_{50}, à moins qu'elle ne soit très prononcée. Néanmoins, si cette stimulation est extrême ou s'il faut calculer une valeur de CE_x pour une faible valeur de x, des procédures particulières pourraient être requises. On évitera, dans la mesure du possible, de soustraire les effets stimulants à l'analyse des données et, si le logiciel permettant d'ajuster la courbe ne peut pas accepter une stimulation mineure, une interpolation linéaire avec *bootstrap* peut être employée. Si la stimulation est extrême, l'utilisation d'un modèle d'hormèse est envisageable (19).

▼**M1**

2.6. INHIBITION NON TOXIQUE DE LA CROISSANCE

Les substances d'essai absorbant la lumière peuvent abaisser le taux de croissance, car l'obscurcissement diminue la quantité de lumière disponible. Il y a lieu de séparer ces types d'effets physiques des effets toxiques en modifiant les conditions expérimentales et de rapporter les premiers séparément. Les références (2) et (3) donnent des indications à ce sujet.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes, y compris la limite de solubilité dans l'eau,

— données d'identification chimique, notamment pureté.

Espèce soumise à l'essai:

— souche, fournisseur ou source et conditions de culture utilisées.

Conditions expérimentales:

— date du début de l'essai et durée de l'essai,

— description de la conception de l'essai: récipients d'essai, volumes des cultures, densité de la biomasse au début de l'essai,

— composition du milieu,

— concentrations expérimentales et expériences identiques (par exemple, nombre d'expériences identiques, nombre de concentrations expérimentales et progression géométrique appliquée),

— description de la préparation des solutions expérimentales, y compris l'utilisation de solvants, etc.,

— appareillage destiné aux cultures,

— intensité et qualité lumineuses (source, homogénéité),

— température,

— concentrations mises à l'essai: concentrations d'essai nominales et tous les résultats des analyses visant à déterminer la concentration de la substance d'essai dans les récipients expérimentaux. Le rendement de récupération de la méthode et le seuil de quantification dans la matrice expérimentale doivent être mentionnés,

— tous les écarts par rapport à cette méthode d'essai,

— méthode de détermination de la biomasse et démonstration de la corrélation entre le paramètre mesuré et le poids sec.

Résultats:

— valeurs du pH au début et à la fin de l'essai dans tous les récipients traités,

— biomasse dans chaque récipient à chaque point de mesure et méthode de mesure de la biomasse,

▼**M1**

— courbes de croissance (biomasse en fonction du temps),

— calcul des variables étudiées pour chaque expérience identique de chaque traitement ainsi que des moyennes et du coefficient de variation des expériences identiques,

— représentation graphique de la relation concentration-effet,

— estimation de la toxicité pour les variables étudiées, par exemple la CE_{50}, la CE_{10} et la CE_{20} et intervalles de confiance associés; CMEO et CSEO, si elles ont été calculées, et méthodes statistiques appliquées à leur détermination,

— si une analyse de la variance (ANOVA) a été pratiquée, puissance de l'effet détectable (par exemple, la différence la moins significative),

— stimulation de la croissance éventuellement observée dans un groupe traité,

— tout autre effet observé, par exemple changement morphologique des algues,

— analyse des résultats, notamment l'influence d'un éventuel écart par rapport à cette méthode d'essai sur les résultats de l'essai.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

1) OCDE LD 201 (2006) Algues d'eau douce et cyanobactéries, essai d'inhibition de la croissance

2) ISO 1998: Qualité de l'eau — lignes directrices pour essais d'inhibition de la croissance algale avec des matières peu solubles, des composés volatils, des métaux et des eaux résiduaires. ISO/DIS 14442

3) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.

4) ISO 1998: Qualité de l'eau — échantillonnage — partie 16: lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons. ISO 5667-16.

5) ISO 1993: Qualité de l'eau — essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires. ISO 8692.

6) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research 31: 2525-2531.

7) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), pp.919-925

8) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. Environ. Toxicol. Chem 22, 2073-2079.

9) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

▼**M1**

10) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.

11) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11:1485-1494.

12) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

14) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121

15) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

16) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

17) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

18) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.

▼**M1**

Appendice 1

Souches convenant à l'essai

Algues vertes

— *Pseudokirchneriella subcapitata* (autrefois dénommée *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG.

— *Desmodesmus subspicatus* (autrefois dénommée *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG.

Diatomées

— *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Cyanobactéries

— *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

— *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Sources des souches

Les souches recommandées sont disponibles sous la forme de cultures unialgales dans les collections suivantes (par ordre alphabétique):

ATCC: American Type Culture Collection

10801 University Boulevard

Manassas, Virginia 20110-2209

ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa

Institute of Freshwater Ecology,

Windermere Laboratory

Far Sawrey, Amblerside

Cumbria

LA22 0LP

ROYAUME-UNI

SAG: Collection of Algal Cultures

Albrecht-von-Haller-Institut

University of Göttingen

Nicholausberger Weg 18

D-37073 Göttingen

ALLEMAGNE

UTEX Culture Collection of Algae

Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology

School of Biological Sciences

the University of Texas at Austin

Austin, Texas 78712

ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

▼M1

Aspect et caractéristiques des espèces recommandées

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Aspect	Cellules solitaires, incurvées et torses	Cellules ovales et solitaires la plupart du temps	Bâtonnets	Chaînes de cellules ovales	Bâtonnets
Dimensions (L × l) µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volume cellulaire (μm^3/cellule)	40-60 (1)	60-80 (1)	40-50 (1)	30-40 (1)	2,5 (2)
Poids sec des cellules (mg/cellule)	$2\text{-}3 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$1\text{-}2 \times 10^{-8}$	$2\text{-}3 \times 10^{-9}$
Taux de croissance (3) ($jour^{-1}$)	1,5-1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

(1) Mesuré avec un compteur électronique de particules.
(2) Calculé d'après la taille.
(3) Taux de croissance le plus souvent observé dans le milieu de l'OCDE sous une intensité lumineuse approximative de 70 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ et à 21 °C.

Recommandations particulières pour la culture et la manipulation des espèces d'essai recommandées

Pseudokirchneriella subcapitata et *Desmodesmus subspicatus*

Ces algues vertes sont généralement faciles à cultiver dans différents milieux de culture. Les collections de cultures renseignent les utilisateurs sur les milieux appropriés. Les cellules sont normalement solitaires, et la densité cellulaire se mesure aisément à l'aide d'un compteur électronique de particules ou d'un microscope.

Anabaena flos-aquae

La culture mère se conserve dans divers milieux de croissance. Il importe particulièrement d'éviter que la culture des lots ait dépassé la phase exponentielle de croissance au moment du renouvellement, le rétablissement étant difficile à ce stade.

Anabaena flos-aquae forme des chaînes de cellules enroulées en pelotes (agrégats). La dimension de ces agrégats est susceptible de varier en fonction des conditions de culture. Il peut s'avérer nécessaire de dissocier ces agrégats pour compter les cellules au microscope ou avec un compteur électronique de particules, afin de déterminer la biomasse.

Les chaînes de sous-échantillons peuvent être rompues en différents points par sonication, afin de réduire la variabilité lors du comptage. Une sonication plus longue que celle requise pour couper les chaînes en petits segments risque de détruire les cellules. L'intensité et la durée de la sonication doivent être identiques pour chaque traitement.

On dénombrera suffisamment de champs sur l'hémocytomètre (au moins quatre cents cellules) afin de compenser la variabilité. Cela augmentera la fiabilité des déterminations de la densité au microscope.

Après le découpage des chaînes de cellules par une sonication menée délicatement, le volume cellulaire total d'*Anabaena* peut être déterminé avec un compteur électronique de particules. Il convient de régler l'énergie de la sonication de façon à éviter de briser les cellules.

Utiliser un mélangeur à vortex ou un instrument analogue pour s'assurer que la suspension d'algues utilisée pour ensemencer les récipients d'essai est bien mélangée et homogène.

▼**M1**

Les récipients d'essai doivent être placés sur une table d'agitation animée d'un mouvement orbital ou de va-et-vient à environ cent cinquante tours par minute. Les *Anabaena* peuvent également être agitées par intermittence de façon à former moins d'agrégats. Si elles s'agrègent, on veillera à prélever des échantillons représentatifs pour les mesures de biomasse. Une agitation vigoureuse avant le prélèvement peut être nécessaire pour désagréger les agrégats d'algues.

Synechococcus leopoliensis

La culture mère se conserve dans divers milieux de croissance. Les collections de cultures renseignent les utilisateurs sur les milieux appropriés.

Synechococcus leopoliensis croît en formant des bâtonnets solitaires. La très petite dimension des cellules rend difficile le comptage au microscope pour les mesures de biomasse. Dans ce cas, il est utile de disposer d'un compteur électronique capable de dénombrer des particules mesurant jusqu'à 1 μm. Une mesure par fluorométrie in vitro convient également.

Navicula pelliculosa

La culture mère se conserve dans divers milieux de croissance. Les collections de cultures renseignent les utilisateurs sur les milieux appropriés. Ici, le milieu doit être additionné de silicate.

Navicula pelliculosa peut former des agrégats dans certaines conditions de culture. À cause de leur production lipidique, les cellules algales tendent parfois à s'accumuler dans le film qui se forme à la surface. Si tel est le cas, des mesures spéciales accompagneront le prélèvement de sous-échantillons en vue de la détermination de la biomasse, afin d'assurer la représentativité des échantillons. Une agitation vigoureuse, par exemple au moyen d'un mélangeur à vortex, peut être nécessaire.

▼**M1**

Appendice 2

Milieux de croissance

L'un des deux milieux de croissance suivants peut être utilisé:

Milieu de l'OCDE: milieu de la première version de la ligne directrice 201 de l'OCDE, conforme à la norme ISO 8692

Milieu AAP de l'Agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (US EPA), conforme à l'ASTM.

Ces milieux doivent être préparés avec des produits de qualité «réactifs» ou «pour analyse» et de l'eau désionisée.

Composition du milieu AAP (US EPA) et du milieu de la ligne directrice 201 de l'OCDE

Ingrédient	US EPA		OCDE	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2.2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

(*) Le rapport molaire de l'EDTA sur le fer est légèrement supérieur à l'unité. Cela empêche le fer de précipiter et réduit en même temps au minimum la chélation des ions de métaux lourds.

Dans l'essai mené sur la diatomée *Navicula pelliculosa*, les deux milieux doivent être additionnés de $Na_2SiO_39H_2O$, afin d'atteindre une concentration de 1,4 mg de Si/l.

Le pH du milieu est obtenu à l'équilibre entre le système carbonate du milieu et la pression partielle de CO_2 dans l'air atmosphérique. Le pH à 25 °C et la concentration molaire de bicarbonate sont liés de façon approximative par l'équation suivante:

$$pH_{équ} = 11{,}30 + \log [HCO_3]$$

▼M1

Avec 15 mg/l de $NaHCO_3$, le $pH_{équ}$ = 7,5 (milieu de l'US EPA) et avec 50 mg/l de $NaHCO_3$, le $pH_{équ}$ = 8,1 (milieu de l'OCDE).

Composition élémentaire du milieu d'essai

Élément	US EPA	OCDE
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Préparation du milieu de l'OCDE

Élément nutritif	Concentration dans la solution mère
Solution mère 1: macroéléments	
NH_4Cl	1,5 $g \cdot l^{-1}$
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 $g \cdot l^{-1}$
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 $g \cdot l^{-1}$
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 $g \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	0,16 $g \cdot l^{-1}$
Solution mère 2: fer	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 $mg \cdot l^{-1}$
Solution mère 3: oligoéléments	
H_3BO_3	185 $mg \cdot l^{-1}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 $mg \cdot l^{-1}$
$ZnCl_2$	3 $mg \cdot l^{-1}$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 $mg \cdot l^{-1}$
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 $mg \cdot l^{-1}$
Solution mère 4: bicarbonate	
$NaHCO_3$	50 $g \cdot l^{-1}$
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Stériliser les solutions mères par filtration sur membrane (diamètre moyen des pores: 0,2 µm) ou à l'autoclave (15 minutes à 120 °C). Stocker les solutions à l'obscurité et à 4 °C.

Ne pas autoclaver les solutions mères 2 et 4 mais les stériliser par filtration sur membrane.

▼**M1**

Préparer le milieu de croissance en ajoutant un volume approprié des solutions mères 1 à 4 à de l'eau:

Ajouter à 500 ml d'eau stérilisée:

— 10 ml de solution mère 1,

— 1 ml de solution mère 2,

— 1 ml de solution mère 3,

— 1 ml de solution mère 4.

Porter à 1 000 ml avec de l'eau stérilisée.

Attendre que le milieu atteigne l'équilibre avec le CO_2 atmosphérique, si nécessaire en y faisant barboter de l'air stérile et filtré durant quelques heures.

Préparation du milieu AAP

A1.1. Ajouter 1 ml de chaque solution mère visée aux points A1.2.1 à A1.2.7 ci-après à environ 900 ml d'eau désionisée ou distillée, et porter le volume à 1 litre.

A1.2. Préparer les solutions mères de macroéléments en dissolvant les composés suivants dans 500 ml d'eau désionisée ou distillée. Les réactifs A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 et A1.2.4 peuvent être combinés dans une seule solution mère.

A1.2.1. $NaNO_3$ – 12,750 g.

A1.2.2. $MgCL_2 \cdot 6H_2O$ – 6,082 g.

A1.2.3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 2,205 g.

A1.2.4. *Solution mère d'oligoéléments* (voir A1.3).

A1.2.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 7,350 g.

A1.2.6. K_2HPO_4 – 0,522 g.

A1.2.7. $NaHCO_3$ – 7,500 g.

A1.2.8. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ — Voir note A1.1.

NOTE A1.1. — À n'utiliser que pour les diatomées. Peut être ajouté directement (202,4 mg) ou véhiculé dans une solution mère pour donner une concentration finale de 20 mg/l en Si dans le milieu.

A1.3. Préparer la solution mère d'oligoéléments en dissolvant les composés suivants dans 500 ml d'eau désionisée ou distillée:

A1.3.1. H_3BO_3–92,760 mg.

A1.3.2. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$– 207,690 mg.

A1.3.3. $ZnCl_2$–1,635 mg.

A1.3.4. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$–79,880 mg.

A1.3.5. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$–0,714 mg.

A1.3.6. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$–3,630 mg.

A1.3.7. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$–0,006 mg.

A1.3.8. $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$– 150,000 mg.

[Ethylènedinitrilotétraacétate de sodium].

▼**M1**

A1.3.9. $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$–0,005 mg; voir note A1.2.

NOTE A1.2. — À n'utiliser que dans le milieu pour les substances mères des diatomées.

A1.4. Ajuster le pH à 7,5 ± 0,1 avec du NaOH ou de l'HCl 0,1 *N* ou 1,0 *N*.

A1.5. Filtrer le milieu dans un récipient stérile sur un filtre à membrane à pores de 0,22 µm si l'on utilise un compteur de particules, ou sur un filtre à pores de 0,45 µm si l'on n'utilise pas de compteur de particules.

A1.6. Garder le milieu à l'obscurité, à environ 4 °C jusqu'à son utilisation.

▼M1

Appendice 3

Exemple de méthode de culture des algues

Observations générales

La méthode suivante s'applique à la culture des algues destinées aux essais de toxicité.

Il convient d'utiliser des méthodes préservant les cultures d'algues de toute contamination bactérienne. Il peut être souhaitable d'établir des cultures axéniques, mais il faut employer des cultures unialgales.

Toutes les opérations doivent être réalisées dans des conditions stériles, afin d'éviter toute contamination par des bactéries ou d'autres algues.

Matériel

Voir à la section «Appareillage» de la méthode d'essai.

Procédé d'obtention de cultures d'algues

Préparation de solutions nutritives (milieu):

Tous les sels minéraux du milieu sont préparés sous la forme de solutions mères concentrées et entreposées au frais et à l'abri de la lumière. Ces solutions sont stérilisées par filtration ou à l'autoclave.

On prépare le milieu en ajoutant une quantité correcte de solution mère à de l'eau distillée stérile, en prenant bien soin d'éviter tout risque d'infection. Pour les milieux solides, on ajoute 0,8 % d'agar.

Culture mère:

Les cultures mères qui servent de matériau d'essai initial sont de petites cultures d'algues régulièrement transférées dans un milieu frais. Si les cultures ne sont pas utilisées régulièrement, il convient de les étaler en stries dans des tubes inclinés remplis d'agar. Ces cultures sont transférées dans un milieu frais au moins une fois tous les deux mois.

Les cultures mères sont cultivées dans des erlenmeyers contenant le milieu approprié (volume de quelque 100 ml). Lorsque les algues sont incubées à 20 °C sous un éclairage permanent, un transfert hebdomadaire s'impose.

Lors du transfert, on transvase avec des pipettes stériles une quantité de «vieille» culture dans un flacon de milieu frais de manière que, pour les espèces à croissance rapide, la concentration initiale soit environ cent fois inférieure à ce qu'elle était dans la vieille culture.

Le taux de croissance d'une espèce peut être déterminé à partir de la courbe de croissance. S'il est connu, il est possible d'estimer la densité à laquelle la culture doit être introduite dans le nouveau milieu. Il convient de le faire avant que la culture n'atteigne la phase de mort.

Préculture:

La préculture sert à fournir une quantité d'algues suffisante pour l'ensemencement des cultures d'essai. La préculture est incubée dans les conditions de l'essai et utilisée lorsqu'elle est encore en croissance exponentielle, normalement après une période d'incubation de deux à quatre jours. Si les cultures d'algues renferment des cellules déformées ou anormales, il faut éliminer ces cultures.

▼M1

Appendice 4

Analyse des données par une régression non linéaire

Considérations générales

L'effet observé dans les essais sur les algues et autres essais sur la croissance de micro-organismes (augmentation de la biomasse) est, par nature, exprimé par une variable continue ou métrique — le rythme d'un processus si l'on utilise le taux de croissance et son intégrale en fonction du temps si on choisit la biomasse. Ces deux variables sont comparées à l'effet moyen correspondant observé sur des témoins non exposés (représentés en plusieurs exemplaires identiques) manifestant un effet maximal dans les conditions imposées, la lumière et la température étant les principaux facteurs déterminants dans l'essai sur les algues. Le système est distribué ou homogène, et la biomasse peut être considérée comme un continuum, en faisant abstraction des cellules individuelles. La distribution de la variance du type d'effet d'un tel système ne dépend que des facteurs expérimentaux (décrits généralement par les distributions log-normales ou normales de l'erreur), et ce, contrairement aux bioessais classiques où les effets sont exprimés par des réponses par tout ou rien, pour lesquelles il est souvent admis que la tolérance (affichant généralement une distribution binomiale) de chaque organisme constitue la composante dominante de la variance. Dans ce cas, l'effet relevé chez les témoins est nul ou assimilé à un niveau de fond.

Dans la situation simple, l'effet normalisé ou relatif, r, décroît de 1 (inhibition nulle) à 0 (inhibition à 100 %). Notons que tous les effets ont une erreur associée et qu'il est possible de calculer les inhibitions négatives apparentes en considérant qu'elles résultent uniquement de l'erreur aléatoire.

Analyse de la régression

Modèles

Une analyse de régression a pour objet de décrire quantitativement la courbe concentration-effet sous la forme d'une fonction mathématique de régression $Y = f(C)$ ou, plus souvent, $F(Z)$ où $Z = \log C$. La fonction inverse, $C = f^{-1}(Y)$ permet de calculer des valeurs de la CE_x, notamment les CE_{50}, CE_{10} et CE_{20}, et leurs limites de confiance à 95 %. Il se trouve que plusieurs fonctions mathématiques simples décrivent correctement la relation concentration-effet obtenue dans les essais d'inhibition de la croissance des algues. Parmi ces fonctions, citons l'équation logistique, l'équation asymétrique de Weibull et la distribution log-normale, qui sont toutes des courbes sigmoïdes se rapprochant asymptotiquement de un pour $C \rightarrow 0$ et de zéro pour $C \rightarrow$ infini.

L'utilisation de modèles de fonctions de seuil continues (par exemple, le modèle de Kooijman pour «l'inhibition de la croissance de la population», Kooijman et al., 1996) constitue une solution récemment proposée, différente des modèles asymptotiques. Ce modèle suppose qu'il n'y ait pas d'effet aux concentrations inférieures à un certain seuil, CE0+, estimé par une extrapolation de la relation concentration-effet consistant à intercepter l'axe des concentrations à l'aide d'une fonction continue simple non différentiable au point de départ.

Notons que l'analyse peut être une simple minimisation des sommes des carrés résiduels (en supposant que la variance soit constante) ou des carrés pondérés si l'hétérogénéité de la variance est compensée.

▼**M1**

Marche à suivre

Sélectionner une équation fonctionnelle appropriée, Y = f(C), et l'ajuster aux données par une régression non linéaire. Utiliser de préférence les mesures relevées dans chaque flacon, plutôt que les moyennes des expériences identiques, afin de tirer un maximum d'informations des données. D'un autre côté, si la variance est élevée, l'expérience pratique nous porte à croire que les moyennes des expériences identiques peuvent fournir une estimation mathématique plus solide, moins influencée par les erreurs aléatoires des données que chaque point pris individuellement.

Porter sur un graphique les valeurs mesurées et la courbe ajustée et vérifier si l'ajustement est valable. L'analyse des valeurs résiduelles peut être particulièrement utile à ce propos. Si la fonction choisie pour ajuster la courbe concentration-effet ne décrit pas bien l'ensemble de la courbe ou une partie essentielle de celle-ci, telle que les effets aux faibles concentrations, choisir un autre modèle d'ajustement, par exemple une courbe asymétrique, telle que la fonction de Weibull, à la place d'une fonction symétrique. Les inhibitions négatives peuvent poser un problème, par exemple avec la fonction de distribution log-normale, qui nécessitera, de la même manière, la recherche d'une autre fonction de régression. Il est déconseillé d'assigner une valeur nulle ou une faible valeur positive à ces valeurs négatives parce que cela fausse la distribution des erreurs. Il peut être utile de procéder à des ajustements séparés sur des portions de la courbe telles que celle où l'inhibition est faible, afin d'estimer les valeurs de $CE_{x\ faibles}$. En partant de l'équation ajustée [par «estimation inverse», $C = f^{-1}(Y)$], calculer des estimations ponctuelles caractéristiques des CE_x et rapporter au moins la CE_{50} et une ou deux $CE_{x\ faibles}$. La pratique des essais a montré que la précision de l'essai sur les algues permettait normalement d'effectuer une estimation raisonnablement précise au seuil de 10 % d'inhibition si les points dont on dispose sont en nombre suffisant — à moins qu'une stimulation ne survienne aux faibles concentrations, ce qui créerait une confusion. La précision de l'estimation de la CE_{20} est souvent bien meilleure que celle de la CE_{10}, parce que la CE_{20} se situe généralement sur la partie à peu près linéaire de la courbe concentration-effet centrale. Quelquefois, la CE_{10} peut être difficile à interpréter à cause de la stimulation de la croissance, de sorte que, même si la CE_{10} s'obtient généralement avec une précision suffisante, il est toujours recommandé de mentionner également la CE_{20}.

Facteurs de pondération

En général, la variance expérimentale n'est pas constante et inclut une composante proportionnelle, d'où l'intérêt de procéder d'office à une régression pondérée. Les facteurs de pondération s'appliquant à une telle analyse sont normalement supposés être inversement proportionnels à la variance:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

De nombreux programmes de régression permettent d'effectuer une analyse de régression pondérée avec des facteurs de pondération repris dans un tableau. Pour se simplifier la tâche, il faudrait normaliser les facteurs de pondération en les multipliant par $n/\sum w_i$ (n étant le nombre de points), de telle sorte que leur somme soit égale à un.

Normalisation des valeurs prises par les effets

La normalisation par la valeur moyenne de l'effet sur les témoins pose certains problèmes de principe et donne une structure de variance plutôt compliquée. En divisant les valeurs par la valeur moyenne des témoins en vue d'obtenir le pourcentage d'inhibition, on introduit une erreur supplémentaire due à l'erreur sur la moyenne des témoins. À moins que cette erreur ne soit négligeable, les facteurs de pondération appliqués à la régression et les limites de confiance doivent être corrigés en fonction de la covariance avec le témoin (17). Notons qu'il est important d'obtenir une précision élevée pour la moyenne estimée des valeurs affichées par les témoins, afin de minimiser la variance globale de l'effet relatif. Cette variance se calcule comme suit

▼M1

(l'indice i fait référence au niveau de concentration i et l'indice 0 aux témoins):

$$Y_i = \text{effet relatif} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

avec une variance

$$Var(Y_i) = Var\ (r_i/r_0) \cong (\delta Y_i / \delta r_i)^2 \cdot Var(r_i) + (\delta Y_i/ \delta r_0)^2 \cdot Var(r_0)$$

et comme

$$(\delta\ Y_i/\ \delta\ r_i) = 1/r_0 \text{ et } (\delta\ Y_i\ /\ \delta\ r_0) = r_i/r_0^2$$

avec des données à distribution normale et des expériences identiques m_i et m_0:

$$Var(r_i) = \sigma^2/m_i$$

la variance totale de l'effet relatif Y_i devient donc

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2\ m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4\ m_0$$

L'erreur sur la moyenne du témoin est inversement proportionnelle à la racine carrée du nombre d'expériences identiques du témoin prises en compte dans la moyenne, et il est quelquefois justifié d'inclure des données antérieures, ce qui réduit considérablement l'erreur. Il est également possible de ne pas normaliser les données ni d'ajuster les effets absolus, y compris l'effet affiché par le témoin, mais d'introduire la valeur de l'effet prise par le témoin en tant que paramètre supplémentaire à ajuster par une régression non linéaire. Avec une équation de régression ordinaire à deux paramètres, cette méthode requiert l'ajustement de trois paramètres et demande, par conséquent, plus de points qu'une régression non linéaire pratiquée sur des données normalisées à l'aide d'une valeur de l'effet prise par le témoin déterminée à l'avance.

Intervalles de confiance inverses

Le calcul des intervalles de confiance d'une régression non linéaire par une estimation inverse est assez complexe et ne figure généralement pas parmi les options livrées avec les programmes courants de calcul statistique. Des limites de confiance approximatives peuvent être obtenues avec des programmes classiques de régression non linéaire, à l'aide d'une reparamétrisation (Bruce et Versteeg, 1992), consistant à reformuler l'équation mathématique en prenant les estimations ponctuelles désirées, par exemple la CE_{10} et la CE_{50}, comme paramètres à estimer [soit la fonction I = f (α, β, concentration), utilisons les relations de définition f (α, β, CE_{10}) = 0,1 et f (α, β, CE_{50}) = 0,5 pour remplacer f (α, β, concentration) par une fonction équivalente g (CE_{10}, CE_{50}, concentration)].

Il existe un calcul plus direct (Andersen et al., 1998) effectué en conservant l'équation d'origine et en appliquant une expansion de Taylor autour des moyennes de r_i et r_0.

Les procédés par *bootstrap*, introduits récemment, sont appréciés. Ces procédés utilisent les données mesurées et un rééchantillonnage fréquent dirigé par un générateur de nombre aléatoire, pour estimer une distribution empirique de la variance.

Bibliographie

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. Water Research, 30, 1625-1632.

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J.(1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. Env. Toxicol. Chem.11, 1485-1494

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics, 3, 405-420.

▼B

C.4. DÉTERMINATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ «FACILE»

PARTIE I. GÉNÉRALITÉS

I.1. INTRODUCTION

Six méthodes d'essai permettant d'évaluer la biodégradabilité facile de produits chimiques en milieu aqueux en aérobiose sont décrites:

a) Disparition du carbone organique dissous (COD) (Méthode C.4-A)

b) Essai de screening modifié de l'OCDE — Disparition du COD — (Méthode C.4-B)

c) Dégagement de dioxyde de carbone (CO_2) (Essai Sturm modifié) (Méthode C.4-C)

d) Respirométrie manométrique (Méthode C.4-D)

e) Fiole fermée (Méthode C.4-E)

f) MITI (ministère de l'industrie et du commerce international — Japon) (Méthode C.4-F)

La partie I contient des considérations d'ordre général ainsi que des considérations communes aux six essais. Les particularités propres à chaque méthode sont décrites dans les parties II à VII. Les annexes contiennent définitions, formules et données de référence.

Un exercice comparatif interlaboratoires de l'OCDE, réalisé en 1988, a montré que ces méthodes donnent des résultats comparables. Toutefois, l'une ou l'autre de ces méthodes peut être préférable en fonction des caractéristiques physiques de la substance.

I.2. CHOIX DE LA MÉTHODE APPROPRIÉE

Il est essentiel, pour choisir la méthode la mieux appropriée, de disposer d'informations concernant la solubilité, la pression de vapeur et les caractéristiques d'adsorption de la substance à étudier. Pour calculer la valeur théorique et/ou vérifier les valeurs mesurées d'un paramètre tel que la DThO, le CO_2Th, le COD, le COT et la DCO (voir annexes I et II), il est nécessaire de connaître la structure chimique ou la formule brute du produit.

Toutes ces méthodes sont applicables aux substances d'essai qui peuvent être dissoutes dans l'eau à des concentrations de 100 mg/l au moins, pourvu qu'elles ne soient ni volatiles ni adsorbables. Dans le cas de produits peu hydrosolubles, volatiles ou adsorbables, les méthodes appropriées sont indiquées dans le tableau 1. La manière de procéder avec les produits faiblement hydrosolubles et les substances volatiles est décrite à l'annexe III. Les substances modérément volatiles peuvent être étudiées à l'aide de la méthode de disparition du COD pourvu que les récipients d'essai contiennent un volume gazeux suffisant et qu'ils soient fermés de manière appropriée. Dans ce cas, un contrôle abiotique doit toutefois être prévu afin de tenir compte de toute perte physique.

▼B

Tableau 1

Limites d'application des méthodes d'essai

Essai	Méthode analytique	Approprié pour les substances qui sont:		
		faiblement solubles	volatiles	adsorbables
Disparition du COD	Carbone organique dissous	—	—	+/-
Screening modifié de l'OCDE	Carbone organique dissous	—	—	+/-
Dégagement de CO_2	Respirométrie: dégagement de CO_2	+	—	+
Respirométrie manométrique	Respirométrie manométrique: consommation d'oxygène	+	+/-	+
Fiole fermée	Respirométrie: oxygène dissous	+/-	+	+
MITI	Respirométrie: consommation d'oxygène	+	+/-	+

L'interprétation des résultats obtenus nécessite des informations sur la pureté de la substance à étudier ou sur les proportions relatives de ses principaux composants, en particulier lorsque ces résultats sont faibles ou marginaux.

Il peut être extrêmement utile de disposer d'informations sur la toxicité du produit à étudier vis-à-vis des bactéries (annexe IV) pour choisir les concentrations d'essai appropriées et interpréter les résultats de biodégradation, notamment lorsque les valeurs sont peu élevées.

I.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

La procédure est contrôlée à l'aide de substances de référence répondant aux critères de biodégradabilité facile. Ces substances sont étudiées parallèlement aux substances d'essai en ajoutant une fiole appropriée à la série normale d'essais.

Les produits chimiques adéquats sont l'aniline (fraîchement distillée), l'acétate de sodium et le benzoate de sodium. Ces produits de référence sont tous dégradés dans les conditions de ces méthodes, même si aucun inoculum n'est délibérément ajouté.

Il avait été suggéré de retenir un produit de référence qui soit facilement biodégradable, mais qui nécessite l'addition d'un inoculum. L'hydrogéno-phtalate de potassium a été proposé mais le bien-fondé de son utilisation reste à démontrer, avant de l'accepter comme substance de référence.

Dans le cas des essais respirométriques, les composés azotés peuvent influencer la consommation d'oxygène du fait de la nitrification (voir les annexes II et V).

I.4. PRINCIPE DES MÉTHODES D'ESSAI

Une solution ou une suspension de la substance à étudier dans un milieu minéral est ensemencée et incubée en aérobiose, dans l'obscurité ou sous lumière diffuse. La quantité de COD due à l'inoculum présente dans la solution d'essai doit être aussi faible que possible par rapport à la quantité de COD provenant de la substance à étudier. L'activité endogène de l'inoculum est estimée en effectuant parallèlement des essais à blanc avec l'inoculum mais sans addition de substance à étudier, quoique l'activité endogène des cellules en présence de la substance ne correspond pas exactement à celle de ce contrôle endogène. Un essai avec une substance de référence est effectué en parallèle pour vérifier le fonctionnement de ces procédures.

▼B

La dégradation est en général suivie par la détermination de paramètres comme le COD, la production de CO_2 ou la consommation d'oxygène et les mesures sont effectuées avec une fréquence suffisante pour permettre l'identification du commencement et de la fin de la biodégradation. Les respiromètres automatiques permettent d'effectuer des mesures en continu. Le COD est parfois mesuré en plus d'un autre paramètre, mais cela n'est généralement le cas qu'au début et à la fin de l'essai. Une analyse chimique spécifique peut également servir à évaluer la dégradation primaire de la substance à étudier et à déterminer la concentration de toutes les substances intermédiaires formées (obligatoire dans l'essai MITI).

L'essai dure normalement 28 jours. Un essai peut cependant être interrompu avant, dès lors que la courbe de biodégradation atteint un plateau qui se prolonge au moins sur trois mesures. Un essai peut également être prolongé au-delà de 28 jours si la courbe montre que la biodégradation a manifestement commencé sans toutefois avoir atteint un palier le 28e jour.

I.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

I.5.1. **Reproductibilité**

En raison de la nature de la biodégradation et de l'hétérogénéité des populations bactériennes utilisées comme inoculum, les mesures doivent être effectuées au moins en double.

On observe souvent que plus la concentration initiale des micro-organismes ajoutés au milieu d'essai est élevée, plus la variation entre les répétitions est faible. Des essais d'intercomparaison ont également montré que des variations importantes peuvent apparaître entre les résultats obtenus dans différents laboratoires, mais les résultats relatifs aux produits de référence facilement biodégradables sont généralement en bonne harmonie.

I.5.2. **Validité de l'essai**

Un essai est considéré comme valable si la différence entre les valeurs extrêmes en double de la mesure de la disparition du produit à étudier, au niveau du plateau, à la fin de l'essai ou à la fin de la fenêtre de 10 jours, est inférieure à 20 % et si le pourcentage de dégradation du produit de référence a atteint le niveau correspondant à une biodégradabilité facile en 14 jours. Si l'une de ces conditions n'est pas remplie, l'essai devra être recommencé. En raison du caractère rigoureux de ces méthodes, un résultat peu élevé ne signifie pas nécessairement que la substance soumise à l'essai n'est pas biodégradable dans les conditions de l'environnement; il indique seulement que d'autres études seront nécessaires pour en faire la preuve.

Si, lors d'un essai de toxicité effectué avec une solution contenant à la fois la substance à étudier et un produit de référence, la dégradation est inférieure à 35 % (établie d'après le COD) ou à 25 % (établie d'après la DThO ou le CO_2Th) au cours des 14 premiers jours, on peut estimer que le produit a un effet inhibiteur (voir également l'annexe IV). La série d'essais doit être recommencée, si possible en utilisant une concentration de substance à étudier plus faible et/ou une concentration d'inoculum plus élevée, sans toutefois dépasser 30 mg/l de matière en suspension.

I.6. PROCÉDURES ET PRÉPARATIONS GÉNÉRALES

Les conditions générales qui s'appliquent aux essais sont résumées dans le tableau 2. Les appareils et les conditions expérimentales spécifiques d'un essai particulier sont décrits ci-après dans les chapitres consacrés à chaque essai.

▼B

Tableau 2

conditions d'essai

Essai	Disparition du COD	Dégagement de CO_2	Respirométrie manométrique	Screening modifié de l'OECD	Fiolé fermée	MITI (1)
Concentration de la substance à étudier						
en: mg/l C			100		2-10	100
mg/l COD	10-40	10-20		10-40		
mg/l DThOD			50-100		5-10	
Concentration de l'inoculum (approximative, en cellules/l)	≤ le; 30 mg/l MES ou ≤ le; 100 ml/l d'effluent (10^7 — 10^8)			0,5 ml/l d'effluent secondaire (10^5)	jusqu'a 5 ml/l d'effluent (10^4 — 10^6)	30 mg/l MES (10^7 — 10^8)
Concentration d'éléments dans le milieu minéral (en mg/l):						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	112				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05 - 0,1				0,05 - 0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					de préférence 7,0
Température	22 ± ºC					25 ± 1 ºC

COD = Carbone Organique Dissout DThOD = Demande Théorique en Oxygène MES = Matières en Suspension

I.6.1. **Eau de dilution**

De l'eau désionisée ou distillée, exempte de substances toxiques à des concentrations inhibitrices (tels que des ions Cu^{++}), est utilisée. Elle ne contient pas plus de 10 % de la quantité de carbone organique introduite par la substance à étudier. L'eau d'essai doit être d'un haut degré de pureté afin d'éviter des valeurs élevées dans les essais à blanc. Des contaminations peuvent provenir non seulement des impuretés inhérentes, mais également des résines échangeuses d'ions et de matières provenant de la lyse des bactéries et des algues. Pour chaque série d'essais, n'utiliser qu'un même lot d'eau dont la teneur en COD doit être analysée au préalable. Une telle analyse n'est pas nécessaire pour l'essai en fiole fermée, mais la consommation en oxygène à partir de l'eau doit être faible.

▼B

I.6.2. **Solutions mères de sels minéraux**

Les solutions de sels minéraux utilisées pour l'essai sont préparées à partir de solutions mères de concentration appropriée. Les solutions mères décrites ci-après peuvent être utilisées (avec différents facteurs de dilution) dans les méthodes de disparition du COD, de screening modifié de l'OCDE, de dégagement de CO_2, de respirométrie manométrique et dans l'essai en fiole fermée.

Les facteurs de dilution et, pour l'essai MITI, la préparation spécifique du milieu minéral sont mentionnés dans les chapitres consacrés à chaque essai.

Solutions mères:

Les solutions mères suivantes sont préparées en utilisant des réactifs de qualité analytique:

a)	Dihydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4	8,50 g
	Monohydrogénophosphate de potassium K_2HPO_4	21,75 g
	Monohydrogénophosphate de sodium dihydraté Na_2HPO_4 $2H_20$	33,40 g
	Chlorure d'ammonium NH_4Cl	0,50 g
	Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre. Le pH de la solution doit être égal à 7,4.	
b)	Chlorure de calcium, anhydre $CaCl_2$	27,50 g
	ou chlorure de calcium dihydraté $CaCl_2$, 2 H_2O	36,40 g
	Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre	
c)	Sulfate de magnésium heptahydraté, $MgSO_4$,7 H_2O	22,50 g
	Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre	
d)	Chlorure de fer (III) hexahydraté, $FeCl_3$, 6 H_2O	0,25 g
	Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre	

Note: Afin d'éviter d'avoir à préparer cette solution immédiatement avant usage, ajouter une goutte d'HCl concentré ou 0,4 g/1 de sel disodique d'acide éthylènediaminetétra-acétique (EDTA).

I.6.3. **Solutions mères de produits chimiques**

Dissoudre, si la solubilité excède 1 g/1, par exemple, entre 1 et 10 g, selon les cas, de substance à étudier ou de substance de référence dans de l'eau désionisée et compléter le volume à 1 litre. Dans le cas contraire, préparer des solutions mères dans du milieu minéral ou ajouter directement le produit au milieu minéral. Dans le cas de substances de plus faible solubilité, se référer à l'annexe III, mais noter que, dans l'essai MITI (Méthode C.4-F), aucun solvant ni émulsifiant ne doit être utilisé.

▼B

I.6.4. **Inoculums**

L'inoculum peut provenir de plusieurs sources: boues activées, effluents non chlorés, eaux de surface, sols, ou encore un mélange de ceux-ci. Pour les essais de disparition du COD, de dégagement de CO_2 et de respirométrie manométrique, si des boues activées sont utilisées, elles doivent provenir d'une station d'épuration ou d'une unité pilote traitant principalement des eaux ménagères. Il a été montré que les inoculums provenant d'autres sources donnent des résultats plus dispersés. Pour l'essai de screening modifié de l'OCDE et l'essai en fiole fermée, il convient d'utiliser un inoculum plus dilué ne contenant pas de flocs de boue et la source la plus appropriée consiste en un effluent secondaire d'une station d'épuration des eaux résiduaires urbaines ou d'une installation à l'échelle du laboratoire. Pour l'essai MITI, l'inoculum, qui provient d'un mélange de plusieurs origines, est décrit dans le chapitre consacré à cet essai.

I.6.4.1. *lnoculum provenant de boues activées*

Recueillir un échantillon de boue activée dans le compartiment d'aération d'une station d'épuration traitant des eaux résiduaires ou d'une installation à l'échelle du laboratoire traitant principalement les eaux ménagères. Éliminer, si nécessaire, les grosses particules par filtration à travers un tamis fin et conserver ensuite la boue en aérobiose.

Une autre possibilité consiste à laisser la boue sédimenter ou à la centrifuger (par exemple à 1 100 g pendant 10 mn) après avoir éliminé toutes les grosses particules. Écarter le surnageant. La boue peut être lavée dans le milieu minéral. Mettre la boue concentrée en suspension dans un milieu minéral de telle sorte que la concentration soit comprise entre 3 et 5 g/1 de matière en suspension. Aérer la suspension jusqu'à son utilisation.

Les boues doivent provenir d'une station conventionnelle fonctionnant bien. Si elles proviennent d'une station d'épuration dont le débit est important ou si elles sont susceptibles de contenir des inhibiteurs, elles doivent être lavées. Laisser sédimenter ou centrifuger la boue remise en suspension par une agitation vigoureuse, écarter le surnageant et remettre la boue lavée en suspension dans un milieu minéral frais. Répéter cette opération jusqu'à ce que l'on puisse considérer que la boue est exempte d'inhibiteur et de substrat en excès.

Prélever un échantillon de boue remise en suspension ou de boue non traitée juste avant son utilisation afin de déterminer le poids sec des matières solides en suspension.

Une autre possibilité consiste à homogénéiser la boue activée (entre 3 et 5 g/l de matière solide en suspension) à l'aide d'un agitateur mécanique pendant 2 minutes à vitesse moyenne. Laisser décanter la boue homogénéisée pendant 30 minutes ou plus si besoin est, et prélever la phase liquide, qui sera utilisée comme inoculum à raison de 10 ml/1 de milieu minéral.

I.6.4.2. *Autres sources d'inoculum*

L'inoculum peut provenir de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire qui reçoit principalement des eaux ménagères. Recueillir un échantillon frais qui doit être maintenu en aérobiose pendant le transport. Laisser reposer pendant une heure ou filtrer à l'aide d'un papier filtre grossier et conserver le surnageant transvasé ou le filtrat en aérobiose jusqu'au moment de son utilisation. On peut utiliser jusqu'à 100 ml de ce type d'inoculum par litre de milieu.

▼B

L'eau de surface peut constituer une autre source d'inoculum. Dans ce cas, recueillir un échantillon d'une eau de surface appropriée, par exemple de rivière ou de lac, et le maintenir en aérobiose jusqu'au moment de son utilisation. Si nécessaire, concentrer l'inoculum par filtration ou par centrifugation.

I.6.5. **Préconditionnement des inoculums**

Les inoculums peuvent être préconditionnés aux conditions expérimentales, mais non préadaptés au produit à étudier. Le préconditionnement consiste à aérer la boue activée dans un milieu minéral, ou l'effluent secondaire pendant une durée de 5 à 7 jours à la température de l'essai. Le préconditionnement permet parfois d'améliorer la précision des méthodes d'essai en réduisant les valeurs dans les essais à blanc. Il est inutile de préconditionner les inoculums destinés à l'essai MITI.

I.6.6. **Contrôles abiotiques**

Rechercher, si nécessaire, une dégradation abiotique éventuelle de la substance à étudier en déterminant la disparition du COD, la consommation d'oxygène ou le dégagement de dioxyde de carbone dans des témoins stériles ne contenant pas d'inoculum. La stérilisation est effectuée par filtration à travers une membrane (0,2 à 0,45 μm) ou par addition d'une substance toxique adéquate à une concentration appropriée. Si la filtration sur membrane est utilisée, prélever les échantillons de façon aseptique pour maintenir la stérilité. À moins que l'adsorption de la substance à étudier ait pu être exclue a priori, des essais où la biodégradation est mesurée par l'élimination de COD doivent comporter, particulièrement lorsqu'il s'agit d'inoculums provenant de boues activées, un témoin abiotique qui sera inoculé et additionné de l'agent stérilisant.

I.6.7. **Nombre de fioles**

Le nombre de fioles d'une série type est précisé dans les chapitres consacrés à ces essais.

Des fioles de type suivant peuvent être utilisées:

— pour la suspension d'essai: contenant la substance à étudier et l'inoculum,

— pour le blanc inoculum: ne contenant que l'inoculum,

— pour le contrôle de la procédure: contenant la substance de référence et l'inoculum,

— pour le témoin abiotique stérile: stérile et ne contenant que le produit à étudier (voir point I.6.6),

— pour le contrôle de l'adsorption: contenant la substance à étudier, l'inoculum et l'agent stérilisant,

— pour le contrôle de toxicité: contenant le produit à étudier, le produit de référence et l'inoculum.

Il est obligatoire de suivre le COD et/ou les autres paramètres parallèlement dans la suspension d'essai et dans l'essai à blanc contenant l'inoculum. Il est souhaitable de suivre également le COD en parallèle dans les autres fioles.

Toutefois, il se peut que cela ne soit pas toujours possible. S'assurer que le nombre d'échantillons ou de lectures est suffisant pour permettre de déterminer le pourcentage de disparition au cours de l'intervalle de temps de 10 jours.

▼B

I.7. ÉVALUATION DES DONNÉES

Le pourcentage de dégradation, D_t, est calculé à l'aide des valeurs moyennes des doubles déterminations du paramètre dans le récipient d'essai et dans le blanc contenant l'inoculum. Les formules sont décrites dans les chapitres consacrés à chaque essai. L'évolution de la dégradation est représentée graphiquement sur un diagramme indiquant l'intervalle de temps de 10 jours. Calculer et mentionner dans le rapport le pourcentage de disparition au terme de l'intervalle de temps de 10 jours et la valeur obtenue au plateau ou à la fin de l'essai, selon les cas.

Dans les essais de respirométrie, des composés contenant de l'azote peuvent affecter la consommation d'oxygène en raison de la nitrification (voir annexes II et V).

I.7.1. **Estimation de la dégradation à l'aide de la détermination du COD**

Pour pouvoir vérifier la validité de l'essai (voir I.5.2), le pourcentage de dégradation (D_t) à chaque instant t de prise d'un échantillon doit être calculé séparément pour les fioles contenant la substance à étudier en utilisant les valeurs moyennes de mesures en double du COD. Il se calcule à l'aide de la formule suivante:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

où:

D_t = % de dégradation au temps t,

C_o = concentration initiale moyenne de COD dans le milieu de culture ensemencé contenant la substance à étudier (mg COD/1),

C_t = concentration moyenne de COD dans le milieu de culture ensemencé contenant la substance à étudier, au temps t (mg COD/I),

C_{bo} = concentration initiale moyenne de COD dans l'essai à blanc (milieu minéral ensemencé) (mg COD/1),

C_{bt} = concentration moyenne de COD dans l'essai à blanc (milieu minéral ensemencé) au temps t (mg COD/1).

Toutes les concentrations sont mesurées expérimentalement.

I.7.2. **Estimation de la dégradation à l'aide d'analyses spécifiques**

Lorsque l'on dispose de données analytiques spécifiques, la biodégradation primaire est calculée grâce à la formule suivante:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

où:

D_t = % de dégradation au temps t, soit normalement le 28^e jour,

S_a = quantité résiduelle de produit soumis à l'essai dans le milieu ensemencé à l'issue de l'essai (mg),

S_b = quantité résiduelle de produit à étudier dans l'essai à blanc constitué d'eau/milieu auquel on aura uniquement ajouté le produit à étudier (mg).

▼B

I.7.3. **Dégradation abiotique**

Lorsqu'on utilise un témoin abiotique stérile, le pourcentage de dégradation abiotique se calcule par la formule:

$$\% \text{ de dégradation abiotique } = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

où:

$C_{s(o)}$ = concentration en COD dans le témoin stérile au temps 0,

$C_{s(t)}$ = concentration en COD dans le témoin stérile au temps t.

I.8. RAPPORT

Le procès-verbal d'essai devra, si possible, comporter les renseignements suivants:

— produits à étudier et produits de référence ainsi que leur degré de pureté,

— conditions de l'essai,

— inoculum: nature et lieu(x) de prélèvement, concentration ainsi que tout traitement de préconditionnement,

— proportion et nature des déchets industriels présents dans les eaux d'égout, si elles sont connues,

— durée et température de l'essai,

— dans le cas où les produits à étudier sont faiblement solubles, le traitement appliqué,

— méthode d'essai appliquée; il convient de fournir les raisons scientifiques et l'explication de toute modification du mode opératoire,

— fiche de données,

— tout phénomène d'inhibition observé,

— toute dégradation abiotique observée,

— les données concernant les analyses chimiques spécifiques, si elles sont disponibles,

— les données concernant les analyses de substances intermédiaires, si elles sont disponibles,

— la courbe représentant le pourcentage de dégradation en fonction du temps pour les substances soumises à l'essai et les substances de référence; la phase de latence, la phase de dégradation, l'intervalle de temps de 10 jours et la pente doivent être clairement indiqués (annexe I). Si l'essai a satisfait les critères de validité, on peut utiliser la moyenne des pourcentages de dégradation des fioles contenant la substance à étudier pour la courbe,

— le pourcentage de disparition à l'issue de l'intervalle de temps de 10 jours et au plateau ou à la fin de l'essai.

PARTIE II. **ESSAI DE DISPARITION DU COD** (Méthode C.4.-A)

II.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Un volume mesuré de milieu minéral ensemencé, contenant une concentration connue de substance à étudier (10 à 40 mg/l de COD) comme seule source de carbone organique, est aéré dans l'obscurité ou sous une lumière diffuse, à 22 ± 2 °C.

▼B

La dégradation est suivie en analysant le COD à des intervalles fréquents pendant une durée de 28 jours. Le degré de biodégradation est calculé en exprimant la concentration de COD disparu (à laquelle on apportera une correction correspondant à la concentration de COD disparu dans l'essai à blanc contenant l'inoculum) en pourcentage de la concentration initiale. Le taux de biodégradation primaire peut également être calculé à partir d'analyses chimiques supplémentaires effectuées au début et à la fin de l'incubation.

II.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

II.2.1 **Appareillage**

a) des fioles coniques, d'une contenance comprise, par exemple, entre 250 ml et 2 1, selon le volume requis pour l'analyse du COD;

b) un dispositif d'agitation adapté aux fioles coniques, soit muni d'un système automatique de contrôle de température, soit placé dans une pièce thermostatée, et permettant de maintenir des conditions d'aérobiose dans toutes les fioles;

c) un dispositif de filtration équipé des membranes adéquates;

d) un analyseur du carbone organique dissous;

e) un appareil de mesure de l'oxygène dissous;

f) une centrifugeuse.

II.2.2. **Préparation du milieu minéral**

Pour la préparation de la solution mère, voir I.6.2.

Mélanger 10 ml de solution a) avec 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions b) à d) et compléter le volume à 1 l avec l'eau de dilution.

II.2.3. **Préparation et préconditionnement de l'inoculum**

L'inoculum peut provenir de plusieurs sources: boues activées, effluents, eaux de surface, sols ou d'un mélange de celles-ci.

Voir I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 et I.6.5.

II.2.4. **Préparation des fioles**

Exemple: verser un volume de 800 ml de milieu minéral par fiole conique de 2 1 et ajouter dans des fioles distinctes un volume suffisant de solution mère de substance d'essai ou de substance de référence pour que la concentration de la substance corresponde à une concentration en COD comprise entre 10 et 40 mg/l. Vérifier le pH et l'ajuster, si nécessaire, à une valeur de 7,4. Ensemencer les flacons avec de la boue activée ou avec un inoculum provenant d'une autre source (voir I.6.4.), de telle sorte que la concentration finale n'excède pas 30 mg/l de matière solide en suspension. Préparer également des témoins constitués de milieu minéral contenant l'inoculum mais sans substance d'essai ni substance de référence.

Ajouter, si nécessaire, une fiole pour la détection d'un éventuel effet inhibiteur de la substance d'essai. Pour cela, ensemencer une solution contenant des concentrations, à la fois de produit à étudier et de produit de référence, identiques à celles des autres fioles.

Ajouter, si besoin est, une fiole supplémentaire stérile, contenant une solution de produit non ensemencée afin de vérifier si la substance soumise à l'essai subit une dégradation abiatique (voir I.6.6).

▼B

De surcroît, si le produit à étudier est suspecté de s'adsorber de manière importante sur le verre, la boue, etc., il convient d'effectuer des mesures préliminaires permettant d'évaluer l'importance probable de cette adsorption et par conséquent de déterminer si l'essai convient pour la substance concernée (voir tableau 1). Préparer une fiole contenant la substance à étudier, l'inoculum et l'agent stérilisant.

Compléter le volume à 1 l dans toutes les fioles, avec le milieu minéral, mélanger, puis prélever un échantillon dans chaque fiole afin de déterminer la concentration initiale de COD (voir annexe II.4). Couvrir l'ouverture des fioles, par exemple avec du papier d'aluminium, de telle sorte que les échanges gazeux puissent s'effectuer librement entre la fiole et l'atmosphère environnante. Commencer ensuite l'essai en plaçant les fioles dans le dispositif d'agitation.

II.2.5. **Nombre de fioles d'une série type**

Fioles 1 et 2: suspension, d'essai

Fioles 3 et 4: blanc inoculum

Fiole 5: contrôle de la procédure

et de préférence et si nécessaire:

Fiole 6: témoin abiotique stérile

Fiole 7: contrôle de l'adsorption

Fiole 8: témoin de toxicité

Voir également I.6.7.

II.2.6. **Déroulement de l'essai**

Pendant l'essai, les concentrations de COD font l'objet de doubles déterminations à des intervalles de temps définis, suffisamment fréquents pour permettre de déterminer le début de l'intervalle de temps de 10 jours et le pourcentage de disparition au terme de cette période. Pour chaque détermination, il ne faut prélever que le volume de suspension d'essai strictement nécessaire.

Avant chaque prélèvement, le cas échéant, compenser les pertes dues à l'évaporation dans les fioles par ajout de la quantité nécessaire d'eau de dilution (I.6.1). Avant de prélever un échantillon, le milieu de culture est soigneusement mélangé et les substances adhérant aux parois du récipient doivent être dissoutes ou mises en suspension. Les échantillons sont immédiatement filtrés à travers une membrane ou centrifugés (voir annexe II.4); ils sont analysés le jour même; si tel n'est pas le cas, il faut les conserver entre 2 et 4 °C pendant un maximum de 48 heures, ou au-dessous de — 18 °C au-delà de 48 heures.

II.3. RÉSULTATS ET RAPPORT

II.3.1. **Traitement des résultats**

Calculer le pourcentage de dégradation au temps t, selon les indications figurant au point I.7.1 (détermination du COD) et, éventuellement, au point I.7.2 (analyse spécifique facultative).

Reporter tous les résultats sur les fiches de données fournies.

▼B

II.3.2. **Validité des résultats**

Voir I.5.2.

II. **3.3. Rapport**

Voir I.8.

II.4. FICHE DE DONNÉES

Un exemple de fiche de données est fourni ci-dessous.

ESSAI DE DISPARITION DU COD

1. **LABORATOIRE**

2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI**

3. **SUBSTANCE À ÉTUDIER**

Nom:

Concentration de la solution mère: …mg/l produit

Concentration initiale dans le milieu, t_o: …mg/l produit

4. **INOCULUM**

Origine:

Traitement:

Préconditionnement éventuel:

Concentration des matières solides en suspension dans le mélange réactionnel: mg/l

5. **DÉTERMINATION DU CARBONE**

Analyseur de carbone:

	Fiole nº		COD après n jours (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Substance à étudier plus inoculum	1	a_1					
		a_2					
		a, moyenne $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, moyenne $C_{b(t)}$					

▼B

	Fiole nº		COD après n jours (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Essai à blanc avec l'inoculum et sans substance à étudier	3	C_1					
		C_2					
		c, moyenne $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, moyenne $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ÉVALUATION DES DONNÉES BRUTES**

Fiole nº		% de dégradat. après n jours				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Moyenne (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Lorsque la différence entre les valeurs de D_1 et D_2 est trop grande, il ne faut pas calculer leur moyenne.

Note: Des tableaux similaires peuvent être utilisés pour les produits de référence et les témoins de toxicité.

7. **CONTRÔLE ABIOTIQUE** (facultatif)

	Durée (en jours)	
	0	t
Concentration de COD (mg/l) dans le témoin stérile	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ de dégradation abiotique } = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANALYSE SPÉCIFIQUE** (facultative)

	quantité résiduelle de substance à étudier	% de dégradation primaire
Témoin stérile	S_b	

▼B

	quantité résiduelle de substance à étudier	% de dégradation primaire
Milieu d'essai contaminé	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTIE III. **ESSAI DE SCREENING MODIFIÉ DE L'OCDE** (Méthode C.4-B)

III.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Un volume mesuré de milieu minéral contenant une concentration connue de substance à étudier (de 10 à 40 mg/l COD) comme unique source de carbone organique est ensemencé avec un volume de 0,5 ml d'effluent par litre de milieu. Le mélange est aéré à 22 ± 2 °C dans l'obscurité ou sous une lumière diffuse.

La dégradation est suivie grâce à l'analyse du COD à des intervalles rapprochés pendant une période de 28 jours. Le taux de biodégradation est calculé en exprimant la concentration en COD disparu (corrigé en fonction de la quantité de COD disparu dans l'essai à blanc avec l'inoculum) en pourcentage de la concentration initiale. Le taux de dégradation primaire peut également être calculé à partir d'analyses chimiques supplémentaires effectuées au début et à la fin de l'incubation.

III.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

III.2.1. Appareillage

a) des fioles coniques, d'une contenance comprise, par exemple, entre 250 ml et 2 1, selon le volume requis pour l'analyse du COD;

b) un dispositif d'agitation adapté aux fioles coniques, soit muni d'un système automatique de contrôle de température, soit placé dans une pièce thermostatée, et permettant de maintenir des conditions d'aérobiose dans toutes les fioles;

c) un appareillage de filtration, accompagné des membranes adéquates;

d) un analyseur du carbone organique dissous;

e) un appareil de mesure de l'oxygène dissous;

f) une centrifugeuse.

III.2.2. **Préparation du milieu minéral**

Pour la préparation de la solution mère, voir I.6.2.

Mélanger 10 ml de solution a) avec 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions b) à d) et compléter le volume à 1 1 avec de l'eau de dilution.

Cette méthode ne nécessitant que 0,5 ml/1 d'effluent comme inoculum, le milieu doit par conséquent être enrichi en oligoéléments et facteurs de croissance. On ajoute pour cela 1 ml de chacune des solutions ci-après par litre de milieu final.

▼B

Solution d'oligoéléments:

Sulfate de manganèse tétrahydraté, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Acide borique, H_3BO_3	57,2 mg
Sulfate de zinc heptahydraté, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Heptamolybdate d'ammonium $(NH_4)_6 MO_7O_{24}$	34,7 mg
Fer-chélaté ($FeCl_3$, EDTA)	100,0 mg

Dissoudre et compléter le volume à 1 l avec l'eau de dilution.

Solution de vitamines:

Extrait de levure	15,0 mg

Dissoudre l'extrait de levure dans 100 ml d'eau. Stériliser par passage à travers une membrane de porosité de 0,2 nm ou préparer une solution fraîche.

III.2.3. **Préparation et préconditionnement de l'inoculum**

L'inoculum provient de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une unité pilote qui reçoit essentiellement des eaux ménagères. Voir I.6.4.2 et I.6.5.

On en utilise 0,5 ml par litre de milieu minéral.

III.2.4. **Préparation des fioles**

Exemple: verser un volume de 800 ml de milieu minéral par fiole conique de 2 1 et ajouter dans des fioles distinctes des volumes de solution mère de substance à étudier et de substance de référence tels que la concentration du produit soit comprise entre 10 et 40 mg/l de COD. Vérifier le pH et l'ajuster, si nécessaire, à une valeur de 7,4. Ensemencer les fioles avec un volume de 0,5 ml/1 d'effluent d'eau d'égout (voir I.6.4.2). Préparer également des témoins en ajoutant l'inoculum au milieu minéral, mais sans addition de substance d'essai ou de substance de référence.

Ajouter, si nécessaire, une fiole pour mesurer un éventuel effet inhibiteur de la substance à étudier. Pour cela, ensemencer une solution contenant des concentrations de produit à étudier et de produit de référence identiques à celles des autres fioles.

Ajouter également, si besoin est, une fiole supplémentaire, stérile, contenant une solution de substance non ensemencée afin de vérifier si la substance à étudier subit une dégradation abiotique (voir I.6.6).

De surcroît, si le produit à étudier est suspecté de s'adsorber de manière importante sur le verre, la boue, etc., il convient d'effectuer des mesures préliminaires permettant de déterminer l'importance vraisemblable de l'adsorption et d'évaluer par conséquent si l'essai convient pour la substance concernée (voir tableau 1). Préparer une fiole contenant la substance à étudier, l'inoculum et l'agent stérilisant.

Compléter le volume à 1 l dans toutes les fioles, avec le milieu minéral, mélanger, puis prélever un échantillon dans chaque flacon afin de déterminer la concentration initiale de COD (voir annexe II.4). Recouvrir les fioles avec une feuille d'aluminium, par exemple, de telle sorte que les échanges gazeux puissent s'effectuer librement entre la fiole et l'atmosphère environnante. Commencer ensuite l'essai en plaçant les récipients dans le dispositif d'agitation.

▼B

III.2.5. **Nombre de fioles d'une série type**

Fioles 1 et 2: suspension d'essai

Fioles 3 et 4: blanc inoculum

Fiole 5: contrôle de la procédure

et de préférence et si besoin est:

Fiole 6: témoin abiotique stérile

Fiole 7: contrôle de l'adsorption

Fiole 8: témoin de toxicité

Voir également I.6.7.

III.2.6. **Déroulement de l'essai**

Au cours de l'essai, les concentrations de COD dans chaque fiole font l'objet d'une double détermination à des intervalles de temps définis, suffisamment fréquents pour permettre de déterminer le début de l'intervalle de temps de 10 jours et le pourcentage de disparition au terme de cette période. Pour chaque détermination, il ne faut prélever que le volume strictement nécessaire.

Avant chaque prélèvement, le cas échéant, compenser les pertes dues à l'évaporation dans les fioles par ajout de la quantité nécessaire d'eau de dilution (I.6.1). Avant de prélever un échantillon, le milieu de culture est soigneusement mélangé et les substances adhérant aux parois des récipients sont dissoutes ou mises en suspension. Les échantillons sont immédiatement filtrés à travers une membrane ou centrifugés (voir annexe II.4). Ils sont analysés le jour même, si tel n'est pas le cas, il faut les conserver entre 2 et 4 °C pendant un maximum de 48 heures, ou au-dessous de — 18 °C au-delà de 48 heures.

III.3. RÉSULTATS ET RAPPORT

III.3.1. **Traitement des résultats**

Calculer le pourcentage de dégradation au temps t, selon les indications figurant au point I.7.1 (détermination du COD) et, éventuellement, au point I.7.2 (analyse spécifique facultative).

Reporter tous les résultats sur les fiches de données fournies.

III.3.2. Validité des résultats

Voir I.5.2.

III. 3.3. Rapport

Voir I.8.

III.4. FICHE DE DONNÉES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-après.

ESSAI DE TRIAGE DE L'OCDE MODIFIÉ

1. **LABORATOIRE**

2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI**

▼B

3. **SUBSTANCE À ÉTUDIER**

Nom:

Concentration de la solution mère: mg/l produit

Concentration initiale dans le milieu, t_o: mg/l produit

4. **INOCULUM**

Origine:

Traitement:

Préconditionnement éventuel:

Concentration des matières solides en suspension dans le mélange réactionnel: mg/l

5. **DÉTERMINATION DU CARBONE**

Analyseur de carbone:

	Fiole nº		COD après n jours (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Substance à étudier plus inoculum	1	a_1					
		a_2					
		a, moyenne $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, moyenne $C_{b(t)}$					
Essai à blanc avec l'inoculum et sans substance à étudier	3	C_1					
		C_2					
		c, moyenne $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, moyenne $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ÉVALUATION DES DONNÉES BRUTES**

Fiole nº		% de dégradat. après n jours				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Fiole n°		% de dégradat. après n jours				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Moyenne (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Il ne faut pas calculer la moyenne de D_1 et D_2 lorsque la différence entre leurs valeurs est trop grande.

Note: Des tableaux similaires peuvent être utilisés pour les produits de référence et les témoins de toxicité.

7. **CONTRÔLE ABIOTIQUE** (facultatif)

	Durée (en jours)	
	0	t
Concentration de COD (mg/l) dans le témoin stérile	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ de dégradation abiotique } = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANALYSE SPÉCIFIQUE** (facultative)

	quantité résiduelle de substance à étudier	% de dégradation primaire
Témoin stérile	S_b	
Milieu d'essai contaminé	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTIE IV. ESSAI DE DÉGAGEMENT DE **CO_2** (Méthode C.4-C)

IV.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Un volume mesuré de milieu minéral ensemencé, contenant une concentration connue de la substance à étudier (10 à 20 mg/l de COD ou de COT) comme seule source de carbone organique, est aéré par le passage d'air exempt de dioxyde de carbone, à un débit contrôlé et dans l'obscurité ou en lumière diffuse. La dégradation est suivie pendant une durée de 28 jours en déterminant le dioxyde de carbone produit, qui est piégé par de l'hydroxyde de sodium ou de baryum et mesuré par titration de l'hydroxyde résiduel ou en tant que carbone inorganique. La quantité de dioxyde de carbone produite à partir de la substance à étudier (corrigée en fonction de la quantité produite dans l'essai à blanc avec l'inoculum) est exprimée en pourcentage du CO_2Th. Le taux de biodégradation peut également être calculé à partir d'analyses supplémentaires du COD effectuées au début et à la fin de l'incubation.

▼B

IV.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

IV.2.1. **Appareillage**

a) des fioles d'une contenance de 2 à 5 litres, munies d'un tube d'aération atteignant presque le fond du récipient et d'un orifice de sortie;

b) des agitateurs magnétiques pour les essais avec des substances peu solubles;

c) des flacons absorbeurs de gaz;

d) un dispositif de contrôle et de mesure du débit d'air;

e) un appareil de lavage du dioxyde de carbone, permettant d'obtenir de l'air exempt de dioxyde de carbone; une autre possibilité consiste à utiliser un mélange d'oxygène et d'azote exempts de CO_2, provenant de bouteilles de gaz, dans des proportions adéquates (20 % O_2, 80 % N_2);

f) un dispositif de mesure du dioxyde de carbone, soit par titrimétrie, soit à l'aide d'un analyseur de carbone inorganique quelconque;

g) un dispositif de filtration sur membrane (facultatif);

h) un analyseur de COD (facultatif).

IV.2.2. **Préparation du milieu minéral**

Pour la préparation des solutions mères, voir I.6.2.

Mélanger 10 ml de solution a) et 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions b) à d) et compléter le volume à 1 l avec l'eau de dilution.

IV.2.3. **Préparation et préconditionnement de l'inoculum**

L'inoculum peut provenir de plusieurs sources: boues activées — effluents — eaux de surface — sols — ou d'un mélange de celles-ci.

Voir I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 et I.6.5.

IV.2.4. **Préparation des fioles**

Les volumes et poids cités ci-après à titre d'exemple indiquent des valeurs correspondant à des fioles de 5 l contenant 3 1 de suspension. Si de plus petits volumes sont utilisés, il convient de modifier les valeurs en conséquence, mais en s'assurant que le dioxyde de carbone formé peut être mesuré avec précision.

Verser 2 400 ml de milieu minéral dans chaque fiole de 5 1. Ajouter un volume approprié de boue activée préparée au préalable (voir I.6.4.1 et I.6.5) tel que la concentration des matières en suspension n'excède pas 30 mg/l dans le volume final de 3 1 de mélange ensemencé. Une autre possibilité consiste à diluer d'abord la boue préparée jusqu'à obtention d'une suspension de 500 à 1 000 mg/l dans le milieu minéral, puis à ajouter une partie aliquote de cette suspension dans la fiole de 5 1, de manière à atteindre une concentration de 30 mg/l; cette méthode permet une plus grande précision. On peut utiliser des inoculums d'origines différentes (voir I.6.4.2).

Éliminer le dioxyde de carbone du mélange ensemencé par barbotage d'air exempt de CO_2, pendant une nuit.

▼B

Ajouter séparément des volumes connus de solutions mères de la substance d'essai et de la substance de référence dans des fioles préparées en double, de telle sorte que la concentration de COD ou de COT, provenant des substances ajoutées, soit comprise entre 10 et 20 mg/l; conserver quelques fioles sans addition de substance comme témoins d'ensemencement. Si la substance à étudier est peu soluble, il convient d'ajouter directement un poids ou un volume défini, ou de procéder selon les indications données à l'annexe III.

Ajouter, si nécessaire, une fiole pour mesurer un éventuel effet inhibiteur de la substance à étudier. Pour cela, ensemencer une solution contenant des concentrations du produit à étudier et du produit de référence identiques à celles des autres fioles.

Ajouter également, si besoin est, une fiole supplémentaire stérile, contenant une solution de produit non ensemencée afin de vérifier si la substance d'essai subit une dégradation abiotique (voir I.6.6). Stériliser par addition d'une substance toxique à une concentration appropriée.

Compléter le volume des suspensions à 3 litres, dans toutes les fioles, avec le milieu minéral aéré au préalable au moyen d'air exempt de CO_2. Des échantillons peuvent (facultatif) être prélevés afin d'analyser le COD (voir annexe II.4) et/ou d'effectuer une analyse spécifique. Relier les flacons absorbeurs à l'orifice de sortie d'air des fioles.

Si l'on utilise de l'hydroxyde de baryum, à chacune des fioles de 5 litres, relier en série trois flacons absorbeurs, contenant chacun 100 ml d'une solution 0,0125 M d'hydroxyde de baryum. La solution ne doit contenir ni sulfate ni carbonate précipité et il convient d'en déterminer la teneur juste avant son utilisation. Si l'on utilise de l'hydroxyde de sodium, relier deux pièges, le second servant de contrôle pour montrer que tout le dioxyde de carbone a été absorbé dans le premier. On pourra utiliser des flacons absorbeurs munis de systèmes de fermeture pour flacons de sérum. Ajouter dans chaque flacon 200 ml d'hydroxyde de sodium 0,05 M, ce qui suffit à absorber la totalité du dioxyde de carbone dégagé lors de la dégradation complète de la substance à étudier. La solution d'hydroxyde de sodium, même fraîchement préparée, contiendra des traces de carbonate; il convient donc d'effectuer une correction en déduisant la quantité de carbonate présente dans le témoin.

IV.2.5. **Nombre de fioles d'une série type**

Fioles 1 et 2: suspension d'essai

Fioles 3 et 4: blanc inoculum

Fiole 5: contrôle de la procédure

et de préférence et si nécessaire:

Fiole 6: témoin abiotique stérile

Fiole 7: témoin de toxicité

Voir également I.6.7.

IV.2.6. **Déroulement de l'essai**

Commencer l'essai en faisant barboter de l'air exempt de CO_2 dans les suspensions à un débit de 30-100 ml/min. Prélever régulièrement des échantillons de l'absorbant de dioxyde de carbone pour en analyser la teneur en CO_2. Il est conseillé d'effectuer des analyses tous les deux ou trois jours pendant les dix premiers jours, puis ensuite tous les cinq jours jusqu'au 28^{e} jour de telle sorte que l'intervalle de temps de 10 jours puisse être identifié.

▼B

Le 28e jour, prélever des échantillons (facultatif) pour analyser le COD et/ou effectuer une analyse spécifique, mesurer le pH des suspensions et ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré à chaque fiole; aérer la fiole pendant une nuit pour éliminer le dioxyde de carbone présent dans la suspension d'essai. Le 29e jour, analyser pour la dernière fois le dégagement de dioxyde de carbone.

Les jours où l'on effectue les mesures de CO_2, détacher le flacon absorbeur contenant de l'hydroxyde de baryum le plus proche de la fiole d'essai et titrer la solution d'hydroxyde de baryum à l'aide d'HCl 0,05 M en utilisant la phénolphtaléine comme indicateur. Rapprocher les autres flacons absorbeurs en les décalant d'une place et introduire un nouveau flacon absorbeur contenant 100 ml d'hydroxyde de baryum 0,0125 M frais à l'extrémité de la série. Effectuer les titrations nécessaires, par exemple lorsqu'une précipitation importante se produit dans le premier piège et avant qu'elle n'apparaisse dans le second, ou au moins une fois par semaine. Une autre possibilité consiste à utiliser le NaOH comme absorbant et à prélever à l'aide d'une seringue un échantillon de faible volume (en fonction du type d'analyseur de carbone utilisé) de la solution d'hydroxyde de sodium qui se trouve dans le flacon absorbeur le plus proche de la fiole. Injecter l'échantillon dans la partie CI de l'analyseur de carbone pour analyser directement le dioxyde de carbone dégagé.

N'analyser le contenu du second piège qu'à la fin de l'essai afin d'apporter une correction correspondant à tout passage de dioxyde de carbone dans ce piège.

IV.3. RÉSULTATS ET RAPPORT

IV.3.1. **Traitement des résultats**

Lorsqu'une titration est effectuée, la quantité de CO_2 piégée dans un flacon absorbeur est calculée à l'aide de la formule suivante:

$$\text{mg } CO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

où:

V = volume de HC1 utilisé pour la titration des 100 ml contenus dans le flacon absorbeur (ml),

C_B = concentration de la solution d'hydroxyde de baryum (M),

C_A = concentration de la solution d'acide chlorhydrique (M),

si C_B est 0,0125 M et C_A est 0,05 M, la titration d'un volume de 100 ml d'hydroxyde de baryum est de 50 ml et le poids de CO_2 est donné par la formule suivante:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ ml d'HCl titré} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

Ainsi, dans ce cas, le facteur permettant de convertir le volume d'HCl titré en mg de CO_2 est égal à 1,1.

Calculer le poids de CO_2 produit par l'inoculum seul et par l'inoculum plus la substance à étudier à l'aide des valeurs de titration obtenues dans les deux cas; la différence correspond au poids de CO_2 produit à partir de la substance à étudier seule.

Exemple: si la titration du flacon absorbeur correspondant à l'inoculum seul nécessite un volume de 48 ml et celui du flacon correspondant à l'inoculum additionné à la substance, un volume de 45 ml:

CO_2 de l'inoculum = 1,1 × (50-48) = 2,2 mg

▼B

CO_2 de l'inoculum plus substance à étudier = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg

et par conséquent le poids de CO_2 produit à partir de la substance à étudier est égal à 3,3 mg.

Le pourcentage de dégradation est calculé à l'aide de la formule suivante:

$$\% \text{ de dégradation } = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ produit} \times 100}{CO_2\text{Th} \times \text{mg substance àétudier ajoutée}}$$

ou

$$\% \text{ de dégradation } = \frac{\text{mg } CO_2 \times 100}{\text{mg de COT ajouté dans l'essai} \times 3,67}$$

où 3,67 est le facteur de conversion (44/12) du carbone en dioxyde de carbone.

Calculer le pourcentage de dégradation après un temps déterminé en effectuant la somme des pourcentages de CO_2Th calculés pour chaque jour où des mesures ont été effectuées pendant la période considérée.

Lorsque l'absorbant utilisé est de l'hydroxyde de sodium, calculer la quantité de dioxyde de carbone produite, exprimée en CI (mg), en multipliant la concentration en CI dans l'absorbant par le volume de ce dernier.

Calculer le pourcentage de dégradation à l'aide de la formule suivante:

$$\% \ CO_2\text{Th } = \frac{\text{mg CI de la fiole d'essai } - \text{ mg CI de la fiole témoin}}{\text{mg de COT ajouté sous forme de substance d'essai}} \times 100$$

Calculer la disparition du COD (facultatif) comme décrit au point I.7. Consigner ces résultats, ainsi que tout autre résultat, sur les fiches de données fournies.

IV.3.2 **Validité des résultats**

La teneur en CI de la suspension de substance à étudier en milieu minéral au début de l'essai doit être inférieure à 5 % du CT, et le dégagement total de CO_2 dans l'essai à blanc contenant l'inoculum ne doit normalement pas excéder 40 mg/l de milieu à la fin de l'essai. Si les valeurs obtenues sont supérieures à 70 mg/l de CO_2, les données et le protocole expérimental doivent être soumis à un examen critique.

Voir également I.5.2.

IV. **3.3 Rapport**

Voir I.8.

IV.4. FICHE DE DONNÉES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-dessous.

ESSAI DE DÉGAGEMENT DE DIOXYDE DE CARBONE

1. **LABORATOIRE**

2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI**

3. **SUBSTANCE À ÉTUDIER**

Nom:

Concentration de la solution mère: mg/l produit

▼B

Concentration initiale dans le milieu: mg/l produit

Carbone total ajouté dans la fiole: mg/l

CO_2Th: mg CO_2

4. **INOCULUM**

Origine:

Traitement:

Préconditionnement éventuel:

Concentration des matières solides en suspension dans le mélange réactionnel: mg/l

5. **PRODUCTION DE DIOXYDE DE CARBONE ET DÉGRADABILITÉ**

Méthode: $Ba(OH)_2$NaOH/autre

Temps (jours)	CO_2 formé Essai (mg)		CO_2 formé blanc (mg)		CO_2 formé cumulé (mg) (essai moins blanc)		% CO_2Th $\frac{CO_2 \text{cumulé}}{CO_2\text{Th}} \times 100$		
	1 / 2	moy.	3 / 4	moy.	1	2	1	2	moy.
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Note: Des tableaux de ce type peuvent être utilisés pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

6. **DÉTERMINATION DU CARBONE** (facultative)

Analyseur de carbone: ...

Temps (jours)	Blanc mg/l	Produit à étudier mg/l
0	$C_{b(o)}$	c_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	c_t

(*) ou à la fin de l'incubation

▼B

$$\% \text{ de COD éliminé } = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **DÉGRADATION ABIOTIQUE** (facultative)

$$\% \text{ dégrad. abiot. } = \frac{\text{Format. de } CO_2 \text{ d. la fiole stérile ap. 28 jours (mg)}}{CO_2\text{Th (mg)}} \times 100$$

PARTIE V. **ESSAI DE RESPIROMÉTRIE MANOMÉTRIQUE** (Méthode C.4-D)

V.l. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Un volume mesuré de milieu minéral ensemencé, contenant une concentration connue de la substance d'essai (100 mg/l de substance d'essai, de telle sorte que la DThO soit au moins comprise entre 50 et 100 mg/l au moins) comme seule source de carbone organique, est agité en fiole fermée, à température constante (± 1 °C au maximum) pendant une durée maximale de 28 jours. La consommation d'oxygène est déterminée soit en mesurant la quantité d'oxygène (produit par électrolyse) nécessaire pour maintenir un volume gazeux constant dans la fiole respirométrique, soit en se basant sur les modifications de volume ou de pression (ou sur une combinaison des deux) dans l'appareil. Le dioxyde de carbone produit est absorbé par une solution d'hydroxyde de potassium ou par un autre absorbant approprié. La quantité d'oxygène consommée par la substance à étudier (après une correction correspondant à la quantité d'oxygène consommée par le témoin inoculum, analysée parallèlement) est exprimée en pourcentage de DThO ou de DCO. Facultativement, la biodégradation primaire peut également être calculée à partir d'analyses supplémentaires du COD effectuées au début et à la fin de l'incubation, et la biodégradation ultime par la mesure du COD.

V.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

V.2.1. **Appareillage**

a) un respiromètre approprié,

b) un dispositif de régulation de température d'une précision de ± 1 °C au moins,

c) un dispositif de filtration sur membrane (facultatif),

d) un analyseur de carbone (facultatif).

V.2.2. **Préparation du milieu minéral**

Pour la préparation des solutions mères, voir I.6.2.

Mélanger 10 ml de solution (a) et 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions (b) à (d) et compléter le volume à un litre avec l'eau de dilution.

V.2.3. **Préparation et préconditionnement de l'inoculum**

L'inoculum peut provenir de plusieurs sources: boues activées — effluents — eaux de surface — sols — ou d'un mélange de celles-ci.

Voir I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. et I.6.5.

V.2.4. **Préparation des fioles**

À partir des solutions mères, préparer différents lots de solutions de substance d'essai et de substance de référence dans du milieu minéral, normalement à une concentration de 100 mg/l de substance (ce qui donne une DThO comprise, au moins, entre 50 et 100 mg/l).

▼B

Calculer la DThO à partir de la formation de sels d'ammonium, à moins qu'un processus de nitrification ne soit prévisible, auquel cas le calcul reposera sur la formation de nitrate (voir annexe II.2.)

Mesurer le pH et, le cas échéant, l'ajuster à 7,4 ± 0,2.

Les substances faiblement solubles doivent être ajoutées lors d'une étape ultérieure (voir ci-après).

S'il convient de déterminer la toxicité de la substance à étudier, préparer une solution de milieu minéral supplémentaire contenant à la fois la substance de référence et le produit à étudier aux mêmes concentrations que dans les solutions ne contenant que l'un des produits.

Dans le cas où il est nécessaire de mesurer la consommation physico-chimique d'oxygène, préparer une solution de produit à étudier, dont la concentration corresponde normalement à une DThO de 100 mg/l, stérilisée par l'addition d'une substance toxique appropriée (voir I.6.6).

Ajouter dans deux fioles, au moins, le volume requis de solution d'essai et dans deux autres, au moins, le volume adéquat de solution de référence. Préparer d'autres fioles ne contenant que du milieu minéral (pour les témoins inoculum) et, le cas échéant, la solution de mélange produit à étudier/substance de référence et la solution stérile.

Si la substance à étudier est peu soluble, en ajouter un poids ou un volume déterminé, directement à ce stade, ou suivre le mode opératoire décrit à l'annexe III. Ajouter de l'hydroxyde de potassium, de la chaux sodée ou un autre absorbant dans les compartiments d'absorption du CO_2.

V.2.5. **Nombre de fioles d'une série type**

Fioles 1 et 2: suspension d'essai

Fioles 3 et 4: blanc inoculum

Fiole 5: contrôle de la procédure de préférence,

et si nécessaire:

Fiole 6: témoin stérile

Fiole 7: témoin de toxicité

Voir également I.6.7.

V.2.6. **Déroulement de l'essai**

Laisser les récipients atteindre la température souhaitée. Ensemencer les récipients appropriés avec les boues activées préparées au préalable ou avec un inoculum provenant d'une autre source, de telle sorte que la concentration des matières solides en suspension ne dépasse pas 30 mg/l. Assembler le matériel, mettre l'agitateur en marche, vérifier l'étanchéité à l'air et commencer à mesurer la consommation d'oxygène. Le déroulement de l'essai ne nécessite normalement aucune attention particulière en dehors des lectures et des vérifications quotidiennes permettant de s'assurer que la température et l'agitation appropriées sont maintenues.

Calculer la consommation d'oxygène à partir des lectures effectuées à intervalles réguliers et rapprochés en suivant la méthode fournie par le fabriquant du matériel utilisé. A la fin de l'incubation, qui est normalement de 28 jours, mesurer le pH dans les fioles, en particulier si la consommation d'oxygène est faible ou supérieure à la $DThO_{NH4}$ (pour les composés azotés).

▼B

Prélever, si nécessaire, des échantillons dans les fioles du respiromètre, au début et à la fin de l'essai, pour analyser le COD ou effectuer un dosage spécifique (voir annexe II.4.). Lors du premier prélèvement, noter le volume de suspension d'essai restant dans la fiole. Si la substance à étudier contient de l'azote, déterminer l'augmentation de la concentration de nitrite et de nitrate au cours de ces 28 jours et calculer la correction relative à la consommation d'oxygène due à la nitrification (annexe V).

V.3. RÉSULTATS ET RAPPORT

V.3.1. **Traitement des résultats**

Diviser la consommation d'oxygène (mg) de la substance à étudier après une période donnée (après correction due à l'oxygène consommé dans l'essai à blanc contenant l'inoculum pendant une période identique) par le poids de substance utilisé. Le résultat, exprimé en mg d'oxygène par mg de substance, correspond à la DBO, à savoir:

$$\text{DBO} = \frac{(\text{mg d'}O_2 \text{ consom. par le produit à étudier} - \text{mg } O_2 \text{ consom. par le blanc})}{(\text{mg de produit à étudier présent dans la fiole})}$$

= mg d'O_2 par mg de produit à étudier

Calculer le pourcentage de biodégradation, soit à partir de la formule suivante:

$$\%\text{ de biodégrad.} = \%\text{ DThO} = \frac{\text{DBO(mg } O_2/\text{mg substance)}}{\text{DThO(mg } O_2/\text{mg substance)}} \times 100,$$

soit à l'aide de celle-ci:

$$\%\text{ DCO} = \frac{\text{DBO(mg } O_2/\text{mg substance)}}{\text{COD(mg}O_2/\text{mg substance)}} \times 100$$

Il faut noter que ces deux méthodes n'aboutissant pas nécessairement au même résultat, il est préférable d'utiliser la première.

Pour les substances à étudier azotées, choisir la DThO appropriée (NH_4 ou NO_3) en fonction de ce que l'on sait ou suppose quant à la nitrification (annexe II.2.). Si la nitrification a lieu mais de manière incomplète, calculer la correction pour l'oxygène consommé par la nitrification à partir des modifications des concentrations de nitrite et de nitrate (annexe V).

Lorsque les mesures facultatives du carbone organique et/ou d'un produit spécifique sont effectuées, calculer le pourcentage de dégradation, comme décrit au paragraphe 1.7.

Consigner tous les résultats sur les fiches de données fournies.

V.3.2. **Validité des résultats**

La consommation d'oxygène dans l'essai à blanc contenant l'inoculum est normalement comprise entre 20 et 30 mg/l d'O_2 et ne doit pas dépasser 60 mg/l en 28 jours. Des valeurs supérieures à 60 mg/l nécessitent un examen critique des données et des méthodes expérimentales. Si la valeur du pH se situe en dehors de l'intervalle compris entre 6 et 8,5 et si la consommation d'oxygène par le produit à étudier est inférieure à 60 %, l'essai doit être recommencé avec une concentration en produit à étudier plus faible.

Voir également 1.5.2.

▼B

V.3.3. **Rapport**

Voir 1.8.

V.4. **FICHE DE DONNÉES**

Un exemple de fiche de données est présenté ci-après.

ESSAI DE RESPIROMÉTRIE MANOMÉTRIQUE

1. **LABORATOIRE**

2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI**

3. **SUBSTANCE À ÉTUDIER**

Nom:

Concentration de la solution mère: … mg/l

Concentration initiale dans le milieu, C_o: … mg/l

Volume dans la fiole d'essai (V): … ml

DThO/DCO: … mg O_2/mg de produit à étudier (NH_4, NO_3)

4. **INOCULUM**

Origine: …

Traitement: …

Préconditionnement éventuel: …

Concentration des matières solides en suspension dans le mélange réactionnel: … mg/l

5. **CONSOMMATION D'OXYGÈNE: BIODÉGRADABILITÉ**

		Temps (jours)											
		0		7		14			21			28	
Cons. O_2 (mg) du produit à étudier	1												
	2												
	a, moy.												
Cons. O_2 (mg) du blanc	3												
	4												
	b, moy.												
DBO corr. (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
DBO par mg de substance d'essai	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Temps (jours)											
		0		7		14			21			28	
% de dégrad. $\frac{DBO}{DThO} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Moyenne (*)												

V = volume de milieu dans la fiole d'essai
(*) Il ne faut pas calculer la moyenne de D_1 et D_2 lorsque la différence entre leurs valeurs est trop grande.

Note: Des tableaux de ce type peuvent être utilisés pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

6. **CORRECTION TENANT COMPTE DE LA NITRIFICATION** (voir annexe V)

Jour		0	28	Différence
i)	Concentration de nitrate (mg N/l)			(N)
ii)	Équivalent oxygène (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii)	Concentration de nitrite (mg N/l)			(N)
(iv)	Équivalent oxygène (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv)	Total équivalent oxygène	—	—	

7. **ANALYSE DU CARBONE** (facultative)

Analyseur de carbone: ...

Temps (jour)	Blanc mg/l	Produit à étudier mg/l
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) ou à la fin de l'incubation

$$\% \text{ de COD éliminé } = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **ANALYSE SPÉCIFIQUE** (facultative)

S_b = concentration dans le témoin physico-chimique (stérile), le 28e jour.

S_a = concentration dans la fiole ensemencée, le 28e jour.

$$\% \text{ de biodégradation } = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **DÉGRADATION ABIOTIQUE** (facultative)

a = consommation d'oxygène dans les fioles stériles au bout de 28 jours (mg).

$$\text{Consommation d'oxygène par mg de produit à étudier } = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(Voir paragraphe 1 et 3)

$$\% \text{ de dégradation abiotique } = \frac{a \times 100}{C_o V \times DThO}$$

PARTIE VI. **ESSAI EN FIOLES FERMÉES** (Méthode C.4-E)

VI.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La solution de substance à étudier en milieu minéral, généralement d'une concentration de 2 à 5 mg/l, est ensemencée avec un nombre relativement faible de micro-organismes provenant d'une population hétérogène et conservée dans des fioles fermées et remplies complètement dans l'obscurité et à température constante. La dégradation est suivie par l'analyse de l'oxygène dissous pendant une période de 28 jours. La quantité d'oxygène consommé par la substance à étudier, corrigée en fonction de la consommation dans l'essai à blanc contenant l'inoculum réalisé dans la même série, est exprimée en pourcentage de DThO ou de DCO.

VI.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

VI.2.1. **Appareillage**

a) des flacons pour analyse de la DBO, munis de bouchons de verre, d'un volume de 250 à 300 ml,

b) un bain-marie ou un incubateur permettant de maintenir les fioles à température constante (± 1 ºC au maximum) à l'abri de la lumière,

c) de grands flacons de verre (2 à 5 l) pour la préparation des milieux et le remplissage des flacons à DBO,

d) une électrode à oxygène couplée à un appareil de mesure, ou l'équipement et les réactifs nécessaires à la méthode de titration de Winkler.

VI.2.2. **Préparation du milieu minéral**

Pour la préparation des solutions mères, voir I.6.2.

Mélanger 1 ml des solutions a) à d) et compléter le volume à un litre avec l'eau de dilution.

VI.2.3. **Préparation de l'inoculum**

Normalement, l'inoculum provient de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une unité pilote qui reçoit principalement des eaux ménagères. L'eau de surface peut constituer une autre source d'inoculum. Utiliser normalement une goutte (0,05 ml) à 5 ml de filtrat par litre de milieu; il peut être nécessaire de procéder à des essais afin de déterminer le volume optimal pour un effluent donné (voir I.6.4.2. et I.6.5.)

VI.2.4. **Préparation des fioles**

Aérer fortement le milieu minéral pendant au moins 20 mn. Chaque série d'essais doit être effectuée avec du milieu minéral provenant d'un lot unique. Le milieu est généralement prêt à l'emploi après être resté pendant 20 heures à la température de l'essai. Déterminer la concentration d'oxygène dissous à des fins de contrôle; la valeur obtenue doit être proche de 9 mg/l à 20 ºC. Effectuer toutes les opérations de transfert et de remplissage avec le milieu saturé d'air en évitant la formation de bulles, par exemple à l'aide de siphons.

▼B

Préparer des lots parallèles de flacons à DBO pour les déterminations avec la substance d'essai et la substance de référence dans des séries expérimentales simultanées. Réunir un nombre suffisant de flacons à DBO, comprenant des essais à blanc avec l'inoculum, pour pouvoir effectuer, au moins en double, les mesures de la consommation d'oxygène aux intervalles de temps souhaités, par exemple après 0, 7, 14, 21 et 28 jours. Un plus grand nombre de flacons peut être nécessaire pour être sûr de pouvoir identifier l'intervalle de temps de 10 jours.

Transférer le milieu minéral parfaitement aéré dans les grands flacons de manière à remplir à peu près le tiers de leur volume. Ajouter ensuite dans de grands flacons distincts une quantité de solution mère du produit à étudier ou du produit de référence telle que la concentration finale ne dépasse pas, normalement, 10 mg/l. N'ajouter aucune substance dans le grand flacon destiné à l'essai à blanc.

Pour s'assurer que l'activité de l'inoculum n'est pas limitée, la concentration d'oxygène dissous ne doit pas descendre en-dessous de 0,5 mg/l dans les flacons à DBO. La concentration de produit à étudier se trouve ainsi limitée à environ 2 mg/l. Toutefois, on peut utiliser une concentration comprise entre 5 et 10 mg/l pour les composés peu dégradables et les composés dont la DThO est faible. Dans certains cas, il est préférable d'effectuer des séries d'essais en parallèle avec deux concentrations différentes, par exemple 2 et 5 mg/l. La DThO est normalement calculée à partir de la formation de sels d'ammonium, mais si l'on suppose ou si l'on est sûr qu'une nitrification doit avoir lieu, il convient alors de calculer la $DThO_{NO3}$ en se basant sur la formation de nitrate (voir annexe II.2). Toutefois, si une nitrification se produit mais sans être complète, il faut effectuer une correction tenant compte des modifications de la concentration de nitrite et de nitrate déterminées par l'analyse (voir annexe V).

Si la toxicité du produit à étudier doit être recherchée (dans le cas, par exemple, où une faible biodégradabilité aurait été observée au préalable), une autre série de flacons est nécessaire.

Préparer un autre grand flacon contenant du milieu minéral aéré (jusqu'au tiers de son volume environ) auquel on ajoute la substance à étudier et le produit de référence à des concentrations finales normalement égales à celles des autres grands flacons.

Ensemencer les solutions contenues dans les grands flacons avec un effluent secondaire (dont le volume est compris entre une goutte, soit environ 0,05 ml, et 5 ml) ou avec un inoculum d'une autre origine, comme de l'eau de rivière (voir I.6.4.2.). Enfin, compléter le volume des solutions avec du milieu minéral aéré à l'aide d'un tuyau touchant le fond du flacon pour permettre un mélange adéquat.

VI.2.5. **Nombre de fioles d'une série type**

Une série type comporte les flacons suivants:

— au moins 10 flacons contenant la substance à étudier et l'inoculum (suspension d'essai),

— au moins 10 flacons ne contenant que l'inoculum (essai à blanc avec l'inoculum),

— au moins 10 flacons contenant le produit de référence et l'inoculum (contrôle de la procédure),

▼B

— et, si nécessaire, 6 flacons contenant la substance à étudier, le produit de référence et l'inoculum (contrôle de toxicité). Néanmoins, pour être certain de pouvoir identifier l'intervalle de temps de 10 jours, il faudrait environ deux fois plus de flacons.

VI.2.6. Déroulement de l'essai

Toutes les solutions préparées sont immédiatement transférées dans le lot correspondant de flacons à DBO à l'aide d'un tuyau plongeant aux trois quarts (pas jusqu'au fond) du grand flacon approprié de telle sorte que tous les flacons à DBO soient complètement remplis. Tapoter doucement pour éliminer toutes les bulles d'air. L'oxygène dissous est analysé immédiatement dans les flacons destinés à la mesure au temps 0, par la méthode de Winkler ou avec une électrode. Le contenu des flacons peut être conservé en vue d'une analyse ultérieure par la méthode de Winkler si on lui ajoute du sulfate de manganèse (II) et de l'hydroxyde de sodium (le premier réactif de la méthode de Winkler). Les flacons dont le contenu en oxygène est fixé sous forme d'hydroxyde de manganèse (III) brun, sont conservés soigneusement fermés à l'obscurité, et à une température comprise entre 10 et 20 °C. Ne pas attendre plus de 24 heures avant de procéder aux étapes suivantes de la méthode de Winkler. Fermer les autres flacons préparés parallèlement en s'assurant qu'ils ne contiennent pas de bulles d'air et les incuber à 20 °C a l'obscurité. Chaque série doit être accompagnée d'une série complète d'essais à blanc ensemencés pour la détermination du témoin inoculum. Prélever régulièrement (au moins chaque semaine) deux flacons au moins dans chaque série, afin d'analyser l'oxygène dissous pendant la durée de l'incubation qui est de 28 jours.

Les prélèvements hebdomadaires d'échantillons permettent de déterminer le pourcentage de disparition dans un intervalle de 14 jours, alors que les prélèvements effectués tous les 3 ou 4 jours, qui nécessitent environ deux fois plus de flacons, permettent d'identifier l'intervalle de temps de 10 jours.

Si la substance à étudier contient de l'azote, il convient d'effectuer une correction pour tenir compte de la consommation d'oxygène due à la nitrification. Pour cela, déterminer la concentration d'oxygène dissous par la méthode de l'électrode à O_2 et, ensuite, analyser la teneur en nitrite et en nitrate sur un échantillon prélevé dans le flacon DBO. Calculer la quantité d'oxygène utilisée sur la base de l'augmentation de la concentration de nitrite et de nitrate (voir annexe V).

VI.3. RÉSULTATS ET RAPPORT

VI.3.1. **Traitement des résultats**

En premier lieu, calculer la DBO après chaque période de temps en soustrayant la perte en oxygène (mg O_2/l) dans l'essai à blanc contenant l'inoculum de celle que l'on observe avec la substance à étudier. Diviser cette perte en oxygène ainsi corrigée par la concentration (mg/l) de la substance à étudier. Le résultat obtenu correspond à la DBO spécifique exprimée en mg d'oxygène par mg de substance d'essai. Calculer le pourcentage de biodégradabilité en divisant la DBO spécifique par la DThO spécifique (calculée selon les indications données à l'annexe II.2) ou par la DCO (déterminée par analyse, voir annexe II.3).

Ainsi:

$$\text{DBO} = \frac{\text{mg } O_2 \text{ consommé par la substance à étudier} - \text{mg } O_2 \text{ consommé par le blanc}}{\text{mg de substance à étudier dans la fiole}}$$

▼B

= mg d'O_2 par mg de produit à étudier

$$\% \text{ de dégradation } = \frac{\text{DBO (mg } O_2/\text{mg de substance à étudier)}}{\text{DThO (mg } O_2/\text{mg de substance à étudier)}} \times 100$$

$$\% \text{ de dégradation } = \frac{\text{DBO (mg } O_2/\text{mg de substance à étudier)}}{\text{DCO (mg } O_2/\text{mg de substance à étudier)}} \times 100$$

Il faut noter que ces deux méthodes ne conduisant pas nécessairement au même résultat, il est préférable d'utiliser la première.

Dans le cas où la substance d'essai contient de l'azote, il convient d'utiliser la DThO appropriée (NH_4 ou NO_3) en fonction des connaissances ou des prévisions concernant l'éventualité de la nitrification (annexe II.2.). Si une nitrification a lieu sans toutefois être complète, corriger pour tenir compte de la consommation d'oxygène due à la nitrification à partir des modifications de la concentration de nitrite et de nitrate (annexe V).

VI.3.2. **Validité des résultats**

La perte d'oxygène dans l'essai à blanc contenant l'inoculum ne doit pas dépasser 1,5 mg/l d'oxygène dissous après 28 jours. Des valeurs supérieures nécessitent une vérification des méthodes expérimentales. La concentration résiduelle d'oxygène dans les flacons d'essai ne doit à aucun moment descendre au-dessous de 0,5 mg/l. Une teneur en oxygène aussi basse n'est acceptable que si la méthode utilisée pour mesurer l'oxygène dissous est capable de mesurer de telles concentrations avec précision.

Voir également I.5.2.

VI.3.3. **Rapport**

Voir 1.8.

VI.4. FICHE DE DONNÉES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-dessous.

ESSAI EN FIOLES FERMÉES

1. **LABORATOIRE**

2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI**

3. **SUBSTANCE À ÉTUDIER**

Nom:

Concentration de la solution mère: ... mg/l

Concentration initiale dans la fiole: ... mg/l

DThO/DCO: ... mg O_2/mg de produit à étudier

4. **INOCULUM**

Origine: ...

Traitement: ...

▼B

Préconditionnement éventuel: ...

Concentration dans le mélange réactionnel: ... mg/l

5. **DÉTERMINATION DE L'OD**

Méthode de Winkler ou de l'électrode.

Analyses des fioles

Temps d'incubation (d)			OD (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Blanc (sans produit)	1	C_1				
	2	C_2				
Moyenne	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Produit à étudier	1	a_1				
	2	a_2				
Moyenne	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Note: Des tableaux de ce type peuvent être utilisés pour le produit de référence et le témoin de toxicité.

6. **CORRECTION TENANT COMPTE DE LA NITRIFICATION** (annexe V)

Temps d'incubation (d)		0	n_1	n_2	n_3
(i)	Concentration de nitrate (mg N/l)				
(ii)	Modif. de la conc. de nitrate (mg N/l)	—			
(iii)	Équivalent oxygène (mg/l)	—			
(iv)	Concentration de nitrite (mg N/l)				
(v)	Modif. de la conc. de nitrite (mg N/l)	—			
(vi)	Équivalent oxygène (mg/l)	—			
(iii + vi)	Total équivalent oxygène (mg/l)	—			

7. **PERTE D'OD: % DE DÉGRADATION**

	Perte après n jours (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
FIOLE 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
FIOLE 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Perte après n jours (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
FIOLE 1: $\%D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. produit à étudier} \times \text{DThO}}$				
FIOLE 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. produit à étudier} \times \text{DThO}}$				
$\%$ D moyen (*) $= \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(*) Ne pas utiliser la moyenne si tes résultats des essais en double varient considérablement.

m_{to} = valeur dans la fiole d'essai au temps 0

m_{tx} = valeur dans la fiole d'essai au temps x

m_{bo} = valeur moyenne du blanc au temps 0

m_{bx} = valeur moyenne du blanc au temps x

Appliquer également la correction tenant compte de la nitrification mentionnée aux points (iii) et (vi) du paragraphe 6.

8. **PERTE D'OD DANS L'ESSAI À BLANC**

Consommation d'oxygène dans l'essai à blanc: (m_{bo} — m_{b28}) mg/l. Cette consommation est importante pour la validité de l'essai. Elle doit être inférieure à 1,5 mg/l.

PARTIE VII. **ESSAI M.I.T.I.** (Méthode C.4-F)

VII.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La consommation d'oxygène d'une solution ou d'une suspension agitée de substance à étudier dans un milieu minéral, ensemencée avec des micro-organismes cultivés à cet effet sans adaptation préalable, est établie à l'aide d'un respiromètre automatique en circuit fermé, à l'obscurité, pendant une période de 28 jours à 25 ± 1 °C. Le dioxyde de carbone dégagé est absorbé par de la chaux sodée. La biodégradabilité est exprimée par le pourcentage de la consommation d'oxygène (corrigé en fonction de la consommation dans l'essai à blanc) par rapport à la consommation théorique (DThO). Le pourcentage de biodégradabilité primaire est également calculé d'après les analyses chimiques spécifiques supplémentaires effectuées au début et à la fin de l'incubation et, éventuellement, à l'aide de l'analyse du COD.

VII.2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

VII.2.1. **Appareillage**

a) appareil de mesure automatique de la DBO par électrolyse ou respiromètre normalement équipé de 6 fioles d'une contenance de 300 ml chacune et de récipients contenant l'absorbant de CO_2;

▼B

b) pièce thermostatée et/ou bain-marie à 25 °C (± 1 °C au maximum);

c) dispositif de filtration sur membrane (facultatif);

d) analyseur de carbone (facultatif).

VII.2.2. **Préparation du milieu minéral**

Préparer les solutions mères suivantes, à l'aide de réactifs de qualité analytique et d'eau (1.6.1.):

a) Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 8,50 g

Monohydrogénophosphate de potassium, K_2HPO_4 21,75 g

Monohydrogénophosphate de sodium dodécahydraté, $Na_2HPO_4.12\ H_2O$ 44,60 g

Chlorure d'ammonium, NH_4Cl 1,70 g

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre

Le pH de la solution doit être égal à 7,2

b) Sulfate de magnésium heptahydraté, $MgSO_4\ 7\ H_2O$ 22,50 g

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre

c) Chlorure de calcium, anhydre $CaCl_2$ 27,50 g

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre

d) Chlorure de fer (III) hexahydraté, $FeCl_3.6\ H_2O$ 0,25 g

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre

Prélever 3 ml de chacune des solutions a), b) c) et d) et compléter le volume à 1 litre.

VII.2.3. **Préparation de l'inoculum**

Recueillir des échantillons frais dans 10 emplacements au moins, principalement dans des zones où divers produits chimiques sont utilisés et rejetés dans l'environnement. Recueillir des échantillons d'un litre de boue, de sols superficiels, d'eau, etc., dans des sites tels que les stations d'épuration des eaux d'égout, les stations d'épuration industrielle, les rivières, les lacs et les mers et bien les mélanger. Après avoir enlevé les matières flottantes, laisser reposer le mélange, puis ajuster le pH du surnageant à 7 ± 1 au moyen d'hydroxyde de sodium ou d'acide phosphorique.

Utiliser un volume de surnageant filtré suffisant pour remplir un récipient de traitement des boues activées et aérer le liquide pendant environ 23 heures 30. Trente minutes après avoir interrompu l'aération, retirer environ un tiers du volume total du liquide surnageant et ajouter à la partie décantée un volume égal d'une solution (pH 7) contenant 0,1 % de chacun des produits suivants: glucose, peptone, monophosphate de potassium, puis aérer à nouveau le mélange. Répéter cette opération chaque jour. La réserve de boue doit être préparée selon les bonnes pratiques: l'effluent doit être clair, la température doit être maintenue à 25 ± 2 °C, son pH égal à 7 ± 1, la boue doit bien décanter, l'aération doit être suffisante pour que le mélange soit en permanence en aérobiose, des protozoaires doivent être présents et l'activité de la boue doit être testée à l'aide d'une substance de référence au moins tous les trois mois. Ne pas utiliser la boue comme inoculum avant au moins un mois après sa préparation ni après plus de quatre mois. Il convient donc d'effectuer périodiquement des prélèvements d'échantillons, tous les trois mois, en 10 emplacements différents au moins.

▼B

Afin de conserver la même activité aux boues fraîches et anciennes, le surnageant filtré d'une boue activée utilisée pour l'essai doit être mélangé en volume égal au surnageant filtré d'une boue fraîchement recueillie provenant de dix sources différentes. Le mélange ainsi obtenu est mis en culture comme décrit ci-avant. Prélever la boue pour l'utiliser comme inoculum 18 à 24 heures après cette opération.

VII.2.4. **Préparation des fioles**

Préparer les six fioles suivantes:

N° 1: eau de dilution contenant 100 mg/l de substance à étudier,

N°s 2, 3 et 4: milieu minéral contenant 100 mg/l de substance à étudier,

N° 5: milieu minéral contenant 100 mg/l de produit de référence (par exemple de l'aniline),

N° 6: milieu minéral seul.

Si la substance à étudier est peu soluble, il convient d'en ajouter directement un poids ou un volume défini, ou de procéder selon les instructions figurant à l'annexe III, en n'utilisant toutefois ni solvant ni émulsifiant. Placer l'absorbant de CO_2 pour chaque fiole, dans la coupelle spécialement prévue à cet effet. Ajuster à 7,0 le pH de la solution contenue dans les fioles n°s 2, 3 et 4.

VII.2.5. **Déroulement de l'essai**

Ensemencer les fioles n°s 2, 3 et 4 (suspensions d'essai), n° 5 (témoin d'activité) et n° 6 (blanc contenant l'inoculum) avec un petit volume d'inoculum de manière à ce que la concentration des matières solides en suspension soit égale à 30 mg/l. Ne pas ajouter d'inoculum dans la fiole n° 1 qui sert de témoin abiotique. Assembler le matériel, vérifier l'étanchéité à l'air, brancher les agitateurs et commencer à mesurer la consommation d'oxygène dans l'obscurité. Vérifier chaque jour la température et le fonctionnement des agitateurs et de l'enregistreur de l'appareil de mesure coulométrique de la consommation d'oxygène et noter toute modification de couleur du milieu contenu dans les fioles. Lire la consommation d'oxygène dans les six fioles directement avec une méthode appropriée, par exemple sur l'enregistreur à six points, qui fournit une courbe de la DBO. À la fin de l'incubation, dont la durée normale est de 28 jours, mesurer le pH du contenu des fioles et déterminer la concentration résiduelle de la substance à étudier et de toute substance intermédiaire et dans le cas d'une substance hydrosoluble, la concentration de COD (annexe II.4). Des précautions particulières doivent être prises pour étudier les produits volatiles. Si un processus de nitrification est prévisible, déterminer, si possible, la concentration en nitrates et nitrites.

VII.3. PRÉSENTATION DES DONNÉES

VII.3.1. **Traitement des résultats**

La quantité d'oxygène consommée (mg) par la substance d'essai après un temps donné, corrigée de façon à tenir compte de la quantité d'O_2 consommée dans l'essai à blanc contenant l'inoculum après la même période de temps, est divisée par le poids de substance à étudier utilisé pour l'essai. Le résultat ainsi obtenu correspond à la DBO exprimée en mg d'oxygène/mg de substance d'essai, c'est-à-dire:

$$\text{DBO} = \frac{\text{mg } O_2 \text{ consom. par la substance d'essai} - \text{mg } O_2 \text{ consom. par le blanc}}{\text{mg de substance d'essai dans la fiole}}$$

= mg d'O_2/mg de substance d'essai

▼B

Le pourcentage de biodégradation est alors obtenu à l'aide de la formule suivante:

$$\%\ \text{de biodégradation} = \%\ \text{DThO} = \frac{\text{DBO (mg } O_2\text{/mg produit)}}{\text{DThO (mg } O_2\text{/mg produit)}} \times 100$$

Pour les mélanges, calculer la DThO à partir de l'analyse élémentaire, comme pour un composé simple. Choisir la DThO appropriée ($DThO_{NH4}$ ou $DThO_{NO3}$) selon que la nitrification est absente ou complète (annexe II.2). Cependant, si la nitrification se produit mais sans toutefois être complète, il convient d'effectuer une correction correspondant à la quantité d'oxygène consommée par la nitrification à partir des modifications de la concentration en nitrites et en nitrates (annexe V).

Calculer le pourcentage de biodégradation primaire à partir de la perte de produit chimique spécifique (d'origine) (voir 1.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Si la mesure de la disparition physico-chimique révèle une perte de produit d'essai dans la fiole n° 1, il convient de le consigner et de calculer le pourcentage de biodégradation en utilisant la concentration de substance d'essai (S_b) dans la fiole au bout de 28 jours.

Si la concentration de COD est déterminée (facultatif), calculer le pourcentage de biodégradation ultime à l'aide de la formule suivante:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

décrite au paragraphe I.7.1. Si la mesure de la disparition physico-chimique révèle une perte de COD dans la fiole n° 1, il convient de calculer le pourcentage de dégradation en utilisant la concentration de COD dans cette fiole.

Consigner tous les résultats sur les fiches de données fournies.

VII.3.2. **Validité des résultats**

La consommation d'oxygène dans l'essai à blanc contenant l'inoculum est normalement comprise entre 20 et 30 mg O_2/l et ne doit pas excéder 60 mg/l en 28 jours. Des valeurs supérieures à 60 mg/l nécessitent un examen critique des données et des méthodes expérimentales. Si la valeur du pH se trouve en dehors de l'intervalle compris entre 6 et 8,5 et si la consommation d'oxygène par la substance d'essai est inférieure à 60 %, l'essai doit être répété avec une concentration plus faible de substance à étudier.

Voir également I.5.2.

Si le pourcentage de dégradation de l'aniline calculé à partir de la consommation d'oxygène ne dépasse pas 40 % après 7 jours et 65 % après 14 jours, l'essai est considéré comme non valable.

VII. 3.3. **Rapport**

Voir I.8.

VII.4. FICHE DE DONNÉES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-dessous.

ESSAI MITI (I)

1. **LABORATOIRE**

2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI**

▼B

3. **SUBSTANCE À ÉTUDIER**

Nom:

Concentration de la solution mère: ... mg/l de produit

Conc. initiale dans le milieu, C_o: ... mg/l de produit

Volume du mélange réactionnel, V: ... ml

DThO: ... mg O_2/l

4. **INOCULUM**

Emplacements d'échantillonnage des boues:

1) … 6) …

2) … 7) …

3) … 8) …

4) … 9) …

5) … 10) …

Concentration des matières en suspension dans la boue activée après acclimatation à l'aide d'une eau d'égout synthétique = mg/l

Volume de boue activée par litre de milieu final = ml

Concentration de boue dans le milieu final = mg/l

5. **CONSOMMATION D'OXYGÈNE: BIODÉGRADABILITÉ**

Type de respiromètre utilisé:

			Temps (jours)				
			0	7	14	21	28
Cons. d'O_2 (mg) du produit	a_1						
	a_2						
	a_3						
Cons. d'O_2 (mg) du blanc	b						
Cons. d'O_2 corrigée (mg)	(a_1 - b) (a_2 - b) (a_3 - b)						
DBO par mg de produit	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Fiole 1					
		Fiole 2					
		Fiole 3					
% dégradation $\frac{DBO}{DThO} \times 100$		1					
		2					
		3					
		moy (*)					

(*) Ne pas calculer la moyenne lorsque la différence entre les réplicats est trop grande.

▼B

Note: Des tableaux de ce type peuvent être utilisés pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

6. **ANALYSE DE CARBONE** (facultative)

Analyseur de carbone: ...

Fiole	COD				% COD éliminé	Moy.
	Mesuré		Corrigé			
Eau + subst. d'essai	a				—	—
Boue + subst. d'essai	b_1		b_1 — c			
Boue + subst. d'essai	b_2		b_2 — c			
Boue + subst. d'essai	b_3		b_3 — c			
Essai à blanc	c		—		—	—

% COD éliminé: $\frac{a - (b - c)}{a} \times 100$

7. **DONNÉES DE L'ANALYSE SPÉCIFIQUE CHIMIQUE**

	Quantité résiduelle de produit à la fin de l'essai	% de dégradation
essai à blanc avec de l'eau	S_b	
milieu inoculé	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

% de dégradation $= \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

Calculer le % de dégradation pour les fioles a_1 a_2 et a_3 respectivement.

8. **OBSERVATIONS**

La courbe de la DBO en fonction du temps doit, le cas échéant, être jointe.

▼B

Annexe 1

ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS

OD: oxygène dissous (mg/l), c'est-à-dire la concentration d'oxygène dissous dans un échantillon aqueux.

DBO: demande biochimique en oxygène (g), soit la quantité d'oxygène consommée par des micro-organismes au moment où ils métabolisent un produit soumis à l'essai; la DBO est également exprimée en g d'oxygène consommé par g de produit à étudier (voir la méthode C.5).

DCO: demande chimique d'oxygène (g), c'est-à-dire la quantité d'oxygène consommée au cours de l'oxydation d'un produit à étudier en présence de bichromate acide chaud; la DCO fournit une mesure de la quantité de matière oxydable présente; la DCO est également exprimée en g d'oxygène consommé par g de substance à étudier (voir méthode C.6).

COD: carbone organique dissous. Il s'agit du carbone organique présent dans une solution ou qui traverse un filtre d'une porosité de 0,45 micromètre ou encore qui reste dans le surnageant après une centrifugation de 15 min à 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g).

DThO: demande théorique en oxygène (mg), c'est-à-dire la quantité totale d'oxygène nécessaire pour parvenir à l'oxydation complète d'un produit chimique. Elle est calculée à partir de la formule moléculaire (voir annexe II.2). La DThO est également exprimée en mg d'oxygène nécessaire par mg de produit à étudier.

CO_2Th: dioxyde de carbone théorique (mg). Il s'agit de la quantité calculée de dioxyde de carbone pouvant être produite à partir du contenu en carbone mesuré ou connu dans le produit à étudier, lors de sa minéralisation totale. Le CO_2Th est également exprimé en mg de dioxyde de carbone qui se dégage par mg de produit à étudier.

COT: carbone organique total. Le COT d'un échantillon est égal à la somme du carbone organique en solution et en suspension.

CI: carbone inorganique.

CT: carbone total. Le CT est égal à la somme du carbone organique et du carbone inorganique présents dans l'échantillon.

Biodégradation primaire:

Altération de la structure chimique d'une substance obtenue par une action biologique et entraînant la perte de propriétés spécifiques de cette substance.

Biodégradation ultime (en aérobiose):

Taux de dégradation atteint lorsque la totalité de la substance à étudier a été utilisée par des micro-organismes pour produire du dioxyde de carbone, de l'eau, des sels minéraux et de nouveaux constituants cellulaires microbiens (biomasse).

Facilement biodégradable:

Il s'agit d'un classement arbitraire des produits chimiques qui ont répondu positivement à des essais portant sur la biodégradabilité ultime; du fait de la rigueur de ces essais, on suppose que ces composés se dégradent rapidement et complètement en milieu aquatique dans des conditions d'aérobiose.

▼B

Intrinsèquement biodégradable:

Il s'agit d'une classification des produits chimiques donc la biodégradation (primaire ou ultime) a été prouvée sans ambiguïté au cours d'un essai de biodégradabilité reconnu internationalement.

Traitabilité:

Aptitude des composés à disparaître au cours du traitement biologique des eaux résiduaires sans effet indésirable sur le déroulement normal du traitement. D'une manière générale, les composés facilement biodégradables sont traitables, ce qui n'est pas le cas de tous les composés intrinsèquement biodégradables. Des processus abiotiques peuvent également se produire.

Phase de latence

correspond à la période qui, au cours d'un essai de disparition, sépare le moment de l'ensemencement de celui où le pourcentage de dégradation a augmenté d'au moins 10 %. La durée de la phase de latence est souvent extrêmement variable et peu reproductible.

Phase de dégradation

correspond à la période qui commence à la fin de la phase de latence et se termine au moment où 90 % du taux maximal de dégradation a été atteint.

Intervalle de 10 jours

Il s'agit des 10 jours immédiatement consécutifs au moment où le taux de dégradation atteint 10 %.

▼B

Annexe II

CALCUL ET DÉTERMINATION DE PARAMÈTRES APPROPRIÉS

Certains paramètres seront requis en fonction de la méthode choisie. Le chapitre suivant décrit le calcul de ces valeurs. L'utilisation de ces paramètres est décrite dans les chapitres consacrés à chaque méthode.

1. **Teneur en carbone**

   La teneur en carbone est calculée à partir de la composition élémentaire connue de la substance à étudier, ou déterminée par l'analyse élémentaire de cette substance.

2. **Demande théorique en oxygène (DThO)**

   La demande théorique en oxygène (DThO) peut être calculée si la composition élémentaire est connue ou déterminée par analyse élémentaire. Par exemple la DThO du composé suivant:

   $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

   sera, en l'absence de nitrification, égale à:

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

   et si une nitrification a lieu, elle sera égale à:

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Demande chimique en oxygène (DCO)**

   La demande chimique en oxygène (DCO) est déterminée à l'aide de la méthode C.6.

4. **Carbone organique dissous (COD)**

   Le carbone organique dissous (COD) est, par définition, le carbone organique présent dans la solution aqueuse d'un produit chimique ou d'un mélange, qui traverse un filtre d'une porosité de 0,45 micromètre.

   Prélever des échantillons dans les récipients d'essai et les filtrer immédiatement à l'aide d'un dispositif de filtration en utilisant une membrane filtrante appropriée. Les 20 premiers ml de filtrat (la quantité peut être réduite si on utilise des filtres de petite taille) sont éliminés. Un volume de filtrat compris entre 10 et 20 ml, ou moins s'il doit être injecté (le volume dépend de la quantité requise pour l'analyseur de carbone), est retenu afin d'en analyser la teneur en carbone. La concentration en COD est déterminée à l'aide d'un analyseur de carbone organique capable de mesurer avec précision une concentration de carbone égale ou inférieure à 10 % de la concentration initiale de COD utilisée pour l'essai.

   Les échantillons filtrés qui ne sont pas analysés le jour même peuvent être conservés pendant 48 heures dans un réfrigérateur entre 2 et 4 °C ou en-dessous de — 18 °C pour des périodes plus longues.

   Remarque:

   Les membranes filtrantes étant souvent imprégnées d'agents tensio-actifs pour l'hydrophilisation, sont susceptibles de contenir plusieurs milligrammes de carbone organique soluble qui interfèrent avec les déterminations de la biodégradabilité. Pour débarrasser les filtres des agents tensio-actifs ainsi que d'autres composés organiques solubles, il convient de les faire bouillir trois fois pendant une heure dans de l'eau déionisée. Ils peuvent ensuite être conservés dans de l'eau pendant une semaine. Si l'on utilise des cartouches filtrantes à usage unique, chaque lot doit être vérifié afin de s'assurer qu'il ne libère pas de carbone organique soluble.

▼B

La substance à étudier peut être retenue par adsorption sur certains types de membranes filtrantes. C'est pourquoi il est conseillé de s'assurer que le produit à étudier n'est pas retenu par le filtre.

Une centrifugation à 40 000 $m.sec^{-2}$ (4 000 g) pendant 15 minutes peut remplacer la filtration pour distinguer le COT du COD. Cette méthode n'est pas fiable si la concentration initiale en COD est inférieure à 10 mg/l, soit parce que toutes les bactéries ne sont pas éliminées, soit parce que du carbone faisant partie intégrante du plasma bactérien est redissous.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Publ. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p 65.

(2) Wagner, R. Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.

(3) DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 — Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

(4) Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), 169.

▼B

Annexe III

ÉVALUATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ DES SUBSTANCES FAIBLEMENT SOLUBLES

Lors des essais de biodégradabilité concernant des substances faiblement solubles, il faut prêter une attention particulière aux éléments énoncés ci-après.

Alors que les liquides homogènes posent rarement des problèmes d'échantillonnage, il est recommandé d'homogénéiser les matières solides par des moyens appropriés afin d'éviter les erreurs dues au manque d'homogénéité. Il convient de prendre des précautions particulières pour prélever, dans des mélanges de produits chimiques ou dans des substances riches en impuretés, des échantillons de quelques milligrammes qui soient représentatifs.

Différents types d'agitation peuvent être utilisés au cours de l'essai, mais il faut veiller à ce que l'agitation soit juste suffisante pour maintenir la dispersion du produit tout en évitant une surchauffe, la formation excessive de mousse ou des forces de cisaillement excessives.

Il est possible d'utiliser un émulsifiant qui produise une dispersion stable du produit. Il ne devra ni être toxique pour les bactéries, ni être biodégradé, ni former de la mousse dans les conditions d'essai.

Les mêmes critères s'appliquent aux solvants et aux émulsifiants.

Il n'est pas conseillé d'utiliser des supports solides pour les produits solides; leur utilisation peut, par contre, être appropriée dans le cas des substances huileuses.

Lorsqu'une substance auxiliaire, telle qu'un émulsifiant, un solvant ou un support, est utilisée, il convient d'effectuer un essai à blanc avec cette substance.

Les trois essais de respirométrie, CO_2, DBO ou MITI, conviennent pour étudier la biodégradabilité des composés faiblement solubles.

BIBLIOGRAPHIE

— de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Gerike, P. The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

▼B

Annexe IV

ÉVALUATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ DES PRODUITS CHIMIQUES SUSPECTÉS DE TOXICITÉ VIS-À-VIS DE L'INOCULUM

Lorsqu'un produit est soumis à des essais de biodégradabilité facile et semble ne pas être biodégradable, il est recommandé de suivre la procédure suivante si l'on souhaite effectuer une distinction entre inhibition et inertie (Reynolds et al., 1987).

Il convient de procéder aux essais de toxicité et de biodégradation avec des inoculums semblables ou identiques.

Pour évaluer la toxicité des produits soumis aux essais de biodégradabilité facile, il semble approprié d'appliquer soit l'une des méthodes suivantes soit une combinaison de ces méthodes: inhibition du taux de respiration de la boue (essai d'inhibition de la respiration des boues activées — directive 88/302/CEE), DBO, et/ou inhibition de la croissance.

S'il convient d'éviter l'inhibition due à la toxicité, il est suggéré d'utiliser pour les essais de biodégradabilité facile des concentrations de la substance d'essai inférieures au 1/10 de la valeur de la CE_{50} obtenue lors des essais de toxicité (ou inférieures à la valeur de la CE_{20}). Il est peu vraisemblable que les composés dont la CE_{50} a une valeur supérieure à 300 mg/l produisent un effet toxique lors des tests de biodégradabilité facile. Il est vraisemblable que des valeurs de CE_{50} inférieures à 20 mg/l poseront de sérieux problèmes lors des essais ultérieurs. Il convient dans ce cas d'employer de faibles concentrations d'essai nécessitant l'utilisation de l'essai en fioles fermées, qui est rigoureux et sensible, ou de produit marqué au ^{14}C. Une autre manière de procéder consiste à utiliser un inoculum acclimaté permettant d'utiliser des concentrations plus élevées de substance d'essai. Toutefois, dans ce cas, on perd le critère spécifique de l'essai de biodégradation facile.

BIBLIOGRAPHIE

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16,2259.

▼B

Annexe V

CORRECTION TENANT COMPTE DE LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE DUE À L'INTERFÉRENCE DE LA NITRIFICATION

Les erreurs commises en ne tenant pas compte de la nitrification lors de la détermination de la biodégradabilité par mesure de la consommation d'oxygène sont mineures (inférieures a 5 %) lorsque les substances à étudier ne contiennent pas d'azote, même si l'oxydation de l'azote ammoniacal dans le milieu se produit occasionnellement dans les récipients d'essai ainsi que dans les essais à blanc. Par contre, des erreurs importantes peuvent se produire avec les substances qui contiennent de l'azote.

Si la nitrification se produit, mais n'est pas complète, la consommation d'oxygène observée dans le mélange réactionnel peut être corrigée d'une valeur correspondant à la quantité d'oxygène utilisée pour oxyder l'ammonium en nitrite et en nitrate, si les modifications de la concentration de nitrite et de nitrate au cours de l'incubation sont déterminées par les équations suivantes:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Au total:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

D'après l'équation (1), la quantité d'oxygène consommée par l'oxydation de 28 g d'azote contenus dans du chlorure d'ammonium (NH_4Cl) pour former des nitrites est égale à 96 g, ce qui correspond à un facteur 3,43 (96/28). De même, d'après l'équation (3), la quantité d'oxygène consommée par l'oxydation de 28 g d'azote pour former des nitrates est de 128 g, ce qui correspond à un facteur 4,57 (128/28).

Les réactions étant séquentielles et effectuées par différentes espèces bactériennes distinctes, la concentration en nitrite peut augmenter ou diminuer; dans ce dernier cas, la concentration de nitrate est équivalente. La quantité d'oxygène consommée par la formation de nitrate est donc égale a 4,57 multiplié par l'augmentation de la concentration de nitrate, alors que la quantité d'oxygène associée à la formation de nitrite est égale à 3,43 multiplié par l'augmentation de la concentration en nitrite ou dans le cas d'une réduction de sa teneur, la perte en oxygène est égale à - 3,43 multiplié par la diminution de concentration.

Ainsi:

O_2 consommé par la formation de nitrate = 4,57 × augmentation de la concentration de N-nitrate (4),

.

O_2 consommé par la formation de nitrite = 3,43 × augmentation de la concentration de N-nitrite (5)

et donc

O_2 perdu lors de la disparition de nitrite = - 3,43 × réduction de la concentration de N-nitrite (6)

De telle sorte que:

la consommation d'O_2 due à la nitrification = ± 3,43 × modif. de la conc. de N-nitrite + 4,57 × augm. de la conc. de N-nitrate (7)

et donc:

la consommation d'O_2 due à l'oxydation du C = consommation totale observée — consommation due à la nitrification (8).

Une autre possibilité consiste à estimer que, si seul l'azote oxydé total est déterminé, la consommation d'oxygène due à la nitrification sera, en première approximation, égale à 4,57 × l'augmentation de la teneur en azote oxydé.

La valeur corrigée de la consommation d'oxygène due à l'oxydation du C est ensuite comparée à la $DThO_{NH3}$ calculée selon les instructions figurant à l'annexe II.

▼B

C.5. **DÉGRADATION — DEMANDE BIOCHIMIQUE EN OXYGÈNE**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

La méthode a pour objet la mesure de la demande biochimique en oxygène (DBO) de substances organiques, liquides ou solides.

Les données fournies par cet essai concernent les composés hydrosolubles; toutefois, les composes volatils et les composés à faible hydrosolubilité peuvent également être étudiés, du moins en principe.

La méthode est applicable uniquement aux substances organiques, non inhibitrices vis-à-vis des bactéries à la concentration utilisée au cours de l'essai. Si la substance d'essai n'est pas soluble à la concentration d'essai, des procédures particulières telles que le recours à la dispersion ultrasonique pourraient être utilisées, afin d'obtenir une bonne dispersion de la substance.

Des données sur la toxicité de la substance chimique peuvent être utiles pour l'interprétation de résultats faibles et pour le choix de concentrations d'essai appropriées.

1.2. DÉFINITION ET UNITÉS

La DBO est définie comme la masse d'oxygène dissoute nécessaire pour assurer, dans des conditions définies, l'oxydation biochimique d'un volume défini d'une solution de la substance soumise aux essais.

Les résultats sont exprimés en grammes de DBO par gramme de substance soumise à l'essai.

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Il est souhaitable de vérifier l'activité de l'inoculum à l'aide d'une substance de référence appropriée.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Ensemencer avec des micro-organismes et incuber à une température ambiante constante, définie, dans l'obscurité, une quantité prédéterminée de substance, dissoute ou dispersée en milieu aéré approprié.

La DBO est déterminée par la différence entre la teneur en oxygène dissous au début et à la fin de l'essai. La durée de l'essai est d'au moins cinq jours et ne dépassera pas 28 jours.

Un blanc doit être déterminé dans un essai parallèle ne contenant pas de substance d'essai.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

La détermination de la DBO ne peut être considérée comme représentant valablement la biodégradabilité d'une substance et ne constitue qu'un essai de sélection.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparer une solution ou une dispersion préliminaire de la substance, afin d'obtenir une concentration de DBO compatible avec la méthode utilisée. La DBO est alors déterminée par application de toute méthode appropriée, normalisée, nationale ou internationale.

▼B

2. **ÉVALUATION DES DONNÉES**

La DBO contenue dans la solution préliminaire est calculée suivant la méthode normalisée choisie et convertie en grammes de DBO par gramme de substance d'essai.

3. **RÉSULTATS**

La méthode utilisée doit être indiquée.

La demande biochimique en oxygène doit être la moyenne d'au moins trois mesures valables.

Toutes les données et observations pertinentes aidant à l'interprétation des résultats doivent être consignées, notamment en ce qui concerne les impuretés, l'état physique, les effets toxiques et la composition intrinsèque de la substance susceptibles d'affecter les résultats.

L'utilisation de tout additif inhibiteur de la nitrification biologique doit être consignée.

4. RÉFÉRENCES

Exemples de méthodes normalisées:

NF T 90-103: Détermination de la demande biochimique en oxygène.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van net biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. **DÉGRADATION — DEMANDE CHIMIQUE EN OXYGÈNE**

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

La méthode a pour objet la mesure de la demande chimique en oxygène (DCO) de substances organiques, liquides ou solides, par application de tout mode opératoire normalisé, dans des conditions de laboratoire déterminées.

Le fait de disposer de données sur la formule de la substance facilitera la réalisation de cet essai ainsi que l'interprétation des résultats obtenus (par exemple, sels halogénés, sels ferreux de composés organiques, composés organochlorés).

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

La demande chimique en oxygène est la mesure de l'oxydabilité d'une substance, définie comme la quantité d'oxygène d'un réactif oxydant, consommée par la substance dans des conditions de laboratoire déterminées.

Le résultat est exprimé en grammes de DCO par gramme de substance d'essai.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

L'emploi de substances de référence n'est pas requis dans tous les cas où l'on analyse une nouvelle substance. Ces substances de référence doivent permettre d'étalonner périodiquement la méthode et de permettre la comparaison des résultats en cas d'application de méthodes différentes.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Une quantité déterminée de substance dissoute ou dispersée dans de l'eau est oxydée à l'aide de bichromate de potassium en présence d'acide sulfurique concentré (le catalyseur étant du sulfate d'argent) à reflux pendant deux heures. Le bichromate résiduel est dosé par titration à l'aide de sulfate ferreux ammoniacal titré.

Au cas où les substances contiennent du chlore, ajouter du sulfate mercurique ([1]) pour réduire l'interférence des chlorures.

1.5. CRITÈRE DE QUALITÉ

En raison des conditions arbitraires de détermination de la DCO, cette dernière est un «indicateur d'oxydabilité» à utiliser en tant que tel comme méthode pratique de mesure de matière organique.

Les chlorures peuvent interférer au cours de cet essai; des substances inorganiques réductrices ou oxydantes peuvent également interférer avec la détermination de la DCO.

Certains composés cycliques et un grand nombre de produits volatils (par exemple les acides gras inférieurs) ne sont pas totalement oxydés lors de l'essai.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparer une solution ou une dispersion préliminaire de la substance pour obtenir une DCO de 250 à 600 milligrammes par litre.

([1]) Afin d'éviter la dissémination de mercure dans l'environnement, les solutions contenant des sels de mercure doivent être traitées après utilisation.

▼B

Remarque:

Dans le cas des substances peu solubles et non dispersables, peser une quantité de substance finement pulvérisée ou à l'état liquide, correspondant à environ 5 milligrammes de DCO, et l'introduire dans l'appareil d'expérimentation avec addition d'eau.

Il est souvent avantageux, en particulier lorsqu'on a affaire à des substances peu solubles, de déterminer la demande chimique en oxygène (DCO) à l'aide d'une variante de la méthode, c'est-à-dire dans un système clos muni d'un régulateur de pression (H. Kelkenberg, 1975). Cette modification permet souvent de parvenir à quantifier des substances qui le sont difficilement en utilisant la méthode classique — par exemple l'acide acétique. Toutefois cette méthode échoue elle aussi dans le cas de la pyridine. Le fait d'augmenter jusqu'à une valeur 0,25 N (0,0416 M) la concentration de bichromate de potassium prescrite dans la référence (1) facilite la pesée directe d'une quantité de substance comprise entre 5 et 10 mg, ce qui est essentiel pour déterminer la DCO de substances faiblement hydrosolubles [référence (2)].

Dans les autres cas, déterminer la DCO en suivant toute méthode normalisée nationale ou internationale.

2. **ÉVALUATION DES DONNÉES**

Calculer la DCO contenue dans le flacon expérimental, suivant la méthode normalisée choisie, et convertir en grammes de DCO par gramme de substance d'essai.

3. **RÉSULTATS**

La méthode de référence utilisée doit être indiquée.

La demande chimique en oxygène sera la moyenne d'au moins trois mesures. Il sera fait état de toutes données et observations présentant de l'intérêt pour l'interprétation des résultats, notamment en ce qui concerne les impuretés, l'état physique et les propriétés spécifiques de la substance (si elles sont connues) susceptibles d'affecter les résultats.

Mentionner si l'on a fait usage de sulfate mercurique pour réduire l'interférence des chlorures.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) Kelkenberg, H.,Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds, Chemosphere, 1984, vol. 13,169.

Exemples de méthodes normalisées:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. DÉGRADATION — DÉGRADATION ABIOTIQUE: HYDROLYSE EN FONCTION DU PH

1. MÉTHODE

Cette méthode est équivalente à la ligne directrice 111 (2004) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Les substances chimiques qui pénètrent dans les eaux de surface par différentes voies (applications directes, déperditions lors de l'épandage, drainages, élimination de déchets, effluents industriels, domestiques ou agricoles et dépôts atmosphériques) peuvent y être transformées sous l'action de processus chimiques (hydrolyse ou oxydation, par exemple), photochimiques et/ou microbiens. La ligne directrice 111 de l'OCDE décrit une méthode d'essai en laboratoire permettant d'évaluer les transformations hydrolytiques abiotiques des substances chimiques en milieux aquatiques à des valeurs de pH normalement rencontrées dans l'environnement (pH de 4 à 9), et s'appuie sur des lignes directrices existantes (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Des expériences sont menées pour déterminer: (i) le taux d'hydrolyse de la substance d'essai en fonction du pH; et (ii) l'identité ou la nature et les taux de formation et de disparition des produits d'hydrolyse auxquels les organismes peuvent être exposés. De telles études peuvent être requises pour les substances chimiques qui sont appliquées directement dans l'eau ou qui sont susceptibles d'atteindre l'environnement par les différentes voies décrites ci-dessus.

1.2. DÉFINITION ET UNITÉS

Voir annexe 2.

1.3. APPLICABILITÉ DE LA MÉTHODE

Cette méthode est globalement applicable aux substances chimiques (marquées ou non) pour lesquelles il existe une méthode analytique suffisamment sensible et précise. Elle convient également pour les composés légèrement volatils et non volatils suffisamment solubles dans l'eau. En revanche, cet essai ne peut pas être appliqué aux produits chimiques hautement volatils dans l'eau (fumigants et solvants organiques, par exemple), impossibles à maintenir en solution dans les conditions expérimentales de l'essai. De même, avec les substances trop peu solubles dans l'eau, la réalisation de cet essai peut s'avérer difficile (8).

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Des solutions aqueuses tampon stériles de différents pH (pH 4, 7 et 9) sont traitées avec la substance d'essai et incubées dans l'obscurité dans des conditions expérimentales contrôlées (à des températures constantes). Après des intervalles de temps appropriés, on analyse les solutions tampon pour déterminer la présence de la substance d'essai et des produits d'hydrolyse. Avec une substance d'essai marquée (par exemple, au ^{14}C), il est plus facile d'établir un bilan massique.

La présente méthode décrit une approche à plusieurs niveaux, dont le détail est donné dans l'annexe 1. Chaque niveau est déclenché par les résultats du niveau précédent.

▼B

1.5. INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Des substances d'essai marquées ou non peuvent être utilisées pour mesurer le taux d'hydrolyse. Les matières marquées conviennent généralement mieux pour étudier le chemin réactionnel de l'hydrolyse et établir un bilan massique. Toutefois, dans certains cas particuliers, le marquage n'est pas impératif. Le marquage au ^{14}C est recommandé, mais l'utilisation d'autres isotopes (^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, par exemple) peut aussi convenir. Autant que possible, le marquage doit être placé dans la partie la plus stable de la molécule. Par exemple, si la substance d'essai comporte un cycle, le marquage de celui-ci est requis. En revanche, pour les substances comportant deux cycles ou plus, il peut être nécessaire de procéder à des études distinctes pour évaluer le sort de chaque cycle marqué et obtenir les informations requises sur la formation des produits d'hydrolyse. La pureté de la substance d'essai doit être au moins de 95 %.

Avant de procéder à un essai d'hydrolyse, il convient de rassembler les informations suivantes sur la substance d'essai:

a) solubilité dans l'eau [méthode d'essai A.6];

b) solubilité dans les solvants organiques;

c) pression de vapeur [Méthode d'essai A.4] et/ou constante de la loi de Henry;

d) coefficient de partage n-octanol/eau [méthode d'essai A.8];

e) constante de dissociation (pK_a) [ligne directrice 112 de l'OCDE] (9);

f) vitesse de phototransformation directe et indirecte dans l'eau, le cas échéant.

Des méthodes d'analyse doivent être disponibles pour quantifier la substance d'essai et, le cas échéant, identifier et quantifier les produits d'hydrolyse dans les solutions aqueuses (voir également le point 1.7.2).

1.6. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Lorsque cela est possible, il convient d'utiliser des substances de référence pour identifier et quantifier les produits d'hydrolyse par analyse spectroscopique et chromatographique, ou autres méthodes suffisamment fines.

1.7. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.7.1. **Récupération**

L'analyse d'au moins deux solutions tampon ou de leurs extraits, immédiatement après l'ajout de la substance d'essai donne une première indication de la répétabilité de la méthode analytique et de l'uniformité de la procédure d'application de la substance d'essai. Ce sont les bilans massiques (dans le cas d'une matière marquée) qui permettent ensuite d'établir aux étapes suivantes la récupération des substances testées. La récupération des substances chimiques, marquées ou non, doit être comprise entre 90 et 110 % (7). S'il est techniquement difficile d'atteindre cette plage de valeurs, une récupération de 70 % des substances chimiques non marquées est acceptable, mais celle-ci doit faire l'objet d'une justification.

▼B

1.7.2. **Répétabilité et sensibilité de la méthode analytique**

Pour contrôler la répétabilité de la (ou des) méthode(s) analytique(s) utilisée(s) pour quantifier la substance d'essai et les produits d'hydrolyse, on peut procéder à deux analyses des mêmes solutions tampon (ou de leurs extraits) après que des produits d'hydrolyse ont été formés en quantités suffisantes pour permettre une quantification.

La méthode analytique doit être suffisamment sensible pour permettre de quantifier des concentrations de la substance d'essai jusqu'à 10 %, ou moins, de la concentration initiale. Le cas échéant, les méthodes analytiques doivent également permettre de quantifier tout produit d'hydrolyse représentant 10 % ou plus de la substance appliquée (à n'importe quel moment au cours de l'étude), et jusqu'à 25 % ou moins de sa concentration maximale.

1.7.3. **Intervalles de confiance pour les données cinétiques de l'hydrolyse**

Des intervalles de confiance doivent être calculés et présentés pour tous les coefficients de régression, constantes de vitesse, demi-vies et autres paramètres cinétiques (DT_{50}, par exemple).

1.8. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.8.1. **Matériel et appareillage**

L'étude doit être conduite dans des récipients en verre (tubes à essai, petits flacons, par exemple), et le cas échéant dans l'obscurité et dans des conditions de stérilité, sauf s'il ressort d'une information préliminaire (telle que le coefficient de partage n-octanol/eau) que la substance d'essai est susceptible d'adhérer au verre. Dans ce cas, une autre matière (le Téflon, par exemple) doit être envisagée. Les méthodes suivantes permettent également de contourner le problème de l'adhérence au verre:

— détermination de la masse de la substance d'essai et des produits d'hydrolyse fixés par adsorption au récipient d'essai,

— utilisation d'un bain à ultrasons,

— nettoyage de toute la verrerie à l'aide d'un solvant à chaque intervalle d'échantillonnage,

— utilisation de produits formulés,

— utilisation d'une quantité plus importante de cosolvant à ajouter à la substance d'essai. Dans ce dernier cas, il convient d'employer un cosolvant qui n'entraîne pas de réaction d'hydrolyse de la substance d'essai.

L'incubation des différentes solutions d'essai doit être effectuée avec des agitateurs mécaniques à bain thermorégulé ou des incubateurs à commande thermostatique.

Cette expérience nécessite du matériel courant de laboratoire, et en particulier:

— un pH-mètre,

▼B

— des instruments d'analyse [équipements de chromatographie en phase gazeuse, chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), chromatographie en couche mince, par exemple], et notamment des systèmes de détection appropriés pour l'analyse des substances radiomarquées ou non, l'application de la méthode de dilution isotopique inverse,

— des instruments d'identification (spectrométrie de masse, spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide à haute performance, résonance magnétique nucléaire, etc.),

— un compteur à scintillation liquide;

— des entonnoirs d'extraction liquide-liquide,

— des instruments pour la concentration de solutions et d'extraits (évaporateur rotatif, par exemple),

— des dispositifs de contrôle de la température (bain d'eau, par exemple).

Les réactifs chimiques sont notamment:

— des solvants organiques, de pureté analytique, tels que l'hexane, le dichlorométhane, etc.,

— du liquide de scintillation,

— des solutions tampon (voir détails point 1.8.3).

Toute la verrerie, l'eau de qualité «réactif» et les solutions tampon utilisées dans les essais d'hydrolyse doivent être stérilisées.

1.8.2. **Application de la substance d'essai**

La substance d'essai doit être appliquée sous forme de solution aqueuse dans les différentes solutions tampon (voir annexe 3). Le cas échéant, pour obtenir une dissolution adéquate, l'utilisation de petites quantités de solvants miscibles dans l'eau (acétonitrile, acétone, éthanol, par exemple) est autorisée pour assurer une application et une distribution correctes de la substance d'essai, mais la proportion ne doit normalement pas dépasser 1 % v/v. Si une concentration supérieure en solvants est envisagée (par exemple dans le cas de substances d'essai faiblement solubles), cela ne peut être autorisé que s'il est démontré que le solvant n'a aucune incidence sur l'hydrolyse de la substance d'essai.

Le recours à un produit formulé n'est pas recommandé, dans la mesure où on ne peut exclure que les ingrédients de la formulation interfèrent avec le processus d'hydrolyse. Toutefois, pour les substances d'essai faiblement solubles dans l'eau, ou celles qui adhèrent au verre (voir point 1.8.1), le recours à un produit formulé peut constituer une solution acceptable.

Une seule concentration de la substance d'essai doit être utilisée; elle ne doit pas dépasser 0,01 M ou la moitié de la concentration de saturation (voir annexe 1).

▼B

1.8.3. **Solutions tampon**

L'essai d'hydrolyse doit être réalisé aux valeurs de pH suivantes: 4, 7 et 9. À cet effet, il convient de préparer des solutions tampon avec des produits chimiques de pureté analytique et de l'eau. L'annexe 3 présente quelques systèmes tampon utiles. Il faut noter que le système tampon utilisé peut influencer la vitesse d'hydrolyse. Lorsque c'est le cas, il faut utiliser un autre système tampon ([1]).

Le pH de chaque solution tampon doit être vérifié avec un pH-mètre étalonné à la température désirée avec une précision d'au moins 0,1.

1.8.4. **Conditions d'essai**

1.8.4.1. *Température d'essai*

Les expériences d'hydrolyse doivent être menées à des températures constantes. Pour permettre l'extrapolation, il est important de maintenir la température constante à ± 0,5 °C.

Si on ne connaît pas le comportement de la substance d'essai à l'hydrolyse, il est nécessaire d'effectuer un essai préliminaire (niveau 1) à une température de 50 °C. Les essais cinétiques suivants doivent être menés à un minimum de trois températures différentes (y compris l'essai à 50 °C), à moins que l'essai préliminaire de niveau 1 n'ait mis en évidence la stabilité de la substance à l'hydrolyse. Une plage de températures allant de 10 à 70 °C est préconisée (avec de préférence au moins une température inférieure à 25 °C). Cette plage englobe la température utilisée dans le rapport d'essai (25 °C) et la plupart des températures rencontrées sur le terrain.

1.8.4.2. *Lumière et oxygène*

Tous les essais d'hydrolyse doivent être effectués à l'aide d'une méthode adéquate pour éviter les effets de photolyse. Toutes les mesures appropriées doivent être prises afin d'éviter l'oxygène (par exemple, par barbotage d'hélium, d'azote ou d'argon pendant 5 minutes avant la préparation de la solution).

1.8.4.3. *Durée de l'essai*

L'essai préliminaire doit être mené pendant 5 jours, tandis que les essais des niveaux supérieurs doivent être conduits jusqu'à 90 % de la substance d'essai, ou pendant 30 jours, au premier des deux termes échus.

1.8.5. **Exécution de l'essai**

1.8.5.1. *Essai préliminaire (niveau 1)*

L'essai préliminaire doit être réalisé à 50 ± 0,5 °C et aux pH suivants: 4, 7 et 9. Si au bout de 5 jours, on observe un taux d'hydrolyse inférieur à 10 % ($t_{0,5\ 25\ °C}$ > 1 an), la substance est considérée comme stable dans l'eau et il n'est normalement pas nécessaire d'effectuer d'autres essais. Si on sait que la substance est instable aux températures observées dans l'environnement ([2]), il n'est pas obligatoire de réaliser un essai préliminaire. La méthode analytique employée doit être suffisamment précise et sensible pour détecter une diminution de 10 % de la concentration initiale.

([1]) Mabey et Mill recommandent l'utilisation de tampons borate ou acétate de préférence à des tampons phosphate (11).

([2]) Cette information peut provenir d'autres sources, notamment des résultats d'hydrolyse de composés de structure comparable fournis par la littérature ou par d'autres essais d'hydrolyse préliminaires ou semi-quantitatifs effectués sur la substance d'essai à une étape plus précoce de son développement.

▼B

1.8.5.2. *Hydrolyse des substances instables (niveau 2)*

L'essai de niveau supérieur (avancé) doit être exécuté aux valeurs de pH auxquelles la substance d'essai est apparue instable selon la procédure définie pour l'essai préliminaire ci-avant. Les solutions tamponnées de la substance d'essai doivent alors être thermostatées aux températures choisies. Pour savoir si la réaction est du premier ordre, chaque solution doit être analysée à des intervalles de temps qui fournissent un minimum de six points espacés, se situant normalement entre 10 et 90 % d'hydrolyse de la substance étudiée. Des échantillons répétés (un minimum de deux échantillons identiques contenus dans des cuves de réaction distinctes) doivent être prélevés et leur contenu analysé à chacune des six échéances d'échantillonnage (pour un minimum de 12 points identiques). L'option consistant à utiliser un seul échantillon global d'où serait tirée chacune des aliquotes de la solution d'essai à chaque intervalle d'échantillonnage n'est pas considérée comme appropriée du fait qu'elle ne permet pas d'analyser la variabilité des données, et qu'elle peut poser des problèmes de contamination de la solution d'essai. Des essais de confirmation de la stérilité doivent être effectués à la fin de l'essai de niveau supérieur (c'est-à-dire à 90 % d'hydrolyse ou à 30 jours). Toutefois, si aucune dégradation (c'est-à-dire aucune transformation) n'est observée, les essais de stérilité ne sont pas nécessaires.

1.8.5.3. *Identification des produits d'hydrolyse (niveau 3)*

Tout produit d'hydrolyse majeur, et au minimum ceux représentant > 10 % de la dose appliquée, doit être identifié selon les méthodes analytiques appropriées.

1.8.5.4. *Essais facultatifs*

Des essais supplémentaires à des pH autres que 4, 7 et 9 peuvent être nécessaires pour les substances d'essai instables sur le plan hydrolytique. Par exemple, à des fins physiologiques, il peut s'avérer nécessaire d'effectuer un essai dans des conditions plus acides (par exemple à un pH de 1,2) à une seule température pertinente du point de vue physiologique (37 ºC).

2. **RÉSULTATS**

Les quantités de la substance d'essai et des produits d'hydrolyse, le cas échéant, doivent être exprimées en pourcentage de la concentration initiale appliquée et, lorsque cela est possible, en mg/l pour chaque intervalle d'échantillonnage, ainsi que pour chaque pH et température d'essai. En outre, lorsqu'une substance d'essai marquée a été utilisée, un bilan massique doit être fourni en pourcentage de la concentration initiale appliquée.

Une présentation graphique des logarithmes des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps doit être présentée. Tous les produits d'hydrolyse majeurs, et au minimum ceux représentant > 10 % de la dose appliquée, doivent être identifiés, et les logarithmes de leurs concentrations doivent être présentés de la même manière que pour la substance mère, de façon à mettre en évidence leurs vitesses de formation et de disparition.

▼B

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Des déterminations plus précises des demi-vies ou des valeurs de DT_{50} doivent être obtenues par application des calculs de modèles cinétiques appropriés. Les valeurs de demi-vie et/ou de DT_{50} (y compris les limites de confiance) doivent être précisées pour chaque pH et chaque température, avec une description du modèle utilisé, l'ordre de réaction cinétique et le coefficient de détermination (r^2). Le cas échéant, ces calculs doivent être appliqués aux produits d'hydrolyse.

Pour les études menées à différentes températures, les constantes de la vitesse d'hydrolyse de pseudo-premier ordre (k_{obs}) doivent être décrites comme une fonction de température. Le calcul doit être basé sur une séparation des k_{obs} en constantes de vitesse pour les catalyses acides, neutres et basiques (respectivement k_H, k_{neutre}, et k_{OH}) et sur l'équation d'Arrhenius:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutre} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutre,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

où A_i et B_i sont des constantes de régression et d'interception, respectivement, des lignes de meilleur ajustement générées à partir de la régression linéaire ln k_i sur la réciproque de la température absolue en Kelvin (T). En utilisant la relation d'Arrhenius pour les catalyses acides, neutres et basiques, il est possible de calculer les constantes de pseudo-premier ordre, et ainsi les demi-vies, pour d'autres températures pour lesquelles la détermination expérimentale directe d'une constante de vitesse ne peut être pratiquée (10).

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATIONS DES RÉSULTATS

La plupart des réactions d'hydrolyse affichent une vitesse de réaction apparente de premier ordre, et par conséquent les demi-vies sont indépendantes de la concentration (voir l'équation 4 dans l'annexe 2). Cette caractéristique permet généralement d'appliquer les résultats obtenus en laboratoire, déterminés entre 10^{-2} et 10^{-3} M, aux conditions dans l'environnement ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Mabey et Mill (11) font état de plusieurs exemples de bonne concordance entre les taux d'hydrolyse mesurés dans l'eau pure et dans les eaux naturelles, pour un ensemble de substances chimiques, à condition que le pH et la température aient bien été mesurés.

3. **RAPPORTS**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir au moins les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nom commun, nom chimique, numéro CAS, formule structurale (montrant la position du radiomarqueur, le cas échéant) et propriétés physico-chimiques pertinentes (voir point 1.5),

— pureté (impuretés) de la substance d'essai,

— pureté radiochimique des substances marquées et activité molaire (s'il y a lieu).

▼B

— Solutions tampon:

— dates et modalités de préparation,

— tampons et eaux utilisés,

— molarité et pH des solutions tampon.

Conditions d'essai:

— dates de réalisation des études,

— quantité de substance d'essai appliquée,

— méthodes et solvants utilisés (types et quantité) pour l'application de la substance d'essai,

— volume des solutions tamponnées de substances d'essai incubées,

— description du système d'incubation utilisé,

— pH et température au cours de l'étude,

— temps de prélèvement,

— méthode(s) d'extraction,

— méthodes de quantification et d'identification de la substance d'essai et de ses produits d'hydrolyse dans les solutions tampon,

— nombre d'essais identiques.

Résultats:

— répétabilité et sensibilité des méthodes analytiques utilisées,

— récupérations (les pourcentages pour une étude correcte sont données au point 1.7.1),

— résultats et moyennes des essais identiques, présentés sous forme de tableaux,

— bilan massique au cours et à la fin des études (en cas d'utilisation d'une substance marquée),

— résultats de l'essai préliminaire,

— discussion et interprétation des résultats,

— intégralité des données et figures originales.

Les informations suivantes sont obligatoires uniquement si une vitesse d'hydrolyse est déterminée:

— tracés des concentrations en fonction du temps pour les substances d'essai et, le cas échéant, pour les produits d'hydrolyse à chaque valeur de pH et température,

— tableaux des résultats de l'équation d'Arrhenius pour la température 20 °C/25 °C, avec pH, constante [h^{-1} ou $jour^{-1}$], demi-vie ou DT_{50}, températures [en °C] y compris les limites de confiance et les coefficients de corrélation (r^2) ou toute information comparable,

— chemin réactionnel d'hydrolyse proposé.

▼B

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) OCDE (1981). Hydrolyse en fonction du pH. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Nº 111, adoptée le 12 mai 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 ºC. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Guide d'homologation des pesticides au Canada: chimie et devenir dans l'environnement.

(4) Union européenne (UE) (1995), directive 2001/36/CE de la Commission du 16 mai 2001 portant modification de la directive 91/414/CEE du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. Annexe V: Devenir et comportement dans l'environnement

(5) Commission néerlandaise pour l'enregistrement des pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr.23.

(9) OCDE (1993). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Paris. OCDE (1994-2000): 6e au 1 1e addenda aux Lignes directrices pour les essais de produits chimiques.

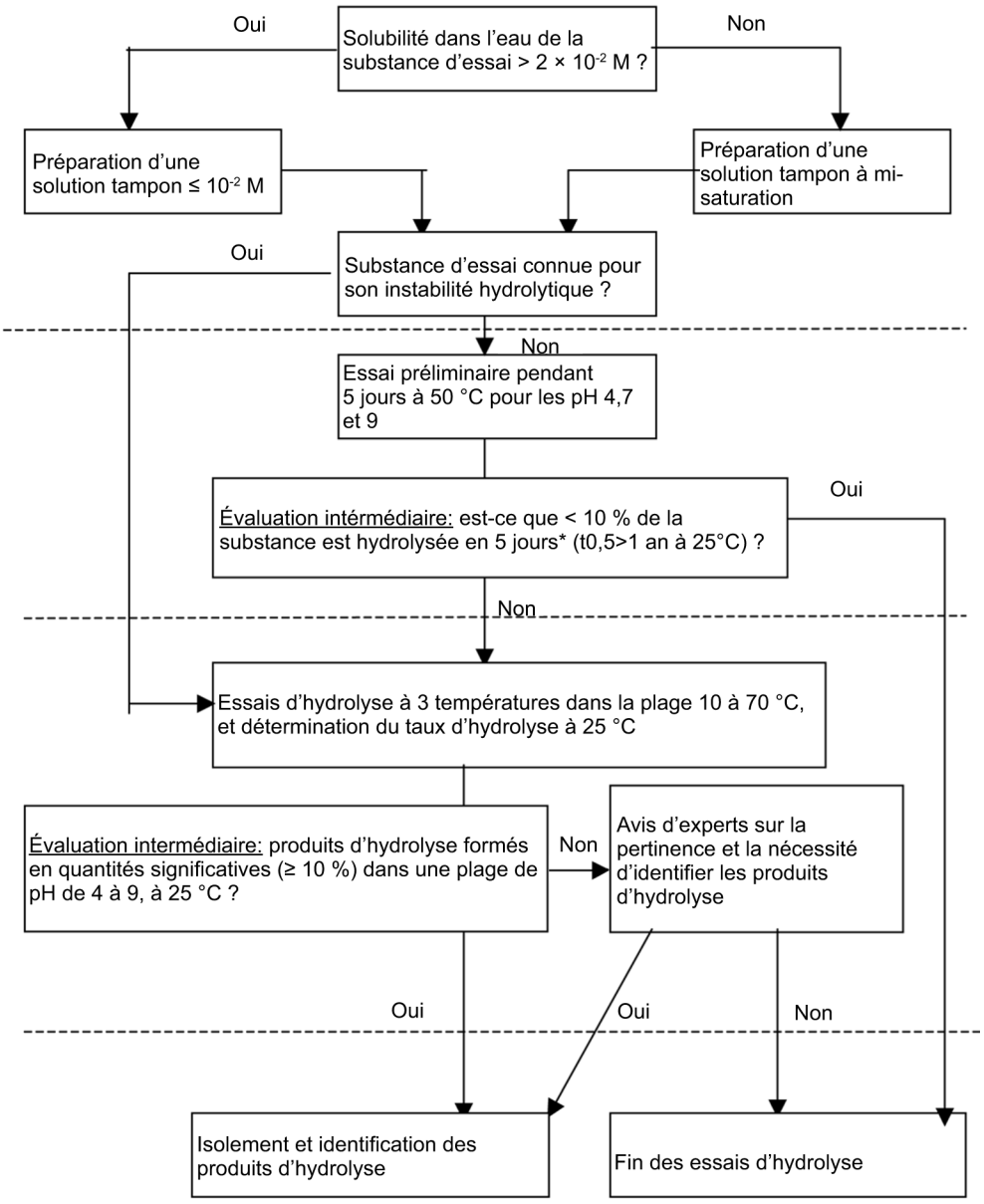
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

Annexe 1

Plan de l'essai d'hydrolyse par niveaux



* 10 % d'hydrolyse d'une substance d'essai à 50 °C correspond à une demi-vie de 30 jours approximativement, ce qui correspond à une valeur de 1 an à 25 °C approximativement

▼B

Annexe 2

Définitions et unités

Les unités du système international d'unités (SI) doivent être utilisées.

Substance d'essai: toute substance, qu'il s'agisse du composé parent ou des produits de transformation.

Produits de transformation: toutes les substances résultant des réactions de transformation biotique ou abiotique de la substance d'essai.

Produits d'hydrolyse: toutes les substances résultant des réactions de transformation hydrolytique de la substance d'essai.

L'hydrolyse consiste en la réaction d'une substance d'essai RX avec l'eau, avec échange net du groupe X contre le groupe OH selon la réaction:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Dans ce processus simplifié, la vitesse à laquelle la concentration de RX décroît est donnée par:

vitesse = $k\ [H_2O]\ [RX]$ réaction du second ordre

ou

vitesse = $k\ [RX]$ réaction du premier ordre

selon la phase qui détermine la vitesse. Du fait de la présence d'eau en large excès par rapport à la substance d'essai, ce type de réaction est habituellement décrit comme une réaction de premier ordre, dans laquelle la constante de vitesse observée est donnée par la relation:

$$ko_{bs} = k[H_2O] \qquad [2]$$

et peut être déterminée à partir de l'expression (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

où

t = temps

et C_o, C_t = concentrations de RX au temps 0 et au temps t.

Les unités de cette constante ont les dimensions de $(temps)^{-1}$ et la demi-vie de la réaction (temps au bout duquel 50 % de RX ont réagi) est donnée par:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

La demi-vie ($t_{0,5}$) est le temps requis pour obtenir 50 % d'hydrolyse d'une substance d'essai lorsque la réaction peut être décrite comme une cinétique du premier ordre. La demi-vie est indépendante de la concentration.

(*) Si le tracé des transformations logarithmiques en fonction du temps n'indique pas une fonction linéaire (ce qui équivaut à une vitesse de réaction du premier ordre), alors l'utilisation de l'équation [3] ne convient pas pour déterminer la constante de vitesse d'hydrolyse de la substance d'essai.

▼B

La DT50 (Disappearance time 50) correspond au laps de temps au bout duquel la concentration de la substance d'essai est réduite de 50 pour cent. Cette valeur est différente de la demi-vie ($t_{0,5}$) lorsque la réaction ne suit pas une cinétique du premier ordre.

Estimation de k à différentes températures

Lorsque les constantes de vitesse sont connues pour deux températures, les constantes de vitesse à d'autres températures peuvent être calculées en utilisant l'équation d'Arrhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ or } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Un tracé de ln k en fonction de 1/T donne une ligne droite de pente -E/R

où:

k = constante de vitesse, mesurée à différentes températures

E = énergie d'activation [kJ/mol]

T = température absolue [K]

R = constante des gaz [8,314 J/mol*K]

L'énergie d'activation est calculée par analyse de régression ou par l'équation suivante:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

où: $T_2 > T_1$.

▼B

Annexe 3

Systèmes tampon

A. **CLARK ET LUBS:**

Mélanges tampons de CLARK et LUBS (*)

Composition	pH
HCl 0,2 N et KCl 0,2 N À 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl dil. to 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl dil. à 100 ml	2,2
Biphtalate de potassium 0,1 M + HCl 0,1 N à 20 °C	
46,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	2,2
39,60 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	2,4
32,95 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	2,6
26,42 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	2,8
20,32 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	3,0
14,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	3,2
9,90 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	3,4
5,97 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	3,6
2,63 ml HCl 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	3,8
Biphtalate de potassium 0,1 M + NaOH 0,1 N à 20 °C	
0,40 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	4,0
3,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	4,2
7,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	4,4
12,15 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	4,6
17,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	4,8

(*) Ajouter de petits cristaux de thymol ou d'une substance comparable pour éviter la croissance de moisissures.

▼B

Composition	pH
23,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	5,0
29,95 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	5,2
35,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	5,4
39,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	5,6
43,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	5,8
45,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biphtalate à 100 ml	6,0
Phosphate monopotassique 0,1 M + NaOH 0,1 N à 20 °C	
5,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	6,0
8,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	6,2
12,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	6,4
17,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	6,6
23,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	6,8
29,63 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	7,0
35,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	7,2
39,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	7,4
42,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	7,6
45,20 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	7,8
46,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml phosphate à 100 ml	8,0
H3B03 0,1 M dans KCl 0,1 M + NaOH 0,1 N à 20 °C	
2,61 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	7,8
3,97 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	8,0
5,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	8,2
8,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	8,4
12,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	8,6
16,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	8,8
21,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	9,0
26,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	9,4
36,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	9,6
40,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	9,8
43,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acide borique à 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF ET VLEESCHHOUWER:**

Tampons citrate de KOLTHOFF et VLEESCHHOUWER

Composition	pH
Citrate monopotassique 0,1 M et HCl 0,1 N à 18 ºC (*)	
49,7 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	2,2
43,4 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	2,4
36,8 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	2,6
30,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	2,8
23,6 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	3,0
17,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	3,2
10,7 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	3,4
4,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	3,6
Citrate monopotassique 0,1 M et NaOH 0,1 N à 18 ºC (*)	
2,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	3,8
9,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	4,0
16,3 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	4,2
23,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	4,4
31,5 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	4,6
39,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	4,8
46,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	5,0
54,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	5,2
61,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	5,4
68,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	5,6
74,4 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	5,8
81,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrate à 100 ml	6,0

(*) Ajouter de petits cristaux de thymol ou d'une substance comparable pour éviter la croissance de moisissures.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Mélanges de borate de SÖRENSEN

Composition		Sörensen 18 °C	Walbum, pH à		
ml Borax	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
Borax 0,05 M + HCl 0,1 N					
	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
Borax 0,05 M + NaOH 0,1 N					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Mélanges de phosphates de SÖRENSEN

Composition	pH
Phosphate monopotassique 0,0667 M + phosphate disodique 0,0667 M à 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4+ 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH2PO4+ 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH2PO4+ 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4+ 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4+ 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4+ 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4+ 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4+ 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4+ 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4+ 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4+ 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4+ 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4+ 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4+ 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4+ 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4+ 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8 TOXICITÉ POUR LES VERS DE TERRE

ESSAI SUR SOL ARTIFICIEL

1. MÉTHODE

1.1. INTRODUCTION

Dans cet essai de laboratoire, la substance d'essai est ajoutée à un sol artificiel dans lequel les vers sont placés pendant 14 jours. Au bout de cette période (et facultativement au bout de 7 jours), l'effet létal de la substance sur les vers de terre est examiné. La méthode permet de déterminer assez rapidement l'effet de l'absorption dermique et de l'ingestion des produits chimiques sur les vers de terre.

1.2. DÉFINITION ET UNITÉ

CL_{50}: concentration d'une substance considérée comme responsable de la mort de 50 % des animaux d'expérience pendant la durée de l'essai.

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Une substance de référence est utilisée périodiquement pour démontrer que la sensibilité du système n'a pas changé de façon significative.

La substance de référence recommandée est le chloracétamide de qualité analytique.

1.4. PRINCIPE DE L'ESSAI

Le sol étant un milieu variable, on utilise pour cet essai un sol limoneux artificiel soigneusement défini. Des vers de terre adultes de l'espèce *Eisenia foetida* (voir note en appendice) sont placés dans un sol artificiel défini, traité par différentes concentrations de la substance d'essai. Le contenu des récipients est étalé sur un plateau 14 jours (et facultativement 7 jours) après le début de l'essai et, pour chaque concentration, les vers de terre survivants sont comptés.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

L'essai est conçu pour être aussi reproductible que possible au point de vue du substrat et de l'organisme. Si la mortalité des témoins dépasse 10 % à la fin de l'essai, celui-ci n'est pas valide.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. *Matériel*

1.6.1.1. Substrat

On utilise comme substrat de base un sol artificiel bien défini.

a) Substrat de base (les pourcentages sont exprimés en poids sec):

— 10 % de tourbe à sphaignes (de pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0, ne contenant pas de restes de plante visibles et finement broyée),

▼B

— 20 % d'argile kaolinique contenant si possible plus de 50 % de kaolinite,

— environ 69 % de sable quartzique industriel (essentiellement du sable fin contenant plus de 50 % de particules de granulométrie comprise entre 0,05 et 0,2 mm). Si la substance n'est pas suffisamment dispersible dans l'eau, 10 g par récipient doivent être mis de côté pour être mélangés ultérieurement à la substance à tester,

— environ 1 % de carbonate de calcium ($CaCO_3$) pulvérisé, chimiquement pur, pour ajuster le pH à 6,0 ± 0,5.

b) Substrat d'essai:

Le substrat pour les essais contient le substrat de base, la substance d'essai et de l'eau désionisée.

Le teneur en eau est d'environ 25 à 42 % du poids sec du substrat de base. La teneur en eau du substrat est déterminée par séchage d'un échantillon à 105 °C, jusqu'à ce que le poids reste constant. Le critère clé est que le sol artificiel doit être humidifié jusqu'à saturation. Le mélange doit être effectué soigneusement, de manière à obtenir une répartition uniforme de la substance d'essai et du substrat. La façon dont la substance d'essai est introduite dans le substrat doit être indiquée.

c) Substrat témoin:

Le substrat témoin contient le substrat de base et de l'eau. Si l'on utilise un additif, un substrat témoin supplémentaire doit contenir la même quantité d'additif.

1.6.1.2. Récipients

Récipients en verre d'une capacité d'environ 1 litre (convenablement recouverts de couvercles en plastique, de coupelles ou d'une feuille de plastique avec trous d'aération), remplis d'une quantité de substrat d'essai ou de substrat témoin humide équivalant à 500 g de substrat sec.

1.6.2. *Conditions expérimentales*

Les récipients doivent être déposés dans des locaux climatisés dont la température est maintenue à 20 °C ± 2 °C, sous éclairement continu compris entre 400 et 800 lux.

La durée de l'essai est de 14 jours, mais la mortalité peut être déterminée 7 jours après le début de l'essai.

1.6.3. *Méthode*

Concentrations

Les concentrations de la substance d'essai sont exprimées en poids de substance par unité de substrat de base sec (mg/kg).

Essai de sélection des concentrations à utiliser

La gamme des concentrations correspondant à des taux de mortalité allant de 0 à 100 % peut être déterminée par un essai renseignant sur l'intervalle de concentrations à utiliser dans l'essai définitif.

▼B

La substance doit être testée aux concentrations suivantes: 1 000, 100, 10, 1, 0,1 mg de substance/kg de substrat (poids sec).

Si un essai définitif complet est effectué, un lot par concentration et un lot témoin contenant chacun dix vers devraient être suffisants pour l'essai de sélection des concentrations à utiliser.

Essai définitif

Les résultats de l'essai de sélection des concentrations à employer sont utilisés pour choisir au moins 5 concentrations dans une série géométrique couvrant exactement l'intervalle de 0 à 100 % de mortalité et dans un rapport constant inférieur ou égal à 1,8.

Un essai utilisant cette série de concentrations devrait permettre d'évaluer avec la plus grande précision possible la valeur de la CL_{50} et de ses limites de confiance.

Pour l'essai définitif, on utilise au moins 4 lots par concentration et 4 lots témoins contenant chacun 10 vers. Les résultats de ces lots en parallèle sont exprimés sous la forme de moyenne et d'écart type.

Lorsque deux concentrations consécutives dans un rapport de 1,8 ne donnent que 0 % et 100 % de mortalité, ces deux valeurs suffisent à indiquer l'intervalle dans lequel se situe la CL_{50}.

Mélange du substrat de base et de la substance d'essai

Le substrat ne devrait pas, si possible, contenir d'autres additifs que de l'eau. Immédiatement avant le début de l'essai, une émulsion ou une dispersion de la substance d'essai dans de l'eau désionisée ou dans un autre solvant est mélangée au substrat de base ou uniformément projetée à sa surface à l'aide d'un pulvérisateur de chromatographie ou du même type.

Si elle est insoluble dans l'eau, la substance d'essai peut être dissoute dans le plus petit volume possible d'un solvant organique approprié (par exemple hexane, acétone ou chloroforme).

Seuls des agents très volatils peuvent être utilisés pour solubiliser, disperser ou émulsifier la substance d'essai. Avant emploi, le substrat doit être aéré. La quantité d'eau évaporée doit être remplacée. Le substrat témoin doit contenir la même quantité de tout additif.

Si la substance d'essai n'est pas soluble, dispersible ou émulsifiable dans des solvants organiques, 10 g d'un mélange de sable quartzique finement broyé et d'une quantité de substance d'essai correspondant à la dose nécessaire pour traiter 500 g de sol artificiel sec sont mélangés à 490 g de substance d'essai sèche.

Pour chaque lot, une quantité de substrat humide équivalant à 500 g de poids sec est placée dans chaque récipient en verre et 10 vers de terre ayant été conditionnés pendant 24 heures dans un substrat de base humide analogue, puis rincés rapidement, l'eau excédentaire étant absorbée sur un papier-filtre sont placés à la surface du substrat.

▼B

Les récipients sont recouverts de couvercles, de coupelles ou d'une feuille en plastique perforé afin d'éviter le dessèchement du substrat et ils sont maintenus dans les conditions d'essai pendant 14 jours.

Les évaluations doivent être faites au bout de 14 jours (et facultativement de 7 jours). Le substrat est étalé sur une plaque de verre ou d'acier inoxydable. Les vers de terre sont examinés et le nombre de vers de terre survivants est déterminé. Les vers de terre sont considérés comme morts s'ils ne réagissent pas à un léger stimulus mécanique appliqué à leur extrémité antérieure.

Lorsque l'examen est fait au bout de 7 jours, le récipient est à nouveau rempli de substrat et les vers de terre survivants sont replacés sur le même substrat.

1.6.4. *Organismes d'expérience*

Les organismes d'expérience doivent être des *Eisenia foetida* adultes (voir note en appendice) (âgés d'au moins 2 mois, avec clitellum) — poids humide: 300 à 600 mg (pour la méthode d'élevage, voir appendice).

2. RÉSULTATS

2.1. TRAITEMENT ET ÉVALUATION DES RÉSULTATS

Les concentrations de la substance d'essai sont consignées avec les pourcentages correspondants de vers de terre morts.

Si les données sont adéquates, la valeur de la CL_{50} et les intervalles de confiance ($p = 0,05$) sont déterminées à l'aide de méthodes standards (Litchfield et Wilcoxon, 1949 ou méthode équivalente). La CL_{50} doit être exprimée en milligrammes de la substance d'essai par kilogramme de substrat (poids sec).

Dans le cas où la pente de la courbe est trop accentuée pour permettre le calcul de la CL_{50}, il suffira de procéder à une estimation graphique de cette valeur.

Lorsque deux concentrations consécutives dans un rapport de 1,8 ne donnent que 0 ou 100 % de mortalité, ces deux valeurs suffisent à indiquer l'intervalle dans lequel se situe la CL_{50}.

3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

— attestation de conformité de l'essai aux critères de qualité énoncés ci-dessus,

— essai effectué (essai de détermination des ordres de grandeur et/ou essai définitif),

— description précise des conditions d'essai ou attestation de conformité de l'essai, tout écart par rapport à la méthode étant indiqué,

— description précise de la manière dont la substance d'essai a été mélangée au substrat de base,

— information sur les organismes soumis à l'essai (espèce, âge, poids moyen et gamme de poids, conditions d'élevage, fournisseur),

▼B

— méthode appliquée pour déterminer la CL_{50},

— résultat de l'essai, avec toutes les données utilisées,

— description des symptômes observés ou des modifications du comportement des organismes soumis à l'essai,

— mortalité chez les témoins,

— CL_{50} ou concentration maximale testée n'ayant pas causé de mortalité et concentration minimale testée ayant causé 100 % de mortalité au bout de 14 jours (et facultativement de 7 jours),

— tracé de la courbe concentrations/réponses,

— résultats obtenus avec la substance de référence, au cours du présent essai ou de contrôles antérieurs de la qualité.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice 207, décision du Conseil C(81) 30 final.

(2) Edwards, C, A. and Lofty, 1977, *Biology of Earthworms*, Chapman and Hall, London, 331 pages.

(3) Bouche, M- B., 1972, Lombriciens de France, Écologie et Systématique, Institut national de la recherche agronomique, 671 pages.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose-effect experiments, J. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, 99 pages.

(5) Commission des Communautés européennes, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt fur Land- und Forsrwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag «Toxizitäts-test am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden», in: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Appendice

Élevage des vers avant les essais

Trente à cinquante vers adultes sont introduits dans un récipient d'élevage contenant du substrat frais et en sont retirés au bout de 14 jours. Ces animaux peuvent être utilisés pour de nouveaux lots d'élevage. Les vers de terre sortis des cocons sont utilisés pour les essais lorsqu'ils sont arrivés à maturité (soit au bout de deux ou trois mois dans les conditions prescrites).

Conditions d'élevage

Local climatisé:	température: 20 °C ± 2 °C, de préférence sous éclairement continu (intensité 400 à 800 lux).
Récipient d'élevage:	récipients creux d'une capacité de 10 à 20 litres.
Substrat:	l'*Eisenia foetida* peut être élevé avec différents excréments animaux. Il est recommandé d'utiliser comme milieu d'élevage un mélange en volume de 50 % de fumier de vache ou de cheval et de 50 % de tourbe. Le milieu doit avoir un pH d'environ 6 ou 7 (ajusté avec du carbonate de calcium) et une faible conductivité ionique (moins de 6 mmhos ou une concentration de sel de 0,5 %). Le substrat doit être humide, mais ne doit pas être trop mouillé. Outre la méthode décrite ci-dessus, d'autres méthodes peuvent être utilisées.

Note: Il existe deux races d'*Eisenia foetida* que certains taxonomistes ont séparées en espèces (Bouche, 1972). Celles-ci sont morphologiquement semblables, mais l'une, *Etsenia foetida foetida*, se distingue par des rayures ou des bandes sur les segments, tandis que l'autre, *Eisenia foetida andrei*, n'en a pas et a une couleur rougeâtre aux nuances variées. Il convient d'utiliser si possible *Eisenia foetida andrei*. D'autres espèces peuvent être utilisées si l'on dispose de la méthodologie nécessaire.

▼B

C.9 **BIODÉGRADATION**

ESSAI DE ZAHN ET WELLENS

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode a pour but d'évaluer la biodégradabilité totale potentielle de substances organiques non volatiles solubles dans l'eau lorsqu'elles sont exposées à des concentrations relativement élevées de micro-organismes lors d'un essai statique.

Il peut y avoir adsorption physico-chimique sur les solides en suspension, et il convient d'en tenir compte lors de l'interprétation des résultats (voir 3.2).

Les substances à étudier sont utilisées dans des concentrations correspondant à des valeurs de COD allant de 50 à 400 mg/litre ou à des valeurs de DCO situées entre 100 et 1 000 mg/litre (COD = carbone organique dissous; DCO = demande chimique en oxygène). Ces concentrations relativement élevées assurent une bonne fiabilité analytique. Les composés possédant des propriétés toxiques peuvent ralentir ou empêcher le processus de dégradation.

Dans cette méthode, on emploie la mesure de la concentration du carbone organique dissous ou la demande chimique en oxygène pour évaluer la biodégradation finale de la substance d'essai.

L'emploi simultané d'une méthode analytique spécifique peut permettre d'évaluer la biodégradation primaire de la substance (disparition de la structure chimique initiale).

La méthode n'est applicable qu'aux substances organiques qui, à la concentration utilisée dans l'essai:

— sont solubles dans l'eau dans les conditions de l'essai,

— ont une pression de vapeur négligeable dans les conditions de l'essai,

— n'ont pas d'effets inhibiteurs vis-à-vis des bactéries,

— ne font pas l'objet d'une adsorption importante sur l'appareillage,

— ne disparaissent pas de la solution par formation de mousse.

Il est utile de connaître les proportions relatives des principaux éléments constitutifs de la substance d'essai pour interpréter les résultats obtenus, notamment lorsque ceux-ci sont peu élevés ou marginaux.

La connaissance de la toxicité de la substance vis-à-vis des micro-organismes peut être intéressante pour interpréter les résultats peu élevés et pour choisir les concentrations d'essai appropriées.

▼B

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Le taux de dégradation obtenu à la fin de l'essai constitue la «biodégradabilité en essai de Zahn et Wellens»:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

dans laquelle:

D_T = biodégradation (%) au temps T,

C_A = valeurs du COD (ou de la DCO) du mélange d'essai mesurées 3 heures après le début de l'essai (mg/l) (COD = carbone organique dissous; DCO = demande chimique en oxygène),

C_T = valeurs du COD ou de la DCO du mélange d'essai au moment du prélèvement de l'échantillon (mg/l),

C_B = valeur du COD ou de la DCO du témoin au moment du prélèvement (mg/l),

C_{BA} = valeur du COD ou de la DCO du témoin mesurée 3 heures après le début de l'essai (mg/l).

Le taux de dégradation obtenu est arrondi au pourcentage entier le plus proche.

Le pourcentage de dégradation est défini comme étant le pourcentage de disparition du COD (ou de la DCO) de la substance d'essai.

La différence entre la valeur mesurée après 3 heures et la valeur initiale calculée ou, mieux, mesurée, peut donner des renseignements intéressants sur l'élimination de la substance (voir 3.2: Interprétation des résultats).

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Des substances de référence peuvent parfois être utiles lors de l'étude de substances nouvelles; toutefois, des substances de référence spécifiques ne peuvent pas encore être recommandées.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

On introduit la boue activée, les substances nutritives minérales et une solution aqueuse de la substance à examiner constituant la seule source de carbone dans un récipient en verre de 1 à 4 litres muni d'un agitateur et d'un aérateur. Le mélange est agité et aéré à une température de 20 à 25 °C, en lumière diffuse ou en chambre noire pendant une période pouvant aller jusqu'à 28 jours. Le processus de dégradation est suivi en déterminant la valeur du COD (ou de la DCO) dans la solution filtrée, quotidiennement ou selon une autre périodicité appropriée. Après chaque période, le COD (ou la DCO) éliminé est rapporté à la valeur constatée 3 heures après le début de l'essai et exprimé en pourcentage de biodégradation; cela constitue la mesure du taux de dégradation à ce moment. Le résultat rapporté graphiquement en fonction du temps donne la courbe de biodégradation.

Si on utilise une méthode analytique spécifique, on peut mesurer les variations de la concentration de la molécule originale dues à la biodégradation (biodégradabilité primaire).

▼B

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

La reproductibilité de la méthode a été reconnue satisfaisante lors d'un essai d'intercomparaison

La sensibilité de la méthode est largement déterminée par la variabilité du témoin et, dans une moindre mesure, par la précision de la détermination du carbone organique dissous et de la concentration de la substance dans le milieu d'essai.

1.6. DESCRIPTION

1.6.1. *Préparations*

1.6.1.1. Réactifs

Eau: eau potable contenant moins de 5 mg/l de carbone organique. La concentration totale d'ions calcium et magnésium ne doit pas dépasser 2,7 mmoles/l; si ce n'est pas le cas, corriger la dilution par addition d'eau déionisée ou distillée.

Acide sulfurique, pureté analytique (P.A.):	50 g/l
Solution d'hydroxyde de soude P.A.:	40 g/l
Solution nutritive minérale: dissoudre dans un litre d'eau déionisée:	
Chlorure d'ammonium, NH_4C1, P.A.:	38,40 g
Dihydrogénophosphate de sodium, $NaH_2PO_4.2H_2O$, P.A.:	33,40 g
Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4, P.A.:	8,50 g
Monohydrogénophosphate de potassium, K_2HPO_4, P.A.:	21,75 g

Le mélange sert à la fois de milieu nutritif et de solution tampon.

1.6.1.2. Appareillage

Récipients de verre contenant entre 1 et 4 litres (par exemple récipients cylindriques).

Dispositif d'agitation comprenant un agitateur en verre ou en métal fixé à une tige appropriées (l'agitateur doit décrire un mouvement rotatif à environ 5 à 10 cm au-dessus du fond du récipient). On peut utiliser également un agitateur magnétique muni d'un barreau de 7 à 10 cm de long.

Tube d'aération en verre de 2 à 4 mm de diamètre intérieur. L'ouverture du tube doit se trouver à environ 1 cm au-dessus du fond du récipient.

Centrifugeuse (environ 3 550 g).

pH-mètre.

Appareil pour la mesure de l'oxygène dissous.

Filtres papier.

▼B

Appareil de filtration sur membranes.

Membranes filtrantes, porosité: 0,45 μm. Les membranes filtrantes conviennent si elles ne libèrent pas de carbone et n'absorbent pas la substance au stade de la filtration.

Matériel d'analyse pour le dosage du carbone organique et la détermination de la demande chimique en oxygène.

1.6.1.3. Préparation de l'inoculum

Laver la boue activée provenant d'une station d'épuration biologique par centrifugations ou décantations successives dans l'eau utilisée pour l'essai (voir supra).

La boue activée doit avoir les caractéristiques requises. Cette boue peut être obtenue dans une station d'épuration en bon état de fonctionnement. Pour disposer d'autant d'espèces et de souches différentes de bactéries que possible, il peut être préférable de mélanger des inoculums provenant de sources différentes (par exemple de différentes stations d'épuration, d'extraits de sol, des eaux de rivière, etc.). Le mélange doit être traité comme indiqué plus haut.

Pour le contrôle d'activité de la boue activée, voir infra «Contrôle fonctionnel».

1.6.1.4. Préparation des solutions

Dans le récipient d'essai, ajouter 500 ml d'eau (voir supra), 2,5 ml/litre de solution minérale nutritive et une quantité de boues activées correspondant à 0,2-1,0 g/l de matière sèche dans le mélange final. Ajouter suffisamment de solution stock de la substance à tester de façon à obtenir dans le mélange final une concentration de COD de 50 à 400 mg/l. Les valeurs correspondantes de DCO sont 100-1 000 mg/l. Ajouter de l'eau jusqu'à un volume total de 1 à 4 litres. Le volume total choisi dépend du nombre d'échantillons à prélever pour la détermination du COD ou de la DCO et du volume nécessaire pour l'analyse.

Normalement, on considère 2 litres comme un volume satisfaisant. Pour chaque série d'essais, préparer au moins un récipient témoin (blanc) contenant uniquement de la boue activée et la solution minérale nutritive, diluées avec de l'eau jusqu'au même volume total que dans les récipients d'essai.

1.6.2. *Mode opératoire*

Les récipients d'essai sont agités au moyen d'agitateurs magnétiques ou à hélice, en lumière diffuse ou en chambre noire, a une température de 20 à 25 ºC. L'aération est assurée par injection d'air comprimé purifié par un filtre d'ouate et si nécessaire par un flacon laveur. Veiller à ce que la boue ne décante pas et que la concentration d'oxygène ne tombe pas au-dessous de 2 mg/l.

Vérifier le pH à intervalles réguliers (par exemple quotidiennement) et l'amener le cas échéant à pH 7-8.

▼B

Les pertes dues à l'évaporation sont compensées juste avant chaque prélèvement d'échantillon au moyen d'eau déionisée ou distillée. Une bonne méthode consiste à marquer le niveau du liquide sur le récipient avant de commencer l'essai. De nouvelles marques sont faites après chaque prélèvement (sans aération ni agitation). Les premiers échantillons sont toujours prélevés 3 heures après le début de l'essai de façon à permettre de détecter une adsorption de la substance d'essai sur la boue activée.

Pour suivre la dégradation de la substance d'essai, effectuer un dosage de COD ou de DCO quotidiennement ou à tout autre intervalle régulier. Filtrer les échantillons provenant du récipient d'essai et du récipient témoin sur un papier filtre soigneusement lavé. Éliminer les 5 premiers millilitres du filtrat de la solution d'essai. Les boues difficilement filtrables peuvent être éliminées au préalable par une centrifugation de 10 minutes. Les déterminations de COD et de DCO sont faites au moins en double. La durée des essais va jusqu'à 28 jours.

Note: Les échantillons restant troubles sont filtrés sur membranes. Celles-ci ne doivent ni libérer ni adsorber de matières organiques.

Contrôle fonctionnel des boues activées

Pour chaque série d'essais, on peut prévoir un récipient contenant une substance connue, de façon à pouvoir vérifier la capacité fonctionnelle de la boue activée. Le diéthylèneglycol s'est révélé utile à cette fin.

Adaptation

Si des analyses sont effectuées à des intervalles relativement courts (par exemple quotidiennement), la courbe de dégradation peut faire clairement apparaître un phénomène d'adaptation (voir figure 2). L'essai ne devrait donc pas être commencé immédiatement avant un week-end.

Si l'adaptation se produit dans les derniers jours de l'essai, celui-ci peut être prolongé jusqu'à dégradation complète.

Note: Si une meilleure connaissance du comportement de la boue adaptée est nécessaire, on exposera à nouveau la même boue activée à la même substance d'essai suivant le mode opératoire ci-après:

Arrêter l'agitateur et l'aérateur et laisser décanter la boue activée. Éliminer le surnageant, remplir d'eau jusqu'à atteindre 2 litres, agiter pendant 15 minutes et laisser à nouveau décanter. Éliminer à nouveau le surnageant, et utiliser la boue restante pour répéter l'essai avec la même substance conformément aux paragraphes 1.6.1.4 et 1.6.2 ci-dessus. La boue activée peut également être séparée par centrifugation plutôt que par décantation.

La boue adaptée peut être mélangée avec de la boue fraîche pour atteindre 0,2 à 1 g de matière sèche par litre.

▼B

Analyses

En général, on filtre les échantillons sur papier-filtre soigneusement lavé à l'eau déionisée.

Les échantillons qui restent troubles sont filtrés sur membranes (0,45 μm).

Déterminer la concentration de COD en double dans les filtrats des échantillons (éliminer les cinq premiers millilitres), à l'aide d'un appareil de mesure du COT. Si l'analyse du filtrat ne peut être faite le jour même, le conserver au réfrigérateur jusqu'au lendemain. Il est déconseillé de la conserver plus longtemps.

Déterminer la concentration de DCO dans les filtrats d'échantillon à l'aide du dispositif d'analyse de la DCO conformément au mode opératoire décrit dans la référence (2) ci-après.

2. ÉVALUATION DES DONNÉES

Procéder au moins à deux déterminations de la concentration de COD et de DCO dans les échantillons, conformément aux indications fournies ci-dessus au paragraphe 1.6.2. Calculer le pourcentage de dégradation au temps T suivant la formule (avec ses définitions) donnée au paragraphe 1.2 ci-dessus.

Arrondir le taux de dégradation à l'unité de pourcentage la plus proche. Le taux de dégradation atteint à la fin de l'essai constitue la «biodégradabilité dans l'essai de Zahn-Wellens».

Note: Si la dégradation complète est réalisée avant la fin de la durée de l'essai et si ce résultat est confirmé par une seconde analyse effectuée le lendemain, il peut être mis fin à l'essai.

3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal de l'essai contiendra, si possible:

— la concentration initiale de la substance,

— toutes autres indications et les résultats expérimentaux relatifs à la substance testée, à la substance de référence éventuelle, et au témoin,

— la concentration après trois heures,

— la courbe de biodégradation avec description,

— la date et l'endroit du prélèvement de l'inoculum, stade d'adaptation, concentration utilisée, etc.,

— les raisons scientifiques d'éventuelles modifications de la procédure d'essai.

3.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'élimination du COD (ou de la DCO) qui se produit graduellement pendant un certain nombre de jours ou de semaines indique que la substance testée se dégrade biologiquement.

▼B

Cependant, une adsorption physico-chimique peut jouer un rôle dans certains cas: ceci est montré lorsqu'il y a élimination totale ou partielle de la substance dès le début, lors des 3 premières heures, et que la différence entre le surnageant des milieux témoins et d'essai reste faible.

Des essais supplémentaires sont nécessaires si l'on doit faire la distinction entre biodégradation (ou biodégradabilité partielle) et adsorption.

Il y a pour cela plusieurs méthodes, la meilleure étant d'employer le surnageant comme inoculum dans un essai du niveau de base (de préférence un essai respirométrique).

Les substances donnant dans cet essai une élimination élevée, non liée a l'adsorption du COD (ou de la DCO) devraient être considérées comme potentiellement biodégradables. Une élimination partielle, non liée à l'adsorption, indique que le produit chimique est au moins biodégradable dans une certaine mesure. Une élimination faible ou nulle de COD (DCO) peut être due à l'inhibition des micro-organismes par la substance testée; ceci peut être révélé par lyse et perte de boue donnant des surnageants troubles. L'essai devrait être répété avec une concentration plus faible de substance.

L'emploi d'une méthode analytique spécifique ou d'une substance d'essai marquée au ^{14}C peut permettre une plus grande sensibilité. Dans le cas de composés marqués au ^{14}C, la récupération de $^{14}CO_2$ confirmera qu'il y a eu biodégradation.

Quand les résultats sont exprimés en termes de biodégradation primaire, il conviendrait de fournir dans la mesure du possible une explication concernant le changement de structure chimique qui a conduit à une diminution de réponse de la substance d'origine.

La validation de la méthode analytique doit être accompagnée de l'indication de la réponse trouvée avec le témoin.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice 302 B, décision du Conseil C(81) 30 final.

(2) Annexe V, C. 9. «Dégradation: demande chimique en oxygène», de la directive 84/449/CEE, Journal officiel des Communautés européennes n° L 251 du 19 septembre 1984.

▼B

Appendice

EXEMPLE D'ÉVALUATION

Composé organique:	acide 4-éthoxybenzoïque
Concentration théorique:	600 mg/l
COD théorique:	390 mg/l
Inoculum:	Station d'épuration des eaux d'égout de ...
Concentration;	1 gramme de matière sèche par litre
État d'adaptation:	non adapté
Analyse:	détermination du COD
Volume de l'échantillon:	3 ml
Substance de contrôle:	diethylèneglycol
Toxicité du composé:	sans effet toxique au-dessous de 1 000 mg/l Essai pratique: essai des tubes de fermentation.

Temps	Substance de contrôle				Substance à étudier		
	Blanc COD (1) mg/l	COD (1) mg/l	COD net mg/l	Dégradation %	COD (1) mg/l	COD net mg/l	Dégradation %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 heures	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 jour	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 jours	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 jours	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 jours	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 jours	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 jours	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 jours	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 jours	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Valeurs moyennes de trois déterminations.

▼B

Figure 1

Exemples de courbes de biodégradation

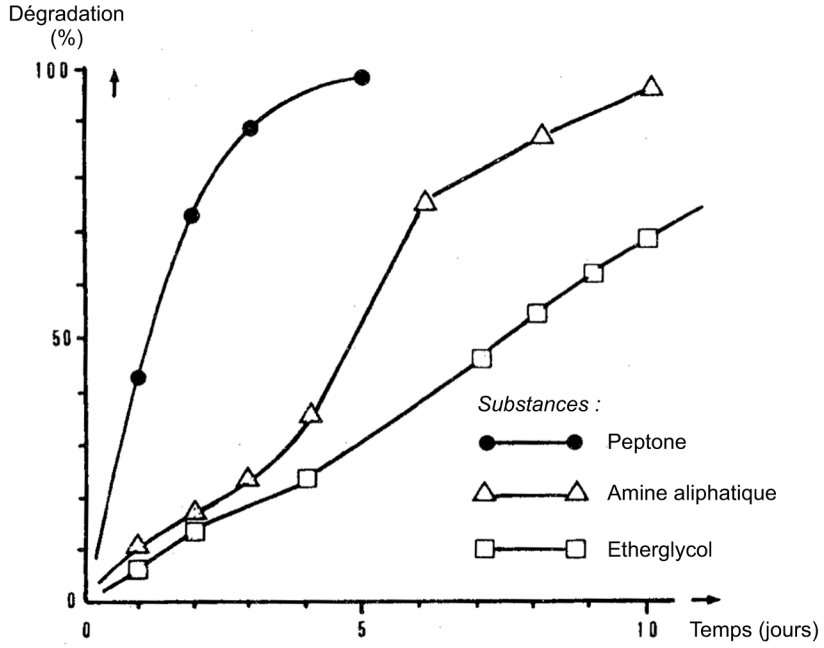
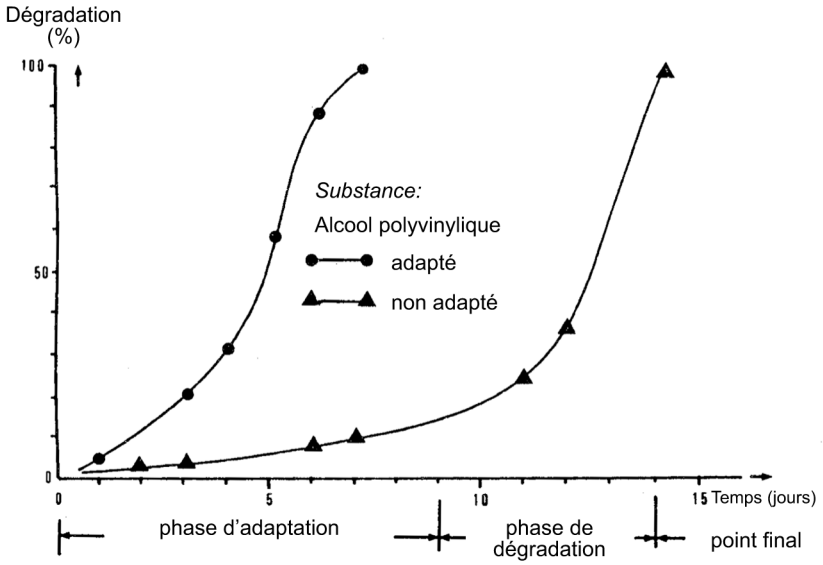


Figure 2

Exemples d'adaptation d'une boue



▼M4

C.10. **ESSAI DE SIMULATION – TRAITEMENT AÉROBIE DES EAUX USÉES: C.10-A: UNITÉS DE TRAITEMENT PAR BOUES ACTIVÉES – C.10-B: BIOFILMS**

C.10-A: Unités de traitement par boues activées

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 303 (2001) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Dans les années 50, on s'est rendu compte que les nouveaux tensioactifs provoquaient un gonflement excessif de la mousse dans les stations de traitement des eaux usées et les cours d'eau. Ils n'étaient pas complètement éliminés par le traitement aérobie et limitaient dans certains cas l'élimination d'autres matières organiques. Ce constat a été à l'origine de nombreuses études sur les moyens d'éliminer les tensioactifs des eaux usées et sur les possibilités d'application des nouvelles substances chimiques produites par l'industrie au traitement des eaux usées. Des modèles d'unités représentant les deux principaux types de traitement biologique aérobie des eaux usées (boues activées et lits à ruissellement, ou lits bactériens) ont été utilisés à cette fin. Il aurait en effet été peu commode et très coûteux de répartir chaque nouvelle substance entre différentes stations de traitement à grande échelle et d'assurer un suivi des essais, même au niveau local.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

Unités de traitement par boues activées

2. Les descriptions de modèles d'unités à boues activées mentionnent des dimensions comprises entre 300 ml et environ 2 000 ml. Certaines unités, répliques assez fidèles de stations en vraie grandeur, comportaient des bassins de décantation où les boues séjournaient avant d'être renvoyées par pompage dans le bassin d'aération, tandis que d'autres n'étaient pas équipées pour cette opération, par exemple le modèle de Swisher (1). La dimension de l'appareil résulte d'un compromis: il doit être assez grand pour fonctionner correctement sur le plan mécanique et traiter un volume d'échantillons suffisant sans que son fonctionnement en soit altéré et, d'autre part, il ne doit pas occuper trop d'espace ni demander une quantité de matériel excessive.

3. Deux types d'appareils, appliqués au départ à l'étude des tensioactifs, ont été abondamment utilisés avec des résultats satisfaisants: les unités d'Husmann (2) et les unités à vase poreux (3) (4), qui sont décrites dans la présente méthode d'essai. D'autres unités ont également fait leurs preuves, par exemple celle d'Eckenfelder (5). Compte tenu du coût relativement élevé et des efforts exigés par la conduite de cet essai de simulation, des essais de sélection plus simples et moins onéreux, qui figurent à présent au chapitre C.4-A à F de la présente annexe (6), ont été étudiés en parallèle. L'expérience acquise avec de nombreux tensioactifs et d'autres produits chimiques a montré que ceux qui donnaient un résultat positif aux essais de sélection (facilement biodégradables) se dégradaient aussi au cours de l'essai de simulation. Certaines des substances rejetées par les essais de sélection étaient acceptées d'après les essais de biodégradabilité intrinsèque [chapitres C.12 (7) et C.19 (8) de la présente annexe] mais une partie seulement des substances formant ce dernier groupe se dégradait au cours de l'essai de simulation, tandis que les substances écartées par les essais de biodégradabilité intrinsèque n'étaient pas dégradées au cours des essais de simulation (9) (10) (11).

4. Les essais de simulation conduits sous une seule combinaison de conditions expérimentales suffisent à remplir certains objectifs; les résultats sont exprimés en pourcentage d'élimination de la substance d'essai ou du carbone organique dissous (COD). Ce type d'essai est décrit dans la présente méthode d'essai. Toutefois, contrairement à la précédente version du présent chapitre, qui n'abordait qu'un seul type d'appareil traitant des eaux usées synthétiques en mode couplé suivant une méthode relativement

▼M4

grossière d'épuisement des boues, le présent texte propose plusieurs variations. Il présente plusieurs options concernant les types d'appareil, les modes de fonctionnement, les eaux usées et l'évacuation des boues épuisées. Il s'aligne étroitement sur la norme ISO 11733 (12), qui a été examinée très attentivement durant sa préparation, bien que la méthode n'ait pas fait l'objet d'un essai circulaire.

5. Pour d'autres objectifs, il est nécessaire de connaître la concentration de la substance d'essai dans l'effluent avec plus de précision, ce qui demande une méthode plus élaborée. Le débit des boues épuisées, par exemple, doit subir un contrôle plus précis durant chaque journée d'essai et sur toute la période de l'essai, et il faut faire tourner les unités à plusieurs débits de boues épuisées. Pour que l'étude soit plus complète, les essais doivent aussi être menés à deux ou trois températures différentes: le mode opératoire est exposé par Birch (13) (14) et résumé à l'appendice 6. Toutefois, les connaissances actuelles ne permettent pas de décréter quels modèles cinétiques sont applicables à la biodégradation des produits chimiques lors du traitement des eaux usées et dans le milieu aquatique en général. La cinétique de Monod, donnée à titre d'exemple à l'appendice 6, est limitée aux substances dont la concentration atteint au moins 1 mg/l, mais de l'avis de certains, même sous cette condition, cela reste à démontrer. Des essais réalisés à des concentrations plus proches de celles trouvées dans les eaux usées sont présentés à l'appendice 7, mais ces essais et ceux de l'appendice 6 ne figurent qu'en appendices et ne font pas l'objet de méthodes d'essai.

Lits

6. Les modèles de lits percolateurs ont beaucoup moins retenu l'attention, sans doute parce qu'ils sont plus encombrants et moins compacts que les modèles de stations à boues activées. Gerike *et al.* ont mis au point des unités à lits percolateurs qu'ils ont fait fonctionner en mode couplé (15). Ces lits étaient relativement grands (hauteur 2 m; volume 60 l) et demandaient pas moins de 2 l/h d'eaux usées chacun. Baumann *et al.* (16) ont simulé des lits percolateurs en insérant dans des tubes de 1 m (14 mm de diamètre interne) des bandes de polyester «velues» préalablement plongées dans des boues activées concentrées pendant 30 minutes. La substance d'essai, qui constituait la seule source de carbone dans une solution de sels minéraux, était introduite par le haut du tube vertical et la biodégradation était évaluée d'après les mesures du COD dans l'effluent et du CO_2 dans les dégagements gazeux.

7. Les filtres biologiques ont été simulés d'une autre manière (15): on a alimenté les surfaces internes de tubes rotatifs légèrement inclinés par rapport à l'horizontale d'eaux usées (environ 250 ml/h) avec et sans la substance d'essai, puis recueilli les effluents pour analyse du COD et/ou de la substance d'essai étudiée.

PRINCIPE DE L'ESSAI

8. Cette méthode a été conçue pour déterminer l'élimination et la biodégradation primaire et/ou finale de substances organiques solubles dans l'eau par des micro-organismes aérobies dans un système d'essai à fonctionnement continu et simulant l'action des boues activées. Un milieu organique facilement biodégradable et la substance d'essai organique forment la source de carbone et d'énergie des micro-organismes.

9. Deux unités d'essai à fonctionnement continu (stations à boues activées ou vases poreux) tournent en parallèle dans des conditions identiques choisies en fonction de la finalité de l'essai. Normalement, le temps de rétention hydraulique moyen est de 6 h et l'âge moyen des boues (temps de rétention des boues) est de 6 à 10 jours. Les boues sont épuisées par application de l'une des deux méthodes et la substance d'essai est habituellement ajoutée à une concentration comprise entre 10 et 20 mg/l de carbone organique dissous (COD) aux eaux à traiter (milieu organique) d'une seule des unités. La deuxième unité sert de témoin pour déterminer la biodégradation dans le milieu organique.

▼M4

10. Le COD, de préférence, ou la demande chimique en oxygène (DCO), ainsi que la concentration de la substance d'essai (si nécessaire), sont déterminés par une analyse spécifique conduite sur des échantillons d'effluents fréquemment prélevés de l'unité qui reçoit la substance d'essai. On suppose que la différence de concentration du COD ou de la DCO dans les effluents de l'unité d'essai et de l'unité témoin est due à la substance d'essai ou à ses métabolites organiques. On la compare ensuite à la concentration du COD ou de la DCO dans les eaux à traiter attribuable à la substance d'essai, afin de déterminer les quantités de substance d'essai éliminées.

11. On parvient normalement à distinguer la biodégradation de la bioadsorption en étudiant attentivement la courbe d'élimination en fonction du temps, et elle peut ordinairement être confirmée par un essai de biodégradabilité immédiate conduit à l'aide d'un inoculum acclimaté provenant de l'unité qui reçoit la substance d'essai.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

12. Il est nécessaire de connaître la pureté, la solubilité dans l'eau, la volatilité et les caractéristiques d'adsorption de la substance d'essai pour être en mesure d'interpréter les résultats correctement. Les substances volatiles et insolubles ne peuvent normalement être testées sans précautions particulières (voir appendice 5). Il faudrait connaître également la formule chimique développée ou, au moins, empirique, pour calculer les valeurs théoriques et/ou vérifier les valeurs mesurées de paramètres tels que la demande théorique en oxygène (DthO), le carbone organique dissous (COD) et la demande chimique en oxygène (DCO).

13. Des données sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes (voir appendice 4) peuvent aussi être utiles à la sélection des concentrations d'essai appropriées, et essentielles pour l'interprétation correcte de faibles valeurs de biodégradation.

NIVEAUX DE SEUIL

14. Dans l'application initiale de cet essai de simulation (de confirmation) à la biodégradation primaire des tensioactifs, la mise sur le marché du tensioactif était subordonnée à un taux d'élimination supérieur à 80 pour cent. À défaut d'atteindre un taux de 80 pour cent, on peut mener cet essai de simulation (de confirmation) à l'issue duquel le tensioactif ne sera mis sur le marché que s'il est éliminé à plus de 90 pour cent. En général, avec les produits chimiques, la question d'un résultat d'essai positif ou négatif n'entre pas enjeu, et le pourcentage d'élimination obtenu peut servir à calculer en gros la concentration probable dans l'environnement à introduire dans l'évaluation des risques dus aux substances chimiques. Les résultats ont tendance à être de type tout ou rien. Le pourcentage d'élimination du COD atteint dans plusieurs études sur des substances chimiques pures était supérieur à 90 pour cent pour plus des trois quarts des produits chimiques présentant un degré de biodégradabilité significatif et supérieur à 80 pour cent pour plus de 90 pour cent d'entre eux.

15. Relativement peu de substances chimiques, par exemple des tensioactifs, sont présentes dans les eaux usées aux concentrations (environ 10 mg C/l) appliquées dans cet essai. Certains produits chimiques peuvent être inhibiteurs à de telles concentrations, tandis que la cinétique d'élimination d'autres substances risque d'être différente aux faibles concentrations. Il est possible d'évaluer la dégradation avec plus de précision en recourant à des méthodes modifiées et en choisissant des concentrations de la substance d'essai réalistement faibles; les résultats obtenus pourraient servir à calculer les constantes cinétiques. Cependant, non seulement les techniques expérimentales ne sont pas encore entièrement validées, mais les modèles cinétiques, qui reproduisent les réactions de biodégradation, n'ont pas été établis (voir appendice 7).

▼M4

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

16. Pour s'assurer que le mode opératoire est correctement suivi, il est quelquefois utile de tester des substances dont le comportement est connu, parallèlement aux substances d'essai étudiées. Il s'agit notamment de l'acide adipique, du 2-phénylphénol, du bnaphthol, de l'acide diphénique, de l'acide 1-naphthoïque, etc. (9) (10) (11).

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS DES ESSAIS

17. Il existe beaucoup moins de rapports d'essais de simulation que de rapports d'essais de biodégradabilité immédiate. La reproductibilité entre essais conduits simultanément est bonne (de 10 à 15 pour cent) pour des substances d'essai dégradées à 80 pour cent ou plus, mais la variabilité augmente pour les substances moins bien dégradées. Certaines substances limites ont donné des résultats très disparates (par exemple 10 pour cent, 90 pour cent) à différentes reprises au cours des neuf semaines de l'essai.

18. Les résultats obtenus à l'aide des deux types d'appareils ne différaient guère, mais certaines substances ont subi une dégradation plus poussée et plus constante avec les eaux usées domestiques qu'avec les eaux usées synthétiques reconstituées selon la formule de l'OCDE.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Appareils

Système d'essai

19. Le système d'essai d'une seule substance comprend une unité d'essai et une unité témoin, mais les analyses spécifiques (biodégradation primaire) ne demandent qu'une unité d'essai. Une unité témoin peut servir à plusieurs unités d'essai recevant des substances d'essai identiques ou différentes. En cas de couplage (appendice 3), chaque unité d'essai doit avoir sa propre unité témoin. Le système d'essai peut consister en un modèle de station à boues activées: unité d'Husmann (appendice 1, figure 1) ou vase poreux (appendice 1, figure 2). Dans les deux cas, il faut employer des récipients de stockage de capacité suffisante pour accueillir les eaux à traiter et les effluents ainsi que des pompes pour doser les eaux à traiter, mélangés ou non à la solution contenant la substance d'essai.

20. Chaque unité à boues activées se compose d'un récipient d'aération d'une capacité connue de quelque trois litres de boues activées et d'un décanteur secondaire qui contient environ un litre et demi; il est possible de modifier les volumes dans une certaine mesure en ajustant la hauteur du décanteur. L'utilisation de récipients de dimensions différentes est permise à condition de leur faire supporter des charges hydrauliques comparables. S'il n'y a pas moyen de maintenir la température de l'enceinte d'essai dans la gamme souhaitée, on recommande d'employer des récipients à chemise d'eau thermostatée. Les boues activées du décanteur sont ramenées dans le récipient d'aération, en continu ou à intervalles réguliers, à l'aide d'un émulseur à air ou d'une pompe doseuse, pour y être recyclée.

21. Le système du vase poreux consiste en un cylindre poreux à fond conique placé à l'intérieur d'un récipient légèrement plus grand de la même forme, mais fabriqué en matière plastique imperméable. Le matériau qui convient au cylindre poreux est du polyéthylène de 2 mm d'épaisseur dont les pores n'excèdent pas 90 μm. La séparation des boues et du milieu organique traité est opérée par un passage différentiel à travers la paroi poreuse. Les effluents se déversent dans l'espace annulaire d'où ils débordent dans le récipient collecteur. Aucune décantation n'a lieu, si bien qu'il n'y a pas de retour de boues. L'ensemble du système peut être monté dans un bain-marie thermostaté. Les vases poreux s'obstruent et risquent de déborder au début.

▼M4

Si cela se produit, il faut remplacer le revêtement poreux interne par un revêtement propre en commençant par siphonner les boues du vase dans un seau propre avant d'enlever le revêtement obstrué. Après avoir essuyé le cylindre imperméable extérieur, on place un revêtement propre et on remet la boue dans le vase. Si des boues adhèrent sur les côtés du revêtement obstrué, celles-ci doivent être soigneusement grattées et transférées. Le nettoyage des vases obstrués s'effectue d'abord à l'aide d'un mince jet d'eau pour enlever les boues restantes, ensuite par trempage dans une solution diluée d'hypochlorite de sodium, puis dans l'eau, et s'achève par un rinçage complet à l'eau.

22. Il convient d'appliquer des techniques appropriées à l'aération des boues dans les récipients d'aération des deux systèmes, par exemple des cubes frittés (pierres diffuseuses) et de l'air comprimé. Si nécessaire, l'air sera épuré par passage à travers un filtre convenable, et lavé. Une quantité d'air suffisante doit être insufflée dans le système pour maintenir l'aérobiose et conserver les boues à l'état de floc pendant toute la durée de l'essai.

Appareil de filtration ou centrifugeuse

23. Les échantillons seront filtrés à travers une membrane possédant une porosité adéquate (diamètre d'ouverture nominal de 0,45 μm) qui adsorbe les substances organiques solubles et libère le moins possible de carbone organique. Si les lits utilisés libèrent du carbone organique, il faut les laver soigneusement à l'eau chaude afin d'évacuer le carbone organique lixiviable. Une centrifugeuse tournant à 40 000 m/s^2 peut remplacer l'appareil de filtration.

Matériel d'analyse

24. Appareils permettant de déterminer:

— le COD (carbone organique dissous) et le COT (carbone organique total), ou la DCO (demande chimique en oxygène),

— la substance donnée, s'il y a lieu,

— les solides en suspension, le pH, la concentration d'oxygène dans l'eau,

— la température, l'acidité, l'alcalinité,

— l'ammonium, les nitrites et les nitrates, si l'essai est réalisé dans des conditions nitrifiantes.

Eau

25. Eau du robinet renfermant moins de 3 mg/l de COD. Mesurer l'alcalinité si elle est inconnue.

26. Eau désionisée contenant moins de 2 mg/l de COD.

Milieu organique

27. Les eaux usées synthétiques, les eaux usées domestiques ou un mélange des deux sont acceptés comme milieu organique. Il a été démontré (11) (14) que les eaux usées domestiques employées seules augmentaient souvent le pourcentage d'élimination du COD et entraînaient même l'élimination et la biodégradation de certaines substances chimiques non biodégradées par les eaux usées synthétiques formulées selon l'OCDE. En outre, l'addition constante ou intermittente d'eaux usées domestiques stabilise souvent les boues activées, y compris sa capacité à décanter convenablement, laquelle est déterminante. Aussi préconise-t-on l'utilisation d'eaux usées domestiques. On mesure la concentration du COD ou de la DCO. L'acidité ou l'alcalinité du milieu organique doivent être connues. Il peut être nécessaire de tamponner le milieu organique par un composé approprié (hydrogénocarbonate de sodium ou dihydrogénophosphate de potassium) s'il est faiblement acide ou alcalin, pour maintenir le pH à environ 7,5 ± 0,5 dans le récipient d'aération durant l'essai. La quantité de tampon à ajouter et le moment de cette addition seront décidés au cas par cas. Lorsqu'on utilise des mélanges de façon continue ou intermittente, le COD (ou la DCO) de ces mélanges doivent être maintenus à une valeur à peu près constante, par exemple par dilution dans l'eau.

▼M4

Eaux usées synthétiques

28. Dans chaque litre d'eau du robinet, dissoudre 160 mg de peptone, 110 mg d'extrait de viande, 30 mg d'urée, 28 mg d'hydrogénophosphate de potassium anhydre (K_2HPO_4), 7 mg de chlorure de sodium (NaCl), 4 mg de chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2.2H_2O$) et 2 mg de sulfate de magnésium heptahydraté ($Mg_2SO_4.7H_20$). Cette eau usée synthétique formulée selon l'OCDE offre un exemple où la concentration moyenne de COD dans les eaux à traiter atteint quelque 100 mg/l. Utiliser en alternance d'autres compositions donnant à peu près la même concentration de COD, plus proches des eaux usées domestiques. Si les eaux à traiter doivent être moins concentrées, diluer les eaux usées synthétiques, à 1/1 par exemple, dans de l'eau du robinet afin d'obtenir une concentration d'environ 50 mg/l. Ces eaux à traiter «allégées» favoriseront la croissance des organismes nitrifiants; cette modification devra être mise à profit au cas où s'avère nécessaire l'étude de la simulation de stations d'épuration des eaux usées en régime nitrifiant. Ces eaux usées synthétiques, à base d'eau distillée, peuvent être confectionnées sous une forme concentrée et stockées à environ 1 °C pendant une semaine au maximum. Selon les besoins, diluer avec de l'eau du robinet (ce milieu n'est pas satisfaisant, notamment parce qu'il présente une concentration en azote très élevée et une teneur en carbone relativement faible, mais rien de mieux n'a été suggéré, en dehors d'un apport supplémentaire de tampon phosphate et de peptone).

Eaux usées domestiques

29. Utiliser des eaux usées qui viennent d'être décantées, recueillies quotidiennement dans une station d'épuration qui reçoit principalement des eaux usées domestiques. Elles doivent être prélevées avant la sédimentation primaire, au niveau du déversoir de la cuve de sédimentation primaire ou dans les eaux brutes de la station de traitement par boues activées. Les eaux usées peuvent être utilisées après plusieurs jours de stockage (généralement pas plus de sept) à environ 4 °C, s'il est prouvé que le COD (ou la DCO) n'ont pas diminué de manière significative (c'est-à-dire de moins de 20 pour cent) durant le stockage. Afin de limiter la perturbation du système, il conviendrait d'ajuster le COD (ou la DCO) de chaque nouveau lot avant son utilisation à une valeur constante adéquate, par exemple en le diluant avec de l'eau du robinet.

Boues activées

30. Prélever les boues activées destinées à l'inoculation dans la cuve d'aération d'une station d'épuration des eaux usées correctement exploitée ou d'une unité à boues activées conçue à l'échelle expérimentale traitant principalement des eaux usées domestiques.

Solutions mères de la substance d'essai

31. Pour les substances présentant une solubilité convenable, préparer des solutions mères aux concentrations appropriées (par exemple, 1 à 5 g/l) dans de l'eau désionisée, ou dans la fraction minérale de l'eau usée synthétique. En ce qui concerne les substances insolubles et volatiles, se reporter à l'appendice 5. Déterminer le COD et le carbone organique total (COT) de la solution mère et répéter les mesures à chaque nouveau lot. Si la différence entre le COD et le COT excède 20 pour cent, il faut vérifier l'hydrosolubilité de la substance d'essai. Comparer le COD ou la concentration de la substance d'essai mesurée par une analyse spécifique de la solution mère à la valeur nominale, pour s'assurer que la récupération est suffisante (elle doit normalement dépasser 90 pour cent). Vérifier, en particulier pour les dispersions, si le COD peut être utilisé comme paramètre d'analyse ou si seule une technique d'analyse spécifique de la substance d'essai est applicable. Les dispersions imposent la centrifugation des échantillons. Pour chaque nouveau lot, mesurer le COD, la DCO, ou la substance d'essai par une analyse spécifique.

▼M4

32. Déterminer le pH de la solution mère. Les valeurs extrêmes indiquent que l'addition de la substance est susceptible d'influencer le pH des boues activées dans le système d'essai. Dans ce cas, il faut neutraliser la solution mère à pH 7 ± 0,5 avec de faibles quantités d'un acide ou d'une base inorganiques, tout en évitant la précipitation de la substance d'essai.

MODE OPÉRATOIRE

33. Le mode opératoire est décrit pour les unités à boues activées; pour le système du vase poreux, il doit être légèrement adapté.

Préparation de l'inoculum

34. Au début de l'essai, inoculer le système d'essai avec des boues activées ou un inoculum contenant une faible concentration de micro-organismes. L'inoculum est conservé dans un endroit aéré à température ambiante avant d'être utilisé dans les 24 heures. Dans le premier cas, on prélève un échantillon de boues activées de la cuve d'aération d'une station d'épuration biologique des eaux usées exploitée avec efficacité ou d'une installation de traitement de laboratoire qui soit essentiellement alimentée par des eaux usées domestiques. S'il y a lieu de simuler des conditions nitrifiantes, collecter les boues d'une station de traitement des eaux usées en régime nitrifiant. Déterminer la concentration des solides en suspension et, si nécessaire, concentrer les boues par décantation pour que le volume ajouté au système d'essai soit minimal. Vérifier que la teneur en matière sèche de départ tourne autour de 2,5 g/l.

35. Dans le deuxième cas, 2 ml/l à 10 ml/l d'un effluent d'une station d'épuration biologique des eaux usées constitueront l'inoculum. Afin de réunir autant d'espèces bactériennes que possible, il peut être utile d'ajouter des inoculums de diverses autres sources, par exemple les eaux de surface. Dans ces conditions, les boues activées vont se former et se développer dans le système d'essai.

Dosage du milieu organique

36. Nettoyer méticuleusement les récipients destinés à recevoir les eaux à traiter et les effluents ainsi que les tuyaux reliant ces deux récipients, afin de prévenir toute prolifération de micro-organismes, au début de l'essai et tout au long de celui-ci. Assembler les systèmes d'essai dans une pièce thermostatée (normalement entre 20 et 25 °C) ou utiliser des unités d'essai à chemise d'eau. Préparer un volume suffisant du milieu organique requis (paragraphes 27-29). Commencer par remplir le récipient d'aération et le décanteur avant d'introduire l'inoculum (paragraphes 34, 35). Actionner le dispositif d'aération de telle sorte que les boues soient maintenues en suspension et en aérobiose, et entamer le dosage des eaux à traiter et le recyclage des boues décantées. Doser le milieu organique des récipients de stockage et introduire ce dernier dans les récipients d'aération (paragraphes 20, 21) des unités d'essai et témoin et recueillir leurs effluents respectifs dans des récipients de stockage similaires. Le temps de rétention hydraulique normal de 6 heures sera assuré par un pompage du milieu organique à raison de 0,5 l/h. Pour confirmer ce débit, mesurer la quantité quotidienne de milieu organique dosé en enregistrant la diminution de volume du milieu dans les récipients de stockage. Il faudrait faire appel à d'autres méthodes de dosage pour déterminer les effets du déversement intermittent et du traitement de «choc» par des produits chimiques.

37. Si le milieu organique est préparé en vue d'une utilisation dont la durée dépasse un jour, il y a lieu de le réfrigérer à environ 4 °C ou de le conserver par une autre méthode adéquate, afin de prévenir la croissance des micro-organismes et la biodégradation en dehors des unités d'essai (paragraphe 29). Si l'on emploie une eau usée synthétique, il est possible de préparer et d'entreposer à environ 4 °C une solution mère concentrée (par exemple dix fois la concentration normale, voir paragraphe 28). Cette solution mère peut être convenablement mélangée à un volume adéquat d'eau du robinet avant usage, ou être pompée directement, tandis que le volume adéquat d'eau du robinet est pompé séparément.

▼M4

Dosage de la substance d'essai

38. Un volume approprié de la solution mère de la substance d'essai (paragraphe 31) est introduit dans le récipient de stockage des eaux à traiter ou dosé directement, à l'aide d'une autre pompe, dans le récipient d'aération. La concentration d'essai moyenne normale dans les eaux à traiter doit se situer entre 10 mg/l et 20 mg/l de COD, et la concentration maximale à 50 mg/l. Si l'hydrosolubilité de la substance d'essai est faible ou si des effets toxiques risquent de se produire, abaisser la concentration à 5 mg/l de COD ou même moins, mais seulement si une méthode d'analyse spécifique est applicable (les substances d'essai dispersées peu solubles dans l'eau peuvent être ajoutées par le biais de techniques de dosage spéciales, voir appendice 5).

39. Une fois que le système est stabilisé et élimine le COD du milieu organique avec efficacité (environ 80 pour cent), commencer à ajouter la substance d'essai. Il est important de vérifier que toutes les unités travaillent avec le même rendement avant d'ajouter la substance d'essai; si ce n'est pas le cas, il est souvent utile de mélanger les différentes boues et de redistribuer des volumes égaux aux unités. Lorsqu'on utilise un inoculum de quelque 2,5 g/l (poids sec) de boues activées, la substance d'essai peut être ajoutée dès le début de l'essai, car l'addition directe de quantités croissantes dès le départ offre l'avantage de pouvoir rendre les boues activées mieux adaptables à la substance d'essai. Quelles que soient les modalités de l'adjonction de la substance d'essai, il est recommandé de mesurer les débits et/ou les volumes correspondants dans le(s) récipient(s) de stockage à intervalles réguliers.

Manipulation des boues activées

40. La concentration des solides des boues activées se stabilise normalement durant l'essai, quel que soit l'inoculum utilisé, entre 1 et 3 g/l (poids sec) suivant la qualité et la concentration du milieu organique, les conditions expérimentales, la nature des micro-organismes présents et l'influence de la substance d'essai.

41. Déterminer les solides en suspension dans les récipients d'aération au moins une fois par semaine en jetant les boues excédentaires, afin de maintenir la concentration entre 1 g/l et 3 g/l (poids sec), ou veiller à la constance de l'âge moyen des boues, qui doit généralement se situer entre 6 et 10 jours. Si l'on choisit, par exemple, un temps de rétention des boues de 8 jours, on enlèvera chaque jour 1/8 du volume des boues activées dans le récipient d'aération et on le jettera. Effectuer cette opération quotidiennement ou, de préférence, utiliser une pompe automatique intermittente. Le maintien de la concentration des solides en suspension à une valeur constante ou entre des limites étroites ne fige pas le temps de rétention des boues, qui est la variable permettant de déterminer la concentration de la substance d'essai dans l'effluent.

42. Tout au long de l'essai, ôter au moins une fois par jour la boue qui adhère aux parois du récipient d'aération et du décanteur et remettre cette dernière en suspension. Inspecter et nettoyer régulièrement tous les tuyaux afin de prévenir la croissance d'un biofilm. Recycler les boues décantées du décanteur en la renvoyant dans le récipient d'aération, de préférence par pompage intermittent. Le système des vases poreux ne comporte pas de recyclage, mais il faut veiller à placer des cylindres internes propres avant que le volume n'atteigne une croissance significative dans le récipient (paragraphe 21).

43. Une mauvaise décantation et des pertes de boues peuvent se produire dans les unités d'Husmann. On peut y remédier en effectuant en parallèle dans les unités d'essai et les unités témoin une ou plusieurs des opérations énumérées ci-dessous:

— ajouter des boues fraîches ou un floculant (2 ml par récipient d'une solution de $FeCl_3$ à 50 g/l, par exemple) à intervalles réguliers, par exemple hebdomadaires, en s'assurant que le $FeCl_3$ ne réagit pas avec la substance d'essai et ne la fasse pas précipiter,

▼M4

— remplacer l'émulseur à air par une pompe péristaltique, afin d'instaurer un flux de recirculation des boues à peu près égal au débit entrant à appliquer et de permettre la formation d'une zone anaérobie dans les boues décantées (la géométrie du dispositif airlift limite le débit minimum du retour des boues à environ douze fois celui des eaux à traiter),

— pomper les boues, par intermittence, du décanteur vers le récipient d'aération (par exemple pendant 5 minutes toutes les 2,5 heures afin de recycler 1 à 1,5 l/h,

— utiliser un agent antimousse non toxique à une concentration minimale pour empêcher les pertes dues à la formation de mousse (de l'huile de silicone, par exemple),

— insuffler de l'air à travers les boues dans le décanteur par puissantes saccades (par exemple pendant 10 secondes toutes les heures),

— doser le milieu organique par intervalles dans le récipient d'aération (par exemple pendant 3 à 10 minutes toutes les heures).

Échantillonnage et analyse

44. À intervalles réguliers, mesurer la concentration d'oxygène dissous, la température et le pH des boues activées dans les récipients d'aération. Faire en sorte qu'il y ait toujours suffisamment d'oxygène disponible (> 2 mg/l) et que la température demeure dans la gamme requise (normalement de 20 °C à 25 °C). Maintenir le pH à 7,5 ± 0,5 en dosant de petites quantités d'une base ou d'un acide inorganiques que l'on introduit dans le récipient d'aération ou dans les eaux à traiter, ou en augmentant le pouvoir tampon du milieu organique (voir paragraphe 27). Si une nitrification a lieu, elle génère de l'acide, l'oxydation de 1 mg d'azote produisant l'équivalent de quelque 7 mg de CO_3. La fréquence des mesures dépend du paramètre à mesurer et de la stabilité du système, et peut varier entre une cadence journalière et hebdomadaire.

45. Déterminer le COD ou la DCO dans les eaux à traiter des récipients d'essai et témoins. Mesurer la concentration de la substance d'essai dans les eaux brutes par une analyse spécifique ou estimer cette variable d'après la concentration dans la solution mère (paragraphe 31), le volume utilisé et la quantité d'eaux usées dosées dans l'unité d'essai. Il est recommandé de calculer la concentration de la substance d'essai afin de réduire la variabilité des données relatives à la concentration.

46. Prélever des échantillons appropriés dans l'effluent recueilli (par exemple des échantillons composites sur 24 heures) qui seront filtrés à travers une membrane à pores de 0,45 μm ou centrifugés à environ 40 000 m/s^2 pendant près d'un quart d'heure. Il convient de recourir à la centrifugation si la filtration pose des difficultés. Déterminer le COD ou la DCO au moins deux fois, afin de mesurer par une analyse spécifique de la substance d'essai la biodégradation finale et, selon les besoins, la biodégradation primaire.

47. L'utilisation de la DCO peut donner lieu à des problèmes analytiques aux faibles concentrations et n'est donc recommandée que si la concentration d'essai est suffisante (environ 30 mg/l). S'agissant de substances très adsorbantes, on préconise de mesurer la quantité de substance adsorbée dans les boues par une technique d'analyse spécifique de la substance d'essai.

48. La fréquence de l'échantillonnage dépend de la durée supposée de l'essai. Un rythme de trois fois par semaine est recommandé. Une fois que les unités fonctionnent de manière efficace, on leur laisse une période d'adaptation de une à six semaines maximum après l'introduction de la substance d'essai, afin de leur permettre d'atteindre un état stationnaire. Il faut, de préférence, obtenir au moins 15 valeurs valables pendant la phase plateau (paragraphe 59), qui dure normalement trois semaines, pour évaluer le résultat de l'essai. L'essai peut s'arrêter là si l'on a atteint un degré d'élimination suffisant (par exemple supérieur à 90 pour cent) et si l'on possède ces 15 valeurs issues d'analyses conduites chaque jour de semaine pendant trois semaines. L'essai ne doit normalement pas se prolonger au-delà de 12 semaines après l'addition de la substance d'essai.

▼M4

49. Si les boues sont nitrifiantes et que les effets de la substance d'essai sur la nitrification sont à étudier, analyser des échantillons prélevés dans les effluents de l'unité d'essai et de l'unité témoin, au moins une fois par semaine pour l'ammonium et/ou les nitrites et nitrates.

50. Toutes les analyses doivent être exécutées le plus vite possible, en particulier celles qui portent sur l'azote. Au cas où les analyses doivent être différées, conserver les échantillons à environ 4 °C à l'obscurité dans des bouteilles pleines et bouchées hermétiquement. S'il y a lieu de stocker les échantillons pendant plus de 48 heures, on les conservera par congélation, acidification (par exemple 10 ml/l d'une solution d'acide sulfurique à 400 g/l) ou par adjonction d'un toxique approprié [par exemple 20 ml/l d'une solution de chlorure de mercure (II) à 10 g/l]. S'assurer que la technique de conservation n'influence pas les résultats de l'analyse.

Couplage des unités d'essai

51. Si l'on effectue un couplage (appendice 3), échanger quotidiennement la même quantité de boues activées (de 150 ml à 1 500 ml pour les récipients d'aération contenant trois litres de liquide) entre les récipients d'aération de l'unité d'essai et de l'unité témoin. Si la substance d'essai s'adsorbe fortement sur les boues, n'échanger que le surnageant des décanteurs. Introduire dans les deux cas un facteur de correction dans le calcul des résultats de l'essai (paragraphe 55).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

52. Calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai en termes de COD ou de DCO pour chaque évaluation programmée dans le temps à l'aide de l'équation suivante:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

où

D_t = pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO à l'instant t;

C_s = COD ou DCO dans les eaux à traiter, induits par la substance d'essai, estimés de préférence à partir de la solution mère (mg/l);

E = valeur mesurée du COD ou de la DCO dans les effluents d'essai à l'instant t (mg/l);

E_o = valeur mesurée du COD ou de la DCO dans les effluents témoins à l'instant t (mg/l).

53. Le degré d'élimination du COD ou de la DCO du milieu organique de l'unité témoin est utile pour évaluer l'activité de biodégradation des boues activées pendant l'essai. Calculer le pourcentage d'élimination selon l'équation suivante:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

où

D_B = pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO du milieu organique de l'unité témoin à l'instant t;

C_M = COD ou DCO du milieu organique des eaux brutes témoins (mg/l).

▼M4

Calculer, facultativement, le pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO engendrés par le milieu organique et la substance d'essai dans l'unité d'essai, à partir de l'équation suivante:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

où

D_T = pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO dans la totalité des eaux brutes d'essai;

C_T = COD ou DCO de la totalité des eaux brutes d'essai ou calculés à partir des solutions mères (mg/l).

54. Calculer l'élimination de la substance d'essai si elle a été mesurée par une méthode d'analyse spécifique à chaque instant d'évaluation, selon l'équation suivante:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

où

D_{ST} = pourcentage d'élimination primaire de la substance d'essai à l'instant t;

S_i = concentration mesurée ou estimée de la substance d'essai dans les eaux brutes d'essai (mg/l);

S_e = concentration mesurée de la substance d'essai dans les eaux brutes d'essai à l'instant t (mg/l).

55. En mode couplé, compenser la dilution de la substance d'essai dans le récipient d'aération, occasionnée par l'échange de boues, par un facteur de correction (voir appendice 3). Si on a appliqué un temps de rétention hydraulique moyen de six heures et échangé la moitié du volume de boues activées contenu dans le récipient d'aération, il faut corriger les valeurs déterminées de l'élimination quotidienne (D_t, paragraphe 52) afin d'obtenir le degré réel d'élimination, D_{tc}, de la substance d'essai, à partir de l'équation suivante:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Expression des résultats de l'essai

56. Tracer une courbe des pourcentages d'élimination D_t (ou D_{tc}) et D_{ST}, le cas échéant, en fonction du temps (voir appendice 2). Certaines conclusions peuvent être tirées de l'allure de la courbe d'élimination de la substance d'essai (proprement dite ou à travers le COD) sur le processus d'élimination.

Adsorption

57. Si l'on observe une élimination élevée de la substance d'essai en termes de COD dès le début de l'essai, cette substance est probablement évacuée par adsorption sur les solides des boues activées. Il est possible de prouver ce phénomène en mesurant la substance d'essai adsorbée au moyen d'une analyse spécifique. Il est rare que l'élimination du COD de substances adsorbables demeure élevée tout au long de l'essai; normalement, le degré d'élimination est élevé au départ puis décline progressivement jusqu'à une valeur d'équilibre. Si toutefois la substance d'essai était de nature à acclimater la population de micro-organismes d'une façon ou d'une autre, l'élimination du COD de la substance d'essai augmenterait pour atteindre une valeur plateau élevée.

▼M4

Phase de latence

58. Beaucoup de substances d'essai, comme cela se produit dans les essais de sélection statiques, traversent une phase de latence avant que la biodégradation n'opère à plein régime. Durant la phase de latence, les bactéries qui dégradent s'acclimatent ou s'adaptent et n'éliminent presque pas la substance d'essai, ensuite elles commencent à croître. Cette phase s'achève et la phase de dégradation est censée débuter lorsque environ 10 pour cent de la quantité initiale de la substance d'essai est éliminée (y compris par adsorption, le cas échéant). La phase de latence est souvent très variable et peu reproductible.

Phase plateau

59. Le plateau de la courbe d'élimination d'un essai conduit en continu est défini comme la phase au cours de laquelle la dégradation est maximale. La phase plateau doit durer au moins trois semaines et être déterminée par une quinzaine de valeurs mesurées valables.

Degré moyen d'élimination de la substance d'essai

60. Calculer la moyenne des valeurs d'élimination (D_t) de la substance d'essai durant la phase plateau. Arrondie au nombre entier le plus proche (1 %), elle représente le degré d'élimination de la substance d'essai. On recommande également de calculer l'intervalle de confiance à 95 % de la valeur moyenne.

Élimination du milieu organique

61. Porter sur un graphique le pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO du milieu organique dans l'unité témoin (D_B) en fonction du temps. Indiquer le degré d'élimination moyen comme pour la substance d'essai (paragraphe 60).

Indication de la biodégradation

62. Si la substance d'essai n'est pas adsorbée de façon significative sur les boues activées et que la courbe d'élimination présente le profil typique d'une courbe de biodégradation avec phase de latence, dégradation et plateau (paragraphes 58, 59), l'élimination mesurée est attribuable à coup sûr à la biodégradation. Si l'élimination est élevée au début, l'essai de simulation ne permet pas de faire la distinction entre les processus d'élimination biologiques et non biologiques. Dans ces cas-là, comme dans d'autres où la biodégradation suscite des doutes, (par exemple si on observe une séparation), analyser les substances d'essai adsorbées ou effectuer des essais de biodégradation statiques supplémentaires fondés sur des paramètres qui attestent clairement des processus biologiques. Il s'agit d'essais basés sur la consommation d'oxygène [chapitres C.4-D, E et F de la présente annexe (6)] ou sur la mesure de la production de dioxyde de carbone [chapitre C.4-C de la présente annexe (6)] ou de l'essai au CO_2 dans l'espace de tête de l'ISO (18), à conduire sur un inoculum préexposé provenant de l'essai de simulation. Si l'élimination du COD et de la substance proprement dite ont été mesurées, des différences significatives (le premier étant inférieur à la seconde) entre les pourcentages indiquent que les effluents renferment des produits organiques intermédiaires susceptibles d'être plus difficiles à dégrader que la substance parente.

Validité des résultats de l'essai

63. L'obtention d'informations sur l'activité de biodégradation normale de l'inoculum est subordonnée à la détermination du degré d'élimination du milieu organique (paragraphe 53) dans l'unité témoin. L'essai est considéré comme valable si le degré d'élimination du COD ou de la DCO dans la ou les unités témoins est supérieur à 80 pour cent après deux semaines et qu'aucun phénomène inhabituel n'a été observé.

▼M4

64. Si on a utilisé une substance de référence immédiatement biodégradable, le degré de biodégradation (D_t, paragraphe 52) doit être supérieur à 90 pour cent.

65. Si l'essai est mené dans des conditions nitrifiantes, la concentration moyenne dans les effluents doit être < 1 mg/l d'azote ammoniacal et < 2 mg/l d'azote sous forme de nitrites.

66. Faute de remplir ces critères (paragraphes 63-65), recommencer l'essai en prélevant l'inoculum à une source différente, mettre une substance de référence à l'essai et réexaminer tout le mode opératoire.

Rapport d'essai

67. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nature chimique,

— état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques.

Conditions d'essai:

— type de système d'essai; toute modification imposée par l'essai de substances insolubles et volatiles,

— type de milieu organique,

— proportion et nature des effluents industriels dans les eaux usées, s'ils sont connus,

— inoculum, nature et site(s) de prélèvement, concentration et prétraitement éventuel,

— solution mère de la substance d'essai: teneur en COD et en COT; mode de préparation, s'il s'agit d'une suspension; concentration d'essai appliquée; justifier pourquoi, le cas échéant, on s'écarte de l'intervalle 10 à 20 mg/l de COD; méthode d'addition; date de la première addition; toute modification,

— âge moyen des boues et temps de rétention hydraulique moyen; méthode d'épuisement des boues; méthodes pour vaincre le foisonnement, pertes de boue, etc.,

— techniques d'analyse employées,

— température d'essai,

— qualités du foisonnement des boues, indice des boues, matières en suspension de la liqueur mixte,

— tout écart du mode opératoire normal et toute circonstance susceptibles d'avoir affecté les résultats.

Résultats de l'essai:

— toutes les données mesurées (COD, DCO, analyses spécifiques, pH, température, concentration d'oxygène, solides en suspension, substances azotées, le cas échéant),

— toutes les valeurs calculées de D_t (ou D_{tc}), D_B, D_{St} présentées sous forme de tableau et de courbes d'élimination,

— informations sur les phases de latence et de plateau, durée de l'essai, degré d'élimination de la substance d'essai et du milieu organique dans l'unité témoin, données statistiques, conclusions sur la biodégradabilité et validité de l'essai,

— examen des résultats.

▼**M4**

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Swisher R.D. (1987). «Surfactant Biodegradation», 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1 085 pp.

(2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.

(3) Painter H.A. and King E.F. (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

(4) Painter H.A. and King E.F. (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W. (19) US EPA.

(6) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité «facile».

(7) Chapitre C.12 de la présente annexe, Biodégradation – Test S.C.A.S. modifié.

(8) Chapitre C.19 de la présente annexe, Estimation du coefficient d'adsorption (K_{OC}) sur le sol et les boues d'épuration par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

(9) Gerike P. and Fischer W.K. (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.

(10) Gerike P. and Fischer W.K. (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.

(11) Painter H.A. and Bealing D. (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; révision 2004). Détermination de l'élimination et de la biodégradabilité des composés organiques en milieu aqueux – Essai de simulation des boues activées.

(13) Birch R.R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.

(14) Birch R.R. (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P., Fischer W.K. and Holtmann W. (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.

(16) Baumann U., Kuhn G. and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998). Qualité de l'eau – Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques – Méthode par analyse du carbone inorganique dans des récipients hermétiquement clos (Essai au CO_2 dans l'espace de tête).

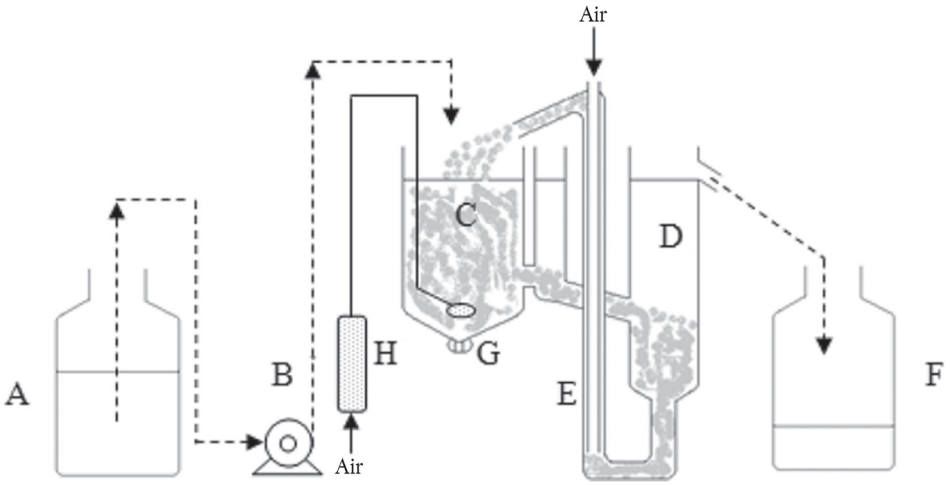
▼**M4**

Appendice 1

Figure 1

Matériel utilisé pour évaluer la biodégradabilité

Unité d'Husmann



A. Récipient de stockage

B. Pompe doseuse

C. Récipient d'aération (3 litres)

D. Décanteur

E. Émulseur à air

F. Collecteur

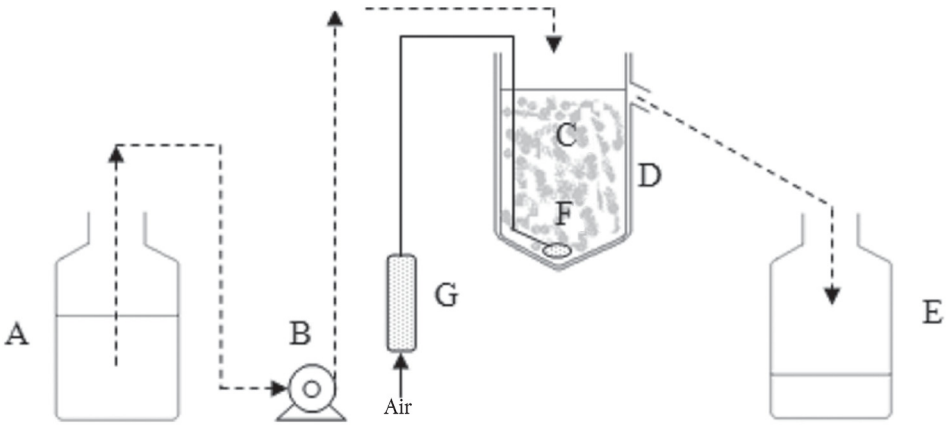
G. Cuve d'aération

H. Débitmètre d'air

Figure 2

Matériel utilisé pour évaluer la biodégradabilité

Vase poreux



A. Récipient de stockage

B. Pompe doseuse

C. Vase d'aération poreux

D. Enveloppe imperméable

E. Collecteur

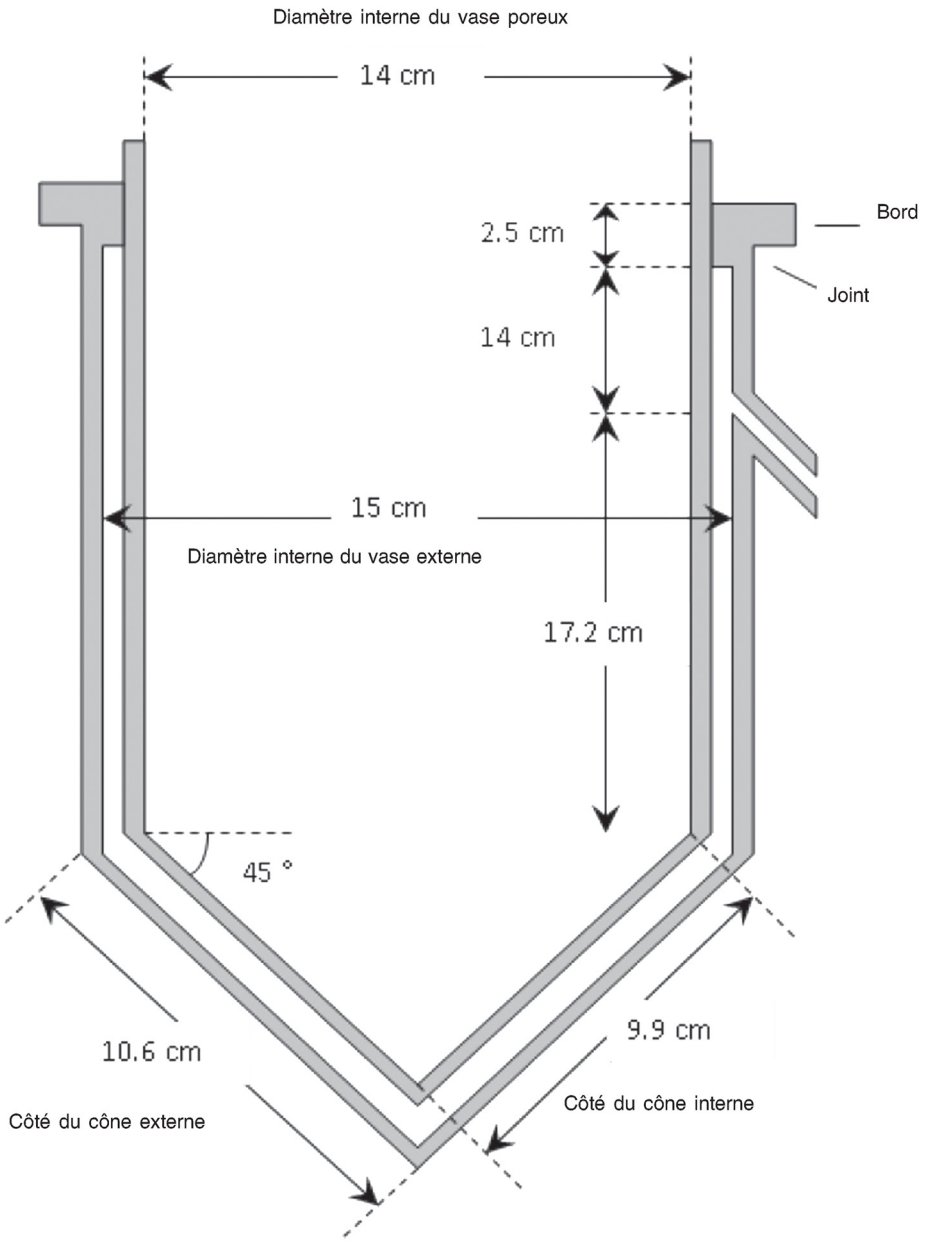
F. Diffuseur

G. Débitmètre d'air

▼M4

Figure 3

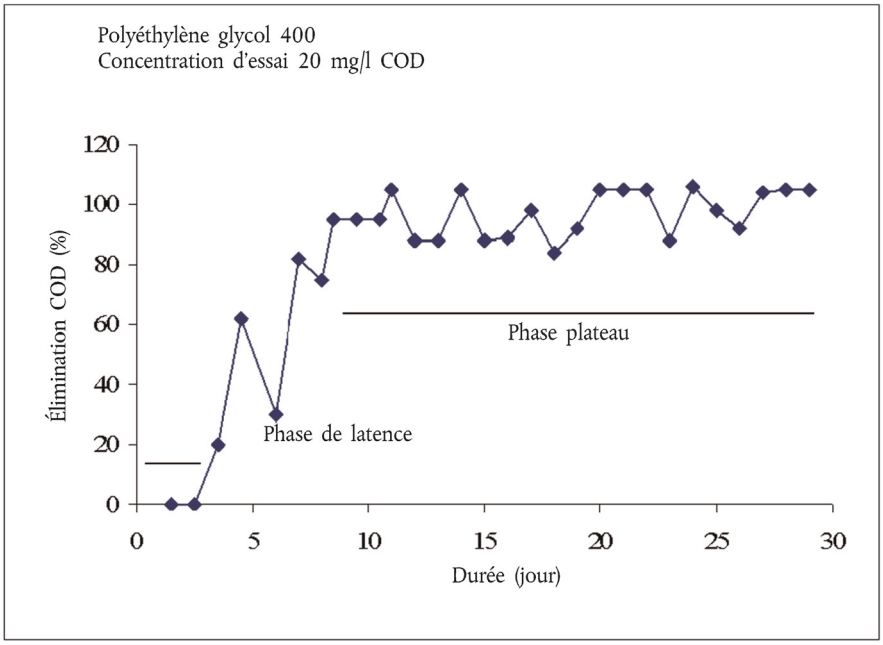
Agrandissement du vase d'aération poreux de 3 litres



▼**M4**

Appendice 2

Exemple d'une courbe d'élimination



▼M4

Appendice 3

COMPLÉMENT D'INFORMATION

COUPLAGE DES UNITÉS D'ESSAI

Pour tenter d'égaliser les populations de micro-organismes dans les boues de l'unité d'essai, qui reçoit les eaux usées et une substance d'essai, et de l'unité témoin, qui ne reçoit que les eaux usées, on a instauré un échange de boue quotidien entre ces deux unités (1). Ce procédé dit «de couplage» a donné lieu à la méthode des unités couplées. Le couplage, réalisé au départ sur des unités à boues activées de Husmann, a aussi été appliqué à des unités à vase poreux (2) (3). Les résultats obtenus avec les unités couplées et non couplées, qu'il s'agisse des unités d'Husmann ou des unités à vase poreux, ne donnent lieu à aucune différence significative, si bien qu'il n'y a aucun avantage à investir plus de temps et d'énergie dans le couplage.

Les échanges de boue peuvent laisser croire à une élimination assez considérable, puisqu'une partie de la substance d'essai est transférée et que l'écart entre la concentration de la substance d'essai dans les effluents d'essai et dans les effluents témoins se comble. Il faut donc appliquer des facteurs de correction qui dépendent de la fraction échangée et du temps de rétention hydraulique moyen. Une méthode de calcul plus détaillée a été publiée (1).

Calculer le degré d'élimination corrigé du COD ou de la DCO selon la formule générale suivante:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

où

D_{tc} = pourcentage d'élimination corrigé du COD ou de la DCO;

D_t = pourcentage d'élimination déterminé du COD ou de la DCO;

a = fraction volumique échangée entre les unités à boues activées;

r = temps de rétention hydraulique moyen (h)

Si, par exemple, la moitié du volume du récipient d'aération est échangée (a = 0,5) et que le temps de rétention hydraulique moyen est de 6 h, la formule de correction devient:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Fischer W., Gerike P., Holtmann W. (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.

(2) Painter H.A., Bealing D.J. (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen B.N., Muntau H., Angeletti G.

(3) Painter H.A., King E.F. (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Appendice 4

ÉVALUATION DE L'INHIBITION DES BOUES ACTIVÉES

Inhibition par les substances d'essai

1. Il se peut qu'une substance chimique (ou des eaux usées) ne soient ni dégradées ni éliminées au cours de l'essai de simulation et qu'elles inhibent de surcroît les micro-organismes des boues. D'autres composés chimiques sont biodégradés à faible concentration, mais ont une action inhibitrice à des concentrations supérieures (hormèse). Les effets inhibiteurs peuvent avoir été révélés à un stade précédent ou être déterminés par un essai de toxicité, conduit sur un inoculum semblable ou identique à celui utilisé au cours de l'essai de simulation (1). Ces méthodes ont trait à l'inhibition de la fixation d'oxygène [chapitre C.11 de la présente annexe (2) et norme ISO 8192 (3)] ou à l'inhibition de la croissance des organismes des boues [norme ISO 15522 (4)].

2. Une inhibition survenant au cours d'un essai de simulation se manifestera par une différence de COD ou de DCO entre les effluents du récipient d'essai et ceux du récipient témoin supérieure au COD ajouté par la substance d'essai. En d'autres termes, la présence de la substance d'essai abaissera le pourcentage d'élimination du COD (et de la demande biochimique en oxygène DBO, de la demande chimique en oxygène DCO, et/ou de l'ion NH^+_4) du milieu organique traité. Si cela se produit, il faudrait recommencer l'essai en ramenant la concentration de la substance d'essai jusqu'à un niveau où elle n'est pas inhibitrice et éventuellement aussi en diminuant davantage sa concentration jusqu'à une valeur où elle est biodégradée. Néanmoins, si la substance d'essai (ou les eaux usées) altèrent le processus à toutes les concentrations testées, il est vraisemblable que la substance est difficile, voire impossible, à traiter par voie biologique, mais il peut être pertinent de répéter l'essai avec des boues activées prélevées à une autre source et/ou en soumettant les boues à une acclimatation plus progressive.

3. Par contre, si la substance d'essai est éliminée par voie biologique du premier coup dans l'essai de simulation, il convient d'accroître sa concentration si l'on cherche à savoir si elle a un pouvoir inhibiteur.

4. N'oublions pas, lorsqu'on tente de déterminer les degrés d'inhibition, que la population d'une boue activée est susceptible d'évoluer, si bien qu'avec le temps, les micro-organismes peuvent devenir résistants vis-à-vis d'une substance inhibitrice.

5. Calcul du degré d'inhibition:

   Les pourcentages d'élimination globaux R_o de la DBO, du COD, de la DCO, etc., dans les unités d'essai et témoins peuvent être calculés comme suit:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\ \%$$

   où:

   I = concentration de la DBO, du COD, de la DCO etc., dans les eaux à traiter des récipients d'essai ou témoins (mg/l);

   E = concentrations respectives dans les effluents (mg/l).

   I et E doivent être corrigés pour tenir compte du COD provenant de la substance d'essai dans les unités d'essai, sinon le calcul du pourcentage d'inhibition sera incorrect.

▼**M4**

Le degré d'inhibition découlant de la présence de la substance d'essai peut être calculé selon cette formule:

$$\%\text{d'inhibition} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

où:

R_c = pourcentage d'élimination dans les récipients témoins;

R_t = pourcentage d'élimination dans les récipients d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Reynolds L. *et al*. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

(2) Chapitre C.11 de la présente annexe, Biodégradation – boues activées: essai d'inhibition de la respiration.

(3) ISO 8192 (2007) Qualité de l'eau – Essai d'inhibition de la consommation d'oxygène par des boues activées pour l'oxydation du carbone et de l'ammonium.

(4) ISO 15522 (1999) Détermination de l'effet inhibiteur des constituants de l'eau sur la croissance des micro-organismes de boues activées.

▼M4

Appendice 5

Substances d'essai peu solubles dans l'eau – substances volatiles

Substances peu solubles dans l'eau

Il semble qu'il y ait peu de publications rapportant des essais de simulation de traitement des eaux usées conduits sur des substances peu solubles dans l'eau et insolubles (1) (2) (3).

Il n'existe pas de méthode de dispersion universelle applicable à toutes les substances d'essai insolubles. Sur les quatre catégories de méthodes décrites dans la norme ISO 10634 (4), les deux qui paraissent convenir à la dispersion des substances destinées à un essai de simulation font appel à des agents émulsifiants et/ou à des ultrasons. La stabilité de la dispersion obtenue doit être établie pour une période d'au moins 24 heures. Des dispersions convenablement stabilisées contenues dans des réservoirs agités en permanence (paragraphe 38), seront ensuite dosées dans le récipient d'aération séparément des eaux usées domestiques ou synthétiques.

Si les dispersions sont stables, étudier comment déterminer la substance d'essai sous sa forme dispersée. Comme le COD risque fort d'être inapproprié, il faudrait mettre au point une méthode d'analyse spécifique de la substance d'essai applicable aux effluents, aux solides des effluents et à la boue activée. Le devenir de la substance d'essai dans la simulation du traitement par boues activées serait alors déterminé dans les phases solides et liquides. On établirait ainsi un bilan massique pour savoir si la substance d'essai a été biodégradée. Mais ce dernier n'indique que la biodégradation primaire. Il faudrait tâcher de démontrer la biodégradation finale par le biais d'un essai de biodégradabilité immédiate au respiromètre [chapitre C.4 de la présente annexe (5), C, F ou D] en utilisant comme inoculum une boue exposée à la substance d'essai au cours de l'essai de simulation.

Substances volatiles

L'application d'un essai de simulation du traitement des eaux usées aux substances volatiles est discutable et problématique. Comme pour les substances d'essai peu solubles dans l'eau, les rapports décrivant des essais de simulation sur des substances volatiles semblent très rares. On adapte un appareil classique de mélange intégral en bouchant hermétiquement le récipient d'aération et le décanteur, en mesurant et contrôlant le flux d'air par des débitmètres et en faisant passer les gaz sortants par des pièges afin de recueillir les matières organiques volatiles. Dans certains cas, une pompe à vide dirige les gaz sortants vers un piège froid ou un piège purgeur contenant du Tenax ou un gel de silice pour analyse par chromatographie en phase gazeuse. La substance d'essai retenue par le piège peut être déterminée par analyse.

L'essai est réalisé en deux parties. Les unités fonctionnent d'abord sans boue, mais en pompant les eaux usées synthétiques additionnées de la substance d'essai dans le récipient d'aération. On analyse la substance d'essai dans des échantillons d'eaux à traiter, d'effluents et de gaz sortants pendant quelques jours. À partir des données recueillies, il est possible de calculer le pourcentage (R_{vs}) de substance d'essai extraite du système.

Ensuite l'essai biologique normal (avec boue) est mené dans des conditions expérimentales identiques à celles de l'étude d'extraction. On mesure aussi le COD ou la DCO pour s'assurer que les unités fonctionnement efficacement. La substance d'essai est mesurée de temps à autre dans les eaux à traiter, les effluents et les gaz sortants au cours de la première partie de l'essai, et plus fréquemment après l'acclimatation. Les données tirées de la phase stationnaire permettent à nouveau de calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai dans la phase liquide par les processus physiques et biologiques (R_T) ainsi que la proportion (R_v) extraite du système.

▼M4

Calcul:

a) Dans l'essai non biologique, le pourcentage (R_{VP}) de substance d'essai extraite du système peut être calculé à partir de la formule suivante:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

où

R_{VP} = élimination de la substance d'essai par volatilisation (%),

S_{VP} = substance d'essai collectée par le piège, exprimée en équivalent de concentration dans la phase liquide (mg/l),

S_{IP} = concentration de la substance d'essai dans les eaux à traiter (mg/l).

b) Dans l'essai biologique, le pourcentage (R_V) de la substance d'essai extraite du système peut être calculé à partir de la formule suivante:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

où

R_V = élimination de la substance d'essai par volatilisation au cours de l'essai biologique (%),

S_V = substance d'essai collectée par le piège au cours de l'essai biologique, exprimée en équivalent de concentration dans les flux liquides entrants (mg/l),

S_I = concentration de la substance d'essai dans les eaux brutes (mg/l).

c) Dans l'essai biologique, le pourcentage (R_T) de substance d'essai éliminée par tous les processus est régi par l'équation suivante:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

où

S_E = concentration de la substance d'essai dans les effluents (liquides) (mg/l).

d) Aussi, le pourcentage (R_{BA}) enlevé par biodégradation et par adsorption peut-il être calculé comme suit:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Il conviendrait de réaliser d'autres essais pour déterminer si la substance d'essai est adsorbée, auquel cas une correction supplémentaire pourrait être apportée.

e) Une comparaison entre la proportion de substance d'essai extraite lors de l'essai biologique (R_v) et de l'essai non biologique (R_{vp}) montre l'effet global du traitement biologique sur l'émission de la substance d'essai dans l'atmosphère.

Exemple: Benzène

Temps de rétention des boues = 4 jours

Eaux usées synthétiques: temps de rétention = 8 heures

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

▼**M4**

Donc,

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % and R_{BA} = 85 %.

On a supposé qu'il n'y avait pas adsorption du benzène sur la boue.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Horn J.A., Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

(2) Pitter P., Chudoba J. (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover E.L., Kincannon D.F. (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Qualité de l'eau – Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.

(5) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité «facile».

▼M4

Appendice 6

Effets du temps de rétention des boues (TRB) sur les possibilités de traitement des substances chimiques

INTRODUCTION

1. La méthode décrite dans le corps de texte a été conçue pour vérifier si les substances chimiques testées (généralement celles connues comme étant intrinsèquement, mais pas immédiatement biodégradables) pouvaient être biodégradées dans les limites imposées par les stations d'épuration des eaux usées. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'élimination et de biodégradation. Les conditions de fonctionnement des unités à boues activées et le choix des eaux à traiter autorisent une variation assez marquée de la concentration de la substance d'essai dans les effluents. Les essais ne portent que sur une seule concentration nominale de solides des boues ou sur un seul temps de rétention nominal des boues (TRB), et les régimes d'épuisement des boues décrits sont susceptibles de faire varier considérablement le TRB durant l'essai, d'un jour à l'autre et sur une journée.

2. Dans cette variante (1) (2), le TRB est régulé dans des limites beaucoup plus étroites tout au long de chaque période de 24 heures (comme à grande échelle), si bien que la concentration des effluents est plus constante. On recommande les eaux usées domestiques, qui donnent des pourcentages d'élimination plus réguliers et plus élevés. Les effets de plusieurs valeurs du TRB sont aussi examinés et l'incidence d'une gamme de températures sur la concentration dans les effluents peut être déterminée dans une étude plus détaillée.

3. Il n'existe pas encore de consensus général sur les modèles cinétiques qui reproduisent la biodégradation des substances chimiques dans les conditions d'une station de traitement des eaux usées. S'agissant des données collectées, le modèle de croissance bactérienne et d'utilisation du substrat de Monod a été choisi (1) (2) dans la mesure où la méthode était destinée à ne s'appliquer qu'aux substances chimiques produites par tonnes et donc présentes à des concentrations supérieures à 1 mg/l dans les eaux usées. La validité du modèle simplifié et des hypothèses émises a été établie à l'aide d'une série d'alcooléthoxylates (2) (3) manifestant des degrés variables de biodégradabilité primaire.

Note: cette variante reprend en grande partie le texte de la présente méthode d'essai C.10-A, seuls les détails qui s'en écartent étant mentionnés ci-après.

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. Des unités à boues activées comportant un vase poreux, conçues pour faciliter l'épuisement (presque) continu de la liqueur mixte grâce à un réglage très précis du temps de rétention des boues (TRB, ou θ_s), fonctionnent en mode non couplé et couvrent une gamme de temps de rétention et, facultativement, de températures. Le temps de rétention varie généralement entre 2 et 10 jours et la température entre 5 et 20 °C. Les eaux usées, de préférence domestiques, et une solution de la substance d'essai sont dosées séparément dans les unités à des fréquences induisant le temps de rétention des eaux usées requis (3 à 6 heures) et la concentration voulue de la substance d'essai dans les eaux à traiter. Les unités témoins qui ne reçoivent pas la substance d'essai tournent en parallèle, à des fins de comparaison.

5. D'autres types d'appareils peuvent être utilisés, mais il faut être très attentif à bien maîtriser le TRB. Lorsqu'on utilise, par exemple, des installations qui comprennent un décanteur, il peut être nécessaire de tenir compte de la perte de solides via les effluents de l'installation. En outre, les erreurs dues à la variation de la quantité de boue dans le décanteur doivent être évitées par des précautions particulières.

▼M4

6. Les unités fonctionnent sous chaque combinaison de conditions choisie et, une fois l'équilibre atteint, on mesure les concentrations moyennes de la substance d'essai dans les effluents à l'état stationnaire et, facultativement, le COD, sur une période d'environ trois semaines. L'évaluation du pourcentage d'élimination de la substance d'essai et, facultativement, du COD, sera complétée par une représentation graphique de la relation entre les conditions de fonctionnement de l'installation et la concentration dans les effluents. À partir de là, il est possible de calculer des constantes cinétiques expérimentales et de prévoir les conditions dans lesquelles la substance d'essai peut être traitée.

INFORMATION SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

7. Appliquer les paragraphes 12 et 13 du chapitre C.10-A.

NIVEAUX DE SEUILS

8. Appliquer les paragraphes 14 et 15 du chapitre C.10-A.

SUBSTANCE D'ESSAI DE RÉFÉRENCE

9. Appliquer le paragraphe 16 du chapitre C.10-A.

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS D'ESSAI

10. Appliquer les paragraphes 17 et 18 du chapitre C.10-A.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareils

11. Une unité qui convient ici est une adaptation du système du vase poreux (appendice 6.1). Elle consiste en un vase interne (ou revêtement) en polypropylène poreux de 3,2 mm d'épaisseur dont les pores mesurent environ 90 μm; l'assemblage est soudé bout à bout, ce qui rend l'unité plus robuste que celle décrite au paragraphe 21 du présent chapitre, C.10-A). Le revêtement est entouré d'une enveloppe en polyéthylène imperméable qui comprend deux parties: une base circulaire perforée pour laisser passer deux tuyaux à air et un tuyau transportant la boue épuisée, et un cylindre vissé sur le dessus de la base et doté d'une sortie placée de manière à ce qu'il déverse un volume connu (3 l) dans le vase poreux. L'un des deux tuyaux à air est équipé d'une pierre diffuseuse et l'autre est ouvert aux extrémités et disposé à angle droit de la pierre dans le vase. Ce système crée suffisamment de turbulences pour assurer un mélange intégral des composants du vase et engendrer des concentrations en oxygène dissous supérieures à 2 mg/l.

12. Les unités, en nombre adéquat, sont placées dans un bain-marie ou dans des locaux à température constante et thermostatées entre 5 et 20 °C (± 1 °C). On emploie deux pompes pour doser la solution de la substance d'essai et les boues décantées dans les récipients d'aération aux débits requis (respectivement 0-1,0 ml/min et 0-25 ml/min) et une troisième pompe pour évacuer la boue épuisée des récipients d'aération. Le débit nécessairement très lent des boues épuisées est imprimé par une pompe qui fonctionne à une vitesse supérieure et par intermittences, au moyen d'un minuteur qui l'actionne, par exemple, pendant 10 secondes par minute avec un débit de 3 ml/min, ce qui donne un débit de boue épuisée de 0,5 ml/min.

Appareil de filtration ou centrifugeuse

13. Appliquer le paragraphe 23 du chapitre C10-A.

Matériel d'analyse

14. Appliquer le paragraphe 24 du chapitre C.10-A.

Eau

▼**M4**

15. Appliquer les paragraphes 25 et 26 du chapitre C.10-A.

Milieu organique

16. Appliquer le paragraphe 27 du chapitre C.10-A.

Eaux usées synthétiques

17. Appliquer le paragraphe 28 du chapitre C.10-A.

Eaux usées domestiques

18. Appliquer le paragraphe 29 du chapitre C.10-A.

Boues activées

19. Appliquer le paragraphe 30 du chapitre C10-A.

Solutions mères de la substance d'essai

20. Appliquer les paragraphes 31 et 32 du chapitre C.10-A.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation de l'inoculum

21. Voir chapitre C.10-A, paragraphe 34 uniquement – utiliser des boues activées (environ 2,5 g/l).

Nombre d'unités d'essai

22. S'agissant d'un essai simple, qui ne vise qu'à mesurer le pourcentage d'élimination, un seul TRB suffit, mais si on veut réunir les données nécessaires pour calculer les constantes cinétiques expérimentales, on aura besoin de 4 ou 5 valeurs de TRB. Les valeurs choisies sont généralement comprises entre 2 et 10 jours. Il est plus pratique de réaliser un essai en appliquant 4 ou 5 valeurs de TRB simultanément à la même température; les études plus poussées portent sur les mêmes valeurs de TRB, ou éventuellement sur une gamme de valeurs différentes, à d'autres températures fixées entre 5 et 20 °C. La biodégradation primaire (utilisation principale) ne requiert normalement qu'une seule unité par combinaison de conditions. Il faut ajouter une unité témoin par combinaison de conditions, qui reçoit les eaux usées mais pas la substance d'essai, pour la biodégradation finale. Si on suppose que les eaux usées employées renferment la substance d'essai, il y a lieu d'incorporer des unités témoins lorsqu'on évalue la biodégradation primaire, et d'apporter les corrections nécessaires aux calculs.

Dosage du milieu organique et de la substance d'essai

23. Voir le chapitre C.10-A, paragraphes 36 à 39, mais remarquer que la solution de la substance d'essai est dosée séparément et différents débits de boues épuisées sont appliqués. Surveiller fréquemment, par exemple deux fois par jour et ajuster si nécessaire à ± 10 pour cent, les débits des eaux à traiter, des effluents et des boues épuisées. Si les méthodes d'analyse posent des difficultés avec les eaux usées domestiques, mener l'essai avec de l'eau usée synthétique, en s'assurant que différents milieux donnent des résultats cinétiques comparables.

Manipulation des boues activées

24. S'aligner sur le chapitre C.10-A, paragraphes 40 à 43, mais ne réguler le TRB que par un débit «constant» de boues épuisées.

Échantillonnage et analyse

25. Se référer au chapitre C.10-A, paragraphes 44 à 50, à cette exception près qu'on déterminera la concentration de la substance d'essai et, facultativement, le COD, mais la DOC ne doit pas être utilisée.

▼M4

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

26. Suivre le chapitre C.10-A, paragraphes 52 à 54.

Expression des résultats de l'essai

27. Suivre le chapitre C.10-A, paragraphes 56 à 62.

Calcul des constantes cinétiques

28. Il est plus réaliste de mentionner la concentration moyenne de la substance d'essai à l'état stationnaire dans l'effluent et de décrire comment elle varie en fonction des conditions de fonctionnement de l'installation que de citer le pourcentage de biodégradation primaire. L'équation [6] de l'appendice 6.2 est utile à cet égard, qui livre des valeurs de K_S, μ_m et θ_{SC}, le temps de rétention critique des boues.

[Des valeurs approximatives de K_S et de μm peuvent aussi être déduites à l'aide d'un programme informatique simple qui ajuste la courbe théorique calculée à partir de l'équation [2] (appendice 6.2) aux valeurs expérimentales. Bien qu'une solution donnée ne constitue pas une réponse absolue, on peut parvenir à une approximation raisonnable de K_S et de μ_m].

Variabilité des résultats

29. Il est fréquent de trouver des paramètres cinétiques variables pour une même substance. On pense que les conditions de croissance des boues et les conditions dans lesquelles s'est déroulé l'essai (comme au paragraphe 5 et dans d'autres essais) ont une incidence marquée sur les résultats. Un aspect de cette variabilité a été examiné par Grady *et al.* (4), qui ont proposé que les termes «effectif» et «intrinsèque» s'appliquent à deux états extrêmes représentant les limites de l'état physiologique qu'une culture peut atteindre au cours d'une expérience cinétique. Si l'état est maintenu durant l'essai, les valeurs du paramètre cinétique reflètent les conditions du milieu dans lequel les micro-organismes ont été prélevés; ces valeurs sont dites «effectives». À l'autre extrême, si les conditions de l'essai autorisent le plein développement du système de synthèse des protéines et donc un taux de croissance maximum, les paramètres cinétiques résultants sont dits «intrinsèques» et ne dépendent que de la nature du substrat et des types de bactéries qui composent la culture. À titre indicatif, on obtiendra des valeurs effectives en appliquant un rapport de la concentration du substrat sur les micro-organismes qui dégradent (S_o/X_o) faible, par exemple de 0,025, et les valeurs intrinsèques apparaîtront avec un rapport élevé, par exemple d'au moins 20. Dans les deux cas, S_o doit être supérieur ou égal à la valeur applicable de Ks, la constante de demi-saturation.

30. La variabilité et d'autres aspects de la cinétique de biodégradation ont été examinés lors d'une réunion récente du SETAC (5). Qu'elles aient fait l'objet de publications ou qu'il s'agisse de projets, ces études devraient bientôt livrer une image plus claire de la cinétique qui gouverne le traitement des eaux usées dans les stations et permettre ainsi de mieux interpréter les données existantes et d'avancer des conceptions plus pertinentes concernant de futures méthodes d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Birch R.R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.

(2) Birch R.R. (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. JAOCS, 61(2): 340-343.

(3) Birch R.R. (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

▼**M4**

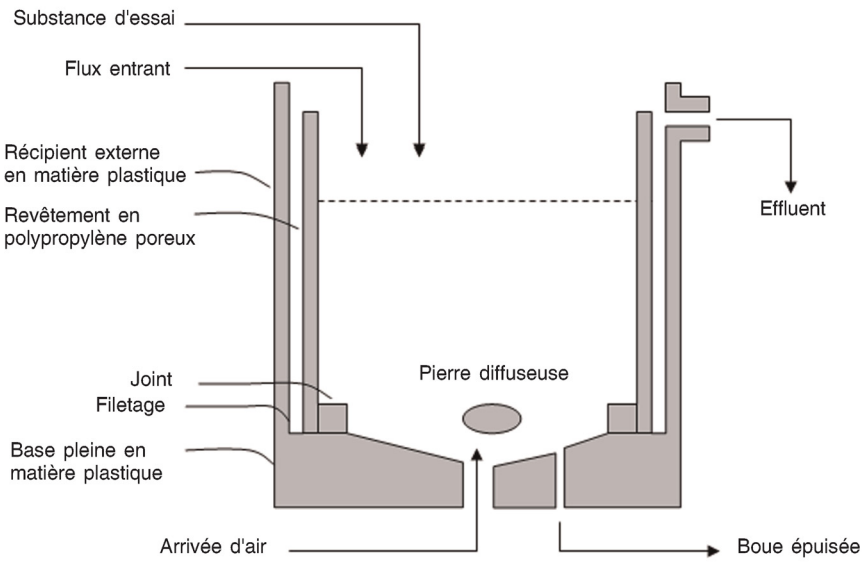
(4) Grady C.P.L., Smets B.F. and Barbeau D.S. (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales S.G., Feitjel T., King H., Fox K., Verstraete W. 4-6th September 1996. SETAC – Europe, Brussels.

▼**M4**

Appendice 6.1

Vase poreux avec régulation du TRB



▼M4

Appendice 6.2

Calcul des constantes cinétiques

1. En supposant que la cinétique de Monod s'applique et compte tenu d'un bilan massique de solides actifs et de substrat dans le système à boues activées (1), les expressions suivantes décrivent l'état stationnaire:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

ou

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

Où:

S_1 = concentration de substrat dans les effluents (mg/l)

K_S = constante de demi-saturation, concentration à laquelle $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = taux de croissance spécifique (d^{-1})

μ_m = valeur maximale de μ_m (d^{-1})

K_d = vitesse de dégradation spécifique des solides actifs (d^{-1})

θ_S = temps de rétention moyen des boues, TRB (d)

L'étude de cette équation amène les conclusions suivantes:

i) La concentration dans les effluents est indépendante de celle qui règne dans les eaux à traiter (S_0); aussi, le pourcentage de biodégradation varie-t-il avec la concentration dans les eaux à traiter, S_0.

ii) Le seul paramètre régulé de l'installation qui affecte S_1 est le temps de rétention des boues, θ_S.

iii) Une concentration donnée dans les eaux à traiter, S_0, correspondra à un temps de rétention critique des boues selon la relation:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

Où:

θ_{SC} = temps de rétention critique des boues, en dessous duquel les micro-organismes qui dégradent seront expulsés de l'installation.

iv) Comme les autres paramètres de l'équation [2] sont liés à la cinétique de croissance, la température est susceptible d'affecter la teneur en substrat dans les effluents et l'âge critique des boues, en d'autres termes, le temps de rétention des boues nécessaire pour obtenir un certain degré de traitement augmenterait à mesure que la température diminuerait.

2. Soit un bilan massique de solides dans le système à vase poreux, et en supposant que la concentration des solides dans les effluents de la station, X_2, est faible comparée à celle du récipient d'aération, X_1, le temps de rétention des boues s'exprime comme suit:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

et

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

où:

V = volume du récipient d'aération (l)

X_1 = concentration des solides dans le récipient d'aération (mg/l)

X_2 = concentration des solides dans l'effluent (mg/l)

Q_0 = débit des eaux à traiter (l/d)

Q_1 = débit des boues épuisées (l/d)

Il est donc possible de régler le temps de rétention des boues sur n'importe quelle valeur présélectionnée en régulant le débit des boues épuisées, Q_1.

Conclusions:

3. Cet essai vise principalement à permettre de prédire la concentration dans les effluents et, à partir de là, la concentration de la substance d'essai dans les eaux réceptrices.

4. La courbe de S_1 en fonction de θ_S autorise parfois une évaluation immédiate du temps de rétention critique des boues, θ_{SC}; voir par exemple la courbe 3 à la figure 1. Si c'est impossible, on peut calculer θ_{SC} en même temps que des valeurs approximatives de μ_m et K_S, en traçant S_1 en fonction de $S_1 \bullet \theta_S$.

L'équation [1] est reformulée en ces termes:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Si K_d est petit, alors $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ et [5] devient:

$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Par la suite, la courbe devrait prendre l'allure d'une droite (voir figure 2) de pente $1/\mu_m$ et intercepter K_S/μ_m; et $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

Figure 1

Trois températures; cinq TRB

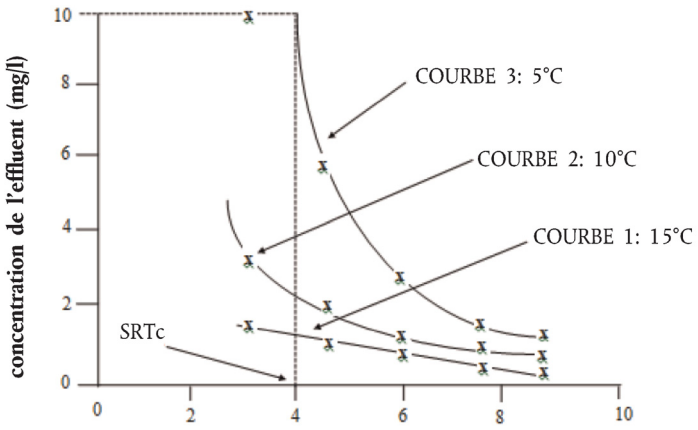
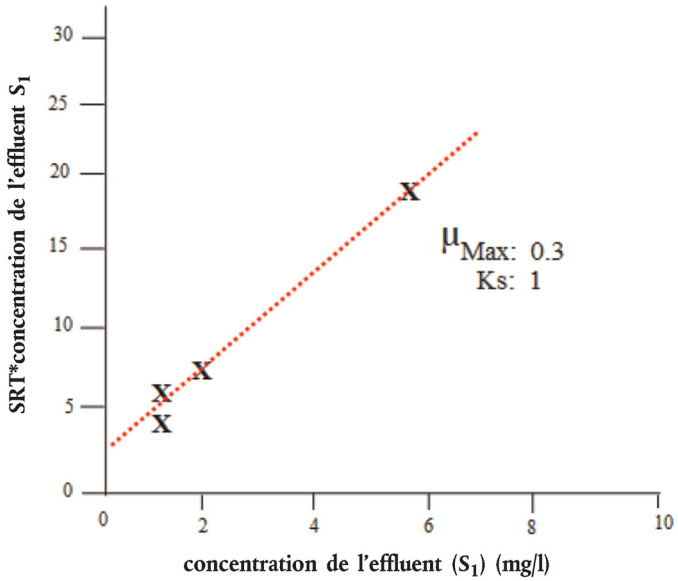


Figure 2

Droite de régression TRB · S_1 en fonction de S_1 à T = 5 °C



Glossaire

concentration de l'effluent.

courbe.

▼M4

Appendice 7

ESSAIS RÉALISÉS À FAIBLES CONCENTRATIONS (µG/L)

1. De nombreuses substances chimiques sont normalement présentes dans le milieu aquatique, même dans les eaux usées, à de très faibles concentrations (µg/l). À de telles teneurs, elles ne servent probablement pas de substrats primaires pour la croissance, et il est plus vraisemblable qu'elles subissent une dégradation en tant que substrats secondaires sans intervenir dans la croissance, parallèlement à diverses substances chimiques carbonées naturelles. Par conséquent, les dégradations de ces substances chimiques ne correspondront pas au modèle décrit à l'appendice 6. De nombreux modèles pourraient les représenter et, dans les conditions qui régissent les systèmes de traitement des eaux usées, celles-ci peuvent probablement se refléter simultanément dans plusieurs modèles. Il faudra entreprendre des recherches bien plus poussées pour élucider ce problème.

2. En attendant, le mode opératoire exposé dans le corps de texte (chapitre C.10-A) peut être suivi, mais il ne s'applique qu'à la biodégradabilité primaire, à des concentrations suffisamment basses (< 100 µg/l), et requiert une méthode d'analyse validée. Le pourcentage de biodégradation peut être calculé (voir au paragraphe 54 de la présente méthode d'essai), mais à condition de tenir compte des processus non biologiques (adsorption, volatilité, etc.). L'étude conduite par Nyholm et son équipe (1) (2) sur un cycle de quatre heures dans un système à lit de contact en est un exemple. Ils ont opposé des pseudo-constantes de premier ordre pour cinq substances chimiques ajoutées à des eaux usées synthétiques à raison de 5 à 100 µg/l (s'agissant de la biodégradabilité finale, des substances d'essai marquées au ^{14}C peuvent être utilisées). La description d'un procédé n'entre pas dans le cadre de la présente méthode d'essai dans la mesure où aucun ne fait encore l'unanimité, bien qu'une méthode proposée pour la norme ISO 14592 (3) contienne des indications concernant l'emploi de substances marquées au ^{14}C.

Essai de biodégradation en semi-continu à l'aide de boues activées

3. Un essai plus simple en deux étapes a été présenté ultérieurement (4) (5) (6); la méthode en semi-continu à l'aide de boues activées (SCBA) est suivie par des essais cinétiques à court terme pratiqués sur des échantillons prélevés dans les unités SCBA. Les débits de boues épuisées sont connus dans le système SCBA (contrairement à la méthode d'essai originale C.12), qui est alimenté par des eaux usées synthétiques (formule de l'OCDE modifiée) ou par des eaux usées domestiques. Les eaux usées synthétiques ont été modifiées (à cause de la fluctuation du pH et de la mauvaise décantabilité des boues) par addition d'un tampon phosphate, d'un extrait de levure, de chlorure de fer (III) et de sels d'oligo-éléments, et leur DCO a été relevée jusqu'à environ 750 mg/l moyennant une augmentation de la concentration de peptone et d'extrait de viande. Les unités tournaient en cycles de 24 heures: aération pendant 23 heures, épuisement des boues, décantation, enlèvement du surnageant (effluent), suivis par l'adjonction des eaux usées synthétiques et de la substance d'essai jusqu'à 100 µg/l (c'est-à-dire à peu près la même concentration que celle appliquée dans l'essai à court terme). Une fois par semaine, on remplace 10 pour cent de la totalité des boues par des boues fraîches, afin de maintenir l'équilibre de la population de micro-organismes.

4. Les concentrations de la substance d'essai sont mesurées au début et à la fin de l'aération, et l'essai est poursuivi jusqu'à ce que l'élimination de la substance d'essai devienne constante, ce qui peut prendre une semaine à plusieurs mois.

Essai à court terme

5. Pratiquer un essai à court terme (8 heures, par exemple), afin de déterminer la pseudo-constante cinétique de premier ordre relative à la dégradation de la substance d'essai dans des boues activées ayant des origines et des évolutions différentes, mais connues. En particulier, prélever des échantillons de boues des réacteurs SCBA – à la fin d'une période d'aération lorsque la concentration de substrat organique est basse – au cours d'un essai d'acclimatation (paragraphes 3, 4). On peut aussi prélever des boues d'une unité

▼M4

SCBA tournant en parallèle et non exposée à la substance d'essai, pour comparaison. Aérer des mélanges de boue et de substance d'essai incorporée à deux ou plusieurs concentrations comprises entre 1 et 50 µg/l, sans ajouter d'eaux usées synthétiques ni d'autre substrat organique. La substance d'essai restant en solution est mesurée à intervalles réguliers, par exemple toutes les heures, suivant la dégradabilité de la substance, durant une période qui n'excède pas 24 heures. Centrifuger les échantillons avant de les soumettre à une analyse appropriée..

Calculs

6. Les données provenant des unités SCBA servent à calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai (paragraphe 54). Une constante de vitesse moyenne, K_1 (établie en fonction de la concentration des solides en suspension), peut aussi être calculée à partir de la formule suivante:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

Où:

t = durée d'aération (23 h)

C_e = concentration à la fin de la période d'aération (µg/l)

C_i = concentration au début de l'aération (µg/l)

SS = concentration des solides des boues activées (g/l)

7. Dans l'essai à court terme, tracer la courbe du logarithme de la concentration (%) restante en fonction du temps; la pente de la partie initiale (10-50 pour cent de dégradation) de la courbe est équivalente à K_1, la pseudo-constante de premier ordre. Établir la constante en fonction de la concentration des solides des boues en divisant la pente par la concentration de ces solides. Le résultat indiqué doit préciser les concentrations initiales de la substance d'essai et des solides en suspension, le temps de rétention des boues, la charge et la source des boues ainsi que, le cas échéant, la préexposition à la substance d'essai.

Variabilité des résultats

8. La variabilité et d'autres aspects de la cinétique de biodégradation ont été examinés lors d'une réunion récente du SETAC (7). Qu'elles aient fait l'objet de publications ou qu'il s'agisse de projets, ces études devraient bientôt livrer une image plus claire de la cinétique qui gouverne le traitement des eaux usées dans les stations et permettre ainsi de mieux interpréter les données existantes et d'avancer des conceptions plus pertinentes concernant de futures méthodes d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Nyholm N., Jacobsen B.N., Pedersen B.M., Poulsen O., Dambourg A. and Schultz B. (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339-353.

(2) Jacobsen B.N., Nyholm N., Pedersen B.M., Poulsen O., and Ostfeldt P. (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

(4) Nyholm N., Ingerslev F., Berg U.T., Pedersen J.P. and Frimer-Larsen H. (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851-864.

(5) Berg U.T. and Nyholm N. (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711-735.

(6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, S.G. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th September 1996. SETAC – Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Biofilms

INTRODUCTION

1. Les essais de simulation s'appliquent normalement aux substances chimiques qui ont donné un résultat négatif à l'essai de biodégradabilité immédiate [chapitre C.4-A à F de la présente annexe (9)], mais un résultat positif à l'essai de biodégradabilité intrinsèque. Exceptionnellement, les essais de simulation se pratiquent aussi en vue d'obtenir des informations supplémentaires sur une substance d'essai, en particulier les substances chimiques produites en grandes quantités, et l'on recourt normalement à l'essai de traitement par boues activées (C.10-A). Toutefois, dans certaines circonstances, il y a lieu de connaître certaines données particulières concernant la réaction d'une substance chimique à des méthodes de traitement des eaux usées comportant des biofilms, à savoir des lits à ruissellement ou lits bactériens, des disques biologiques et des lits fluidisés. Différents dispositifs ont été créés à cette fin.

2. Gerike *et al.* (1) ont utilisé de grands lits bactériens en mode couplé à l'échelle pilote. Ces lits occupaient beaucoup d'espace et exigeaient des volumes relativement élevés d'eaux usées domestiques ou synthétiques. Truesdale *et al.* (2) ont décrit des lits plus petits (1,83 m × 0,15 m de diamètre) alimentés par des eaux usées naturelles dépourvues de tensioactifs, mais qui demandaient encore des volumes assez importants. Il ne fallait pas moins de 14 semaines pour qu'un biofilm arrive à «maturité» et 4 à 8 semaines supplémentaires après la première introduction du tensioactif d'essai pour l'acclimatation.

3. Baumann et al. (3) ont mis au point un lit beaucoup plus petit à base de polyester «velu» préalablement plongé dans des boues activées, servant de substrat inerte pour le biofilm. La substance d'essai constituait la seule source de carbone et la biodégradabilité était évaluée d'après la mesure du carbone organique dissous (COD) dans les eaux à traiter et les effluents, et la quantité de CO_2 dans les dégagements gazeux.

4. Une approche assez différente a été tentée par Gloyna *et al.* (4), qui ont inventé le réacteur tubulaire rotatif. Ils ont cultivé un biofilm sur la surface interne d'un tube rotatif, sur la superficie connue, en y faisant passer des eaux à traiter qu'ils déversaient au sommet du tube légèrement incliné par rapport à l'horizontale. Le réacteur a servi à étudier la biodégradabilité des tensioactifs (5) ainsi que l'épaisseur optimale du biofilm et la diffusion à travers le film (6). Ces auteurs ont perfectionné le réacteur, notamment pour pouvoir déterminer le CO_2 dans les dégagements gazeux.

5. Le réacteur tubulaire rotatif a été adopté par le Standing Committee of Analysts (Royaume-Uni) comme méthode de référence pour évaluer la biodégradabilité des substances chimiques (7) ainsi que les possibilités de traitement des eaux usées et leur toxicité (8). La méthode décrite ici est simple, concise et reproductible et, de surcroît, ne nécessite que des volumes relativement petits de milieu organique.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Des eaux usées synthétiques ou domestiques et la substance d'essai sont appliquées, séparément ou incorporées, sur la surface interne d'un tube incliné en rotation lente. Une couche de micro-organismes, semblables à ceux présents dans le milieu du biofiltre, se développe sur la surface interne. Le fonctionnement du réacteur est régulé de telle sorte qu'il entraîne une élimination adéquate de la matière organique et, si nécessaire, l'oxydation de l'ammonium.

▼M4

7. Les effluents du tube sont collectés et décantés et/ou filtrés avant l'analyse du carbone organique dissous (COD) et/ou de la substance d'essai par une méthode spécifique. Les unités témoins, qui ne reçoivent pas la substance d'essai, tournent en parallèle dans les mêmes conditions, à des fins de comparaison. La différence entre les concentrations de COD dans les effluents de l'unité d'essai et de l'unité témoin est imputée par hypothèse à la substance d'essai et à ses métabolites organiques. On compare cette différence à la concentration de la substance d'essai ajoutée (en termes de COD) pour calculer l'élimination de la substance d'essai.

8. Il est normalement possible de distinguer la biodégradation de la bioadsorption par un examen attentif de la courbe d'élimination en fonction du temps. L'observation peut généralement être confirmée par un essai de biodégradabilité immédiate (consommation d'oxygène ou production de dioxyde de carbone) réalisé à l'aide d'un inoculum acclimaté prélevé à la fin de l'essai dans les réacteurs qui reçoivent la substance d'essai.

INFORMATION SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

9. La pureté, la solubilité dans l'eau, la volatilité et les caractéristiques d'adsorption de la substance d'essai doivent être connues pour que l'interprétation des résultats soit correcte.

10. Normalement, les substances chimiques volatiles et peu solubles ne peuvent être mises à l'essai sans précautions particulières (voir appendice 5 du chapitre C.10-A). Il faudrait connaître également la formule chimique développée ou, au moins, empirique, pour calculer les valeurs théoriques et/ou vérifier les valeurs mesurées de paramètres tels que la demande théorique en oxygène (DthO) et le carbone organique dissous (COD).

11. Des données sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes (voir appendice 4 du chapitre C.10-A) peuvent aussi être utiles à la sélection des concentrations d'essai appropriées et essentielles pour l'interprétation correcte de faibles valeurs de biodégradation.

NIVEAUX DE SEUIL

12. À l'origine, la mise sur le marché des tensioactifs était subordonnée à un taux de biodégradation primaire supérieur ou égal à 80 pour cent. Faute d'atteindre un taux de 80 pour cent, on peut mener cet essai de simulation (de confirmation) à l'issue duquel le tensioactif ne sera mis sur le marché que s'il est éliminé à plus de 90 pour cent. En général, avec les produits chimiques, la question d'un résultat d'essai positif ou négatif n'entre pas en jeu, et le pourcentage d'élimination obtenu peut servir à calculer en gros la concentration probable dans l'environnement à introduire dans l'évaluation des risques dus aux substances chimiques. Le pourcentage d'élimination du COD atteint dans plusieurs études sur des substances chimiques pures était supérieur à 90 pour cent pour plus des trois quarts des produits chimiques présentant un degré de biodégradabilité significatif et supérieur à 80 pour cent pour plus de 90 pour cent d'entre eux.

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

13. Pour s'assurer que le mode opératoire est correctement suivi, il est quelquefois utile de tester des substances chimiques dont le comportement est connu. Il s'agit notamment de l'acide adipique, du 2-phénylphenol, du 1-naphthol, de l'acide diphénique, de l'acide 1-naphthoïque.

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS D'ESSAI

14. L'écart-type obtenu par un laboratoire britannique s'élevait à 3,5 % au moment des essais et à 5 % entre les essais (7).

▼M4

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareils

Réacteurs tabulaires rotatifs

15. L'appareil (voir figures 1 et 2 de l'appendice 8) consiste en une batterie de tubes en acrylique de 30,5 cm de long et 5 cm de diamètre interne, supportés par des roulettes entourées de caoutchouc, fixées sur un cadre métallique. Chaque tube s'accroche aux roulettes par un bourrelet extérieur de 0,5 cm d'épaisseur environ, et possède un bourrelet interne de la même épaisseur à l'extrémité supérieure (d'alimentation) pour retenir le liquide; la surface interne a été rendue rugueuse par un tampon de laine à poils épais. Les tubes sont inclinés à un angle d'environ un degré par rapport à l'horizontale pour que le milieu d'essai appliqué sur un tube propre reste en contact avec celui-ci le temps nécessaire. Les roulettes revêtues de caoutchouc sont actionnées par un moteur lent à vitesse variable. La température des tubes est régie par leur installation dans un local à température constante.

16. En enfermant chaque réacteur tubulaire dans un tube légèrement plus grand et fermé par un capuchon en veillant à ce que les connexions soient étanches aux gaz, on peut collecter les dégagements de CO_2 dans une solution alcaline en vue de mesures ultérieures (6).

17. Chaque tube est alimenté en milieu organique et en substance d'essai, le cas échéant, par un réservoir de 20 litres (A) (voir figure 2) pour une période de 24 heures. Si nécessaire, la solution de la substance d'essai peut être dosée séparément. Il existe un orifice de sortie situé près du fond de chaque réservoir connecté par un tuyau fait d'une matière appropriée, par exemple du caoutchouc de silicone, via une pompe péristaltique (B) à un tube en verre ou en acrylique qui s'enfonce sur 2 à 4 cm à l'intérieur de l'extrémité supérieure (d'alimentation) du tube incliné (C). L'effluent s'égoutte ainsi de l'extrémité inférieure du tube incliné dans un autre récipient de stockage (D). L'effluent est décanté ou filtré avant analyse.

Appareil de filtration – centrifugeuse

18. Les échantillons seront filtrés à travers une membrane possédant une porosité adéquate (diamètre d'ouverture nominale de 0,45 μm) qui adsorbe les composés organiques solubles et libère le moins possible de carbone organique. Si les lits utilisés libèrent du carbone organique, il faut les laver soigneusement à l'eau chaude afin d'évacuer le carbone organique lixiviable. Une centrifugeuse tournant à 40 000 m/s^2 peut remplacer l'appareil de filtration.

19. Matériel d'analyse permettant de déterminer:

— le rapport carbone organique dissous (COD)/carbone organique total (COT), ou la demande chimique en oxygène (DCO),

— la substance chimique donnée (CLHP, CG, etc.) s'il y a lieu,

— le pH, la température, l'acidité, l'alcalinité,

— l'ammonium, les nitrites et les nitrates, si les essais sont réalisés dans des conditions nitrifiantes.

Eau

20. Eau du robinet renfermant moins de 3 mg/l de COD.

21. Eau distillée ou désionisée contenant moins de 2 mg/l de COD.

▼M4

Milieu organique

22. Les eaux usées synthétiques, les eaux usées domestiques ou un mélange des deux sont acceptés comme milieu organique. Comme il a été démontré que les eaux usées domestiques employées seules augmentaient souvent le pourcentage d'élimination du COD (dans les unités à boues activées) et entraînaient même la biodégradation de certaines substances chimiques non biodégradées par les eaux usées synthétiques formulées selon l'OCDE, on préconise l'utilisation d'eaux usées domestiques. On mesure la concentration du COD ou de la DCO dans chaque nouveau lot de milieu organique. L'acidité ou l'alcalinité du milieu organique doivent être connues. Il peut être nécessaire de tamponner le milieu organique par un composé approprié (hydrogénocarbonate de sodium ou hydrogénophosphate de potassium) s'il est faiblement acide ou alcalin, pour maintenir le pH à environ 7,5 ± 0,5 dans le réacteur durant l'essai. La quantité de tampon à ajouter et le moment de cette addition seront décidés au cas par cas.

Eaux usées synthétiques

23. Dans chaque litre d'eau du robinet, dissoudre 160 mg de peptone, 110 mg d'extrait de viande, 30 mg d'urée, 28 mg d'hydrogénophosphate de potassium anhydre (K_2HPO_4), 7 mg de chlorure de sodium (NaCl), 4 mg de chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2.2H_2O$) et 2 mg de sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4.7H_20$). Cette eau usée synthétique formulée selon l'OCDE offre un exemple où la concentration moyenne de COD dans les eaux à traiter atteint quelque 100 mg/l. On utilisera en alternance d'autres compositions donnant à peu près la même concentration de COD, plus proches des eaux usées domestiques. Ces eaux usées synthétiques peuvent être confectionnées à base d'eau distillée, sous une forme concentrée, et stockées à environ 1 °C pendant une semaine au maximum. Selon les besoins, diluer avec de l'eau du robinet (ce milieu n'est pas satisfaisant, notamment parce qu'il présente une concentration en azote très élevée et une teneur en carbone relativement faible, mais rien de mieux n'a été suggéré, en dehors d'un supplément de tampon phosphate et de peptone).

Eaux usées domestiques

24. Utiliser des eaux usées qui viennent d'être décantées, recueillies quotidiennement dans une station d'épuration qui reçoit principalement des eaux usées domestiques. Elles doivent être prélevées au niveau du déversoir de la cuve de sédimentation primaire ou dans les eaux à traiter de la station de traitement par boues activées et renfermer très peu de grosses particules. Les eaux usées peuvent être utilisées après plusieurs jours de stockage à environ 4 °C, s'il est prouvé que le COD (ou la DCO) n'a pas diminué de manière significative (c'est-à-dire de moins de 20 pour cent) durant le stockage. Afin de limiter la perturbation du système, il conviendrait d'ajuster le COD (ou la DCO) de chaque nouveau lot avant son utilisation à une valeur constante adéquate, par exemple en le diluant avec de l'eau du robinet.

Lubrifiant

25. Les roulettes de la pompe péristaltique peuvent être lubrifiées avec du glycérol ou de l'huile d'olive: les deux conviennent aux tubes en caoutchouc de silicone.

Solutions mères de la substance d'essai

26. Pour les substances chimiques présentant une solubilité convenable, préparer des solutions mères aux concentrations appropriées (par exemple, 1 à 5 g/l) dans de l'eau désionisée, ou dans la fraction minérale de l'eau usée synthétique. En ce qui concerne les substances chimiques insolubles, se reporter à l'appendice 5 du chapitre C.10-A. La présente méthode n'est pas applicable aux substances chimiques volatiles sans modification préalable des réacteurs tubulaires (paragraphe 16). Déterminer le COD et le carbone organique total (COT) de la solution mère et répéter les mesures à chaque nouveau lot. Si la différence entre le COD et le COT excède 20 pour cent, il faut vérifier l'hydrosolubilité de la substance d'essai. Comparer le COD ou la concentration de la substance d'essai mesurée par une analyse spécifique

▼M4

dans la solution mère à la valeur nominale, pour s'assurer que la récupération est suffisante (elle dépasse normalement 90 pour cent). Vérifier, en particulier pour les dispersions, si le COD peut être utilisé comme paramètre d'analyse ou si seule une technique d'analyse spécifique de la substance d'essai est praticable. Les dispersions imposent la centrifugation des échantillons. Pour chaque nouveau lot, mesurer le COD, la DCO, ou la substance d'essai par une analyse spécifique.

27. Déterminer le pH de la solution mère. Les valeurs extrêmes indiquent que l'addition de la substance est susceptible d'influencer le pH des boues activées dans le système d'essai. Dans ce cas, il faut neutraliser la solution mère à pH 7 ± 0,5 avec de faibles quantités d'un acide ou d'une base inorganiques, tout en évitant la précipitation de la substance d'essai.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation du milieu organique à doser

28. Nettoyer à fond les récipients destinés à recevoir les eaux à traiter et les effluents ainsi que les tuyaux reliant ces deux récipients, afin de prévenir toute prolifération de micro-organismes, au début de l'essai et tout au long de celui-ci.

29. Utiliser des eaux usées synthétiques (paragraphe 23) préparées le jour même, en diluant dans les proportions requises les solides ou la solution mère concentrée avec de l'eau du robinet. La quantité nécessaire est mesurée dans un cylindre et versée dans un récipient propre destiné à recevoir les eaux à traiter. S'il y a lieu, ajouter la quantité voulue de solution mère de la substance d'essai ou de substance de référence aux eaux usées synthétiques avant la dilution. Si cela est plus approprié, ou nécessaire afin d'éviter des pertes de substance d'essai, préparer à part une solution diluée de la substance d'essai dans un autre récipient et répartir cette dernière dans les tubes inclinés au moyen d'une autre pompe doseuse.

30. En alternance (et de préférence), utiliser des eaux usées domestiques décantées (paragraphe 24) récoltées le jour même si possible.

Fonctionnement des réacteurs tubulaires rotatifs

31. L'évaluation de la substance d'essai demande deux réacteurs tubulaires identiques assemblés dans un local à température constante, normalement à 22 ± 2 °C.

32. Ajuster les pompes péristaltiques de façon à répartir 250 ± 25 ml/h de milieu organique (sans substance d'essai) dans les tubes inclinés, qui tournent à 18 ± 2 tr/min. Lubrifier (paragraphe 25) les tuyaux de la pompe au début de l'essai et régulièrement au cours de celui-ci afin de lui assurer un bon fonctionnement et de prolonger la vie des tuyaux.

33. Régler l'angle d'inclinaison des tubes par rapport à l'horizontale de façon à produire un temps de séjour de l'eau d'alimentation de 125 ± 12,5 secondes dans un tube propre. Estimer le temps de rétention en ajoutant un marqueur non biologique (par exemple: NaCl, un colorant inerte) à l'eau d'alimentation: le temps requis pour atteindre la concentration maximale dans l'effluent est censé être le temps de rétention moyen (quand le développement du film est à son maximum, le temps de rétention peut s'accroître jusqu'à environ 30 minutes).

34. On a constaté que ces débits, vitesses et temps donnaient des pourcentages d'élimination adéquats (supérieurs à 80 pour cent) de COD (ou DCO) et engendraient des effluents nitrifiés. Le débit doit être modifié si l'élimination est insuffisante ou s'il y a lieu de simuler le fonctionnement d'une station d'épuration donnée. Dans ce cas, ajuster le débit de dose du milieu organique jusqu'à ce que le fonctionnement du réacteur s'aligne sur celui de la station d'épuration.

▼M4

Inoculation

35. L'inoculation par exposition à l'air peut suffire à déclencher la croissance des micro-organismes lorsqu'on utilise des eaux usées synthétiques, sinon on ajoutera 1 ml/l d'eaux usées décantées à l'alimentation pendant trois jours.

Mesures

36. Vérifier à intervalles réguliers que les débits de dose et les vitesses de rotation restent dans les limites requises. Mesurer aussi le pH de l'effluent, en particulier s'il devrait y avoir une nitrification.

Échantillonnage et analyse

37. La méthode, la répartition et la fréquence de l'échantillonnage sont choisies en fonction de la finalité de l'essai. Prélever au hasard des échantillons d'eaux à traiter et d'effluents, par exemple, ou récolter des échantillons sur une période plus longue, comprise entre trois et six heures, par exemple. Durant la première période, à savoir en l'absence de substance d'essai, prélever des échantillons deux fois par semaine. Les échantillons sont filtrés à travers des membranes ou centrifugés à quelque 40 000 m/s^2 pendant environ 15 minutes (paragraphe 18). Il peut être nécessaire de décanter et/ou de filtrer grossièrement les échantillons avant leur filtration à travers la membrane. Déterminer le COD (ou la DCO) au moins deux fois et, selon les besoins, la DBO, l'ammonium, les nitrites et les nitrates.

38. Toutes les analyses doivent être exécutées le plus vite possible après la collecte et la préparation des échantillons. Au cas où les analyses doivent être différées, conserver les échantillons à environ 4 °C à l'obscurité dans des bouteilles pleines et bouchées hermétiquement. S'il y a lieu de stocker les échantillons pendant plus de 48 heures, les conserver par congélation, acidification ou adjonction d'une substance toxique appropriée [par exemple 20 ml/l d'une solution de chlorure de mercure (II) à 10 g/l]. S'assurer que la technique de conservation n'influence pas les résultats de l'analyse.

Période de mise en route

39. Durant cette période, le biofilm superficiel se développe jusqu'à atteindre une épaisseur optimale, ce qui prend normalement environ deux semaines et ne doit pas en dépasser six. L'élimination (paragraphe 44) du COD (ou de la DCO) s'accroît et atteint un plateau. Lorsque le plateau présente la même valeur dans les deux tubes, sélectionner le tube qui servira de témoin pour le restant de l'essai, au cours duquel leur fonctionnement devra conserver les mêmes caractéristiques..

Introduction de la substance d'essai

40. À ce stade, ajouter la substance d'essai dans l'autre réacteur à la concentration requise, ordinairement 10 à 20 mg C/l. Le témoin continue de ne recevoir que le milieu organique.

Période d'acclimatation

41. Poursuivre les analyses bihebdomadaires du COD (ou de la DCO) et, s'il faut évaluer la biodégradabilité primaire, mesurer aussi la concentration de la substance d'essai par une analyse spécifique. Appliquer une période d'acclimatation d'une à six semaines (ou davantage dans des conditions spéciales) après la première adjonction de la substance d'essai. Lorsque le pourcentage d'élimination (paragraphes 43-45) atteint son maximum, déterminer 12 à 15 valeurs valables au cours de la phase plateau sur environ trois semaines, afin d'évaluer le pourcentage d'élimination moyen. L'essai est considéré comme terminé si un degré d'élimination suffisamment élevé a été obtenu. L'essai ne doit normalement pas se prolonger au-delà de 12 semaines après la première introduction de la substance d'essai.

▼M4

Détachement du film

42. Le brusque détachement de grandes quantités de film excédentaire des tubes («sloughing») se produit assez régulièrement. On veillera à ce que ce processus n'altère pas la comparabilité des résultats, en laissant les essais couvrir au moins deux cycles complets de croissance et de détachement.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

43. Calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai en termes de COD (ou de DCO) pour chaque évaluation programmée dans le temps à l'aide de la formule suivante:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

où:

D_t = pourcentage d'élimination du COD (ou de la DCO) à l'instant t;

C_s = concentration de COD (ou DCO) dans les eaux à traiter due à la substance d'essai, estimée de préférence d'après la concentration dans la solution mère et le volume de cette solution ajouté (mg/l);

E = COD (ou DCO) mesurés dans les effluents d'essai à l'instant t (mg/l);

E_o = COD (ou DCO) mesurés dans les effluents témoins à l'instant t (mg/l).

Répéter le calcul pour la substance de référence, le cas échéant.

Résultats du réacteur témoin

44. Le degré d'élimination du COD ou de la DCO (D_B) du milieu organique dans les réacteurs témoins est utile pour éaluer l'activité de biodégradation du biofilm durant l'essai. Calculer le pourcentage d'élimination selon l'équation suivante:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

où:

C_m = COD (ou DCO) du milieu organique dans les eaux à traiter témoins (mg/l).

45. Calculer l'élimination (D_{ST}) de la substance d'essai, si elle a été mesurée par une méthode d'analyse spécifique, à chaque instant d'évaluation à partir de l'équation suivante:

$$D_{ST} = 100\ (1 - Se/Si)\ \%$$

où:

Si = concentration mesurée ou, de préférence, estimée de la substance d'essai dans les eaux brutes d'essai (mg/l)

Se = concentration mesurée de la substance d'essai dans les effluents d'essai à l'instant t (mg/l)

▼M4

Si la méthode d'analyse donne une valeur positive dans les eaux usées non améliorées équivalente à S_c mg/l, calculer le pourcentage d'élimination (D_{SC}) selon la formule suivante:

$$D_{SC} = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\ \%$$

Expression des résultats de l'essai

46. Porter sur un graphique les pourcentages d'élimination D_t et D_{ST} (ou D_{SC}), s'ils sont disponibles, en fonction du temps (voir appendice 2 du chapitre C.10-A). Prendre la moyenne (arrondie au nombre entier le plus proche) et l'écart-type des 12 à 15 valeurs de D_T (et de D_{ST}, le cas échéant) obtenue au cours de la phase plateau comme pourcentage d'élimination de la substance d'essai. L'allure de la courbe d'élimination permet de tirer certaines conclusions sur les processus d'élimination.

Adsorption

47. Si on observe une élimination substantielle de la substance d'essai en termes de COD au début de l'essai, c'est probablement à cause de l'adsorption de cette substance sur le biofilm. Il devrait être possible de prouver ce phénomène en mesurant la substance d'essai adsorbée sur les solides qui se détachent du film. Il est rare que l'élimination du COD de substances adsorbables demeure élevée tout au long de l'essai; le degré d'élimination est normalement élevé au début, puis décline progressivement jusqu'à une valeur d'équilibre. Si, toutefois, la substance d'essai adsorbée est de nature à acclimater la population de micro-organismes, l'élimination de la substance d'essai en termes de COD augmenterait pour atteindre une valeur de plateau élevée.

Phase de latence

48. Beaucoup de substances d'essai, comme cela se produit dans les essais de sélection statiques, traversent une phase de latence avant que la biodégradation n'opère à plein régime. Durant la phase de latence, les bactéries responsables de la dégradation s'acclimatent ou s'adaptent et n'éliminent presque pas la substance d'essai; ensuite elles commencent à croître. Après l'achèvement de cette phase, on considère de manière arbitraire que la phase de dégradation débute lorsque 10 pour cent environ de la quantité initiale de la substance d'essai est éliminée (après avoir laissé l'adsorption se produire, le cas échéant). La phase de latence est souvent très variable et peu reproductible.

Phase plateau

49. Le plateau de la courbe d'élimination d'un essai conduit en continu est défini comme la phase au cours de laquelle la dégradation est maximale. La phase plateau doit durer au moins trois semaines et être déterminée grosso modo par 12 à 15 valeurs mesurées valables.

Degré d'élimination moyen de la substance d'essai

50. Calculer la moyenne des valeurs d'élimination D_t (et D_{ST} le cas échéant) de la substance d'essai durant la phase plateau. Arrondie au nombre entier le plus proche (1 pour cent), elle représente le degré d'élimination de la substance d'essai. On recommande également de calculer l'intervalle de confiance à 95 pour cent de la valeur moyenne. Calculer de la même manière le degré moyen (D_B) d'élimination du milieu organique dans le récipient témoin.

▼M4

Indication de la biodégradation

51. Si la substance d'essai n'est pas adsorbée de façon significative sur le biofilm et que la courbe d'élimination présente le profil typique d'une courbe de biodégradation avec phase de latence, dégradation et plateau (paragraphes 48, 49), l'élimination mesurée est avec certitude attribuable à la biodégradation. Si l'élimination est élevée au début, l'essai de simulation ne permet pas de faire la distinction entre les processus d'élimination biologiques et non biologiques. Dans ces cas-là, comme dans d'autres où la biodégradation suscite des doutes (par exemple si on observe une séparation), analyser les substances d'essai adsorbées sur des échantillons du film ou effectuer des essais de biodégradation statiques (de sélection) supplémentaires fondés sur des paramètres qui attestent clairement des processus biologiques. Il s'agit d'essais reposant sur la consommation d'oxygène (chapitre C.4 de la présente annexe, D, E et F) (9) ou sur la mesure de la production de dioxyde de carbone (chapitre C.4-C de la présente annexe ou méthode de l'espace de tête – ou de l'espace tête) (10); il convient d'utiliser comme inoculum un biofilm préexposé issu du bioréacteur approprié.

52. Si l'élimination du COD et de la substance proprement dite ont été mesurées, des différences significatives entre les pourcentages observés (le premier étant inférieur au second) indiquent que les effluents renferment des produits organiques intermédiaires susceptibles d'être plus difficiles à dégrader; ceux-ci doivent être examinés.

Validité des résultats de l'essai

53. Considérer l'essai comme valable si le degré d'élimination (D_B) du COD ou de la DCO dans les unités témoins est supérieur à 80 pour cent après deux semaines de fonctionnement et qu'aucun phénomène inhabituel n'a été observé.

54. Si une substance de référence facilement biodégradable a été mise à l'essai, le degré de biodégradation doit être supérieur à 90 pour cent et la différence entre des valeurs mesurées en parallèle ne doit pas excéder 5 pour cent. Faute de satisfaire à ces deux critères, réexaminer les méthodes expérimentales et/ou prélever des eaux usées domestiques à une autre source.

55. De même, les différences de valeurs de biodégradation entre deux unités identiques (le cas échéant) traitant une substance d'essai ne doivent pas s'écarter de plus de cinq pour cent. Si ce critère n'est pas rempli, mais que l'élimination est élevée, poursuivre l'analyse pendant trois semaines supplémentaires. Si l'élimination est faible, étudier les effets inhibiteurs de la substance d'essai, s'ils ne sont pas connus, et recommencer l'essai à une concentration plus basse de la substance d'essai, si c'est possible.

Rapport d'essai

56. Le rapport d'essai doit livrer les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nature chimique,

— état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques.

Conditions d'essai:

— toute modification du système d'essai, notamment si des substances volatiles ou insolubles ont été testées,

— type de milieu organique,

— proportion et nature des déchets industriels dans les eaux usées, si cette information est pertinente et connue,

— méthode d'inoculation,

▼M4

— solution mère de la substance d'essai – teneurs en COD (carbone organique dissous) et COT (carbone organique total); mode de préparation, dans le cas d'une suspension; concentration(s) d'essai utilisée(s), justification des concentrations de COD qui sortiraient de l'intervalle 10-20 mg/l; méthode d'addition; date de la première adjonction; toute variation de concentration,

— temps de rétention hydraulique moyen (sans croissance); vitesse de rotation du tube, angle d'inclinaison approximatif, si possible,

— détails du détachement du biofilm; moment et intensité,

— température d'essai et gamme de températures,

— techniques d'analyse employées.

Résultats de l'essai:

— toutes les valeurs mesurées: COD, DCO, analyses spécifiques, pH, température, composés azotés, le cas échéant,

— toutes les valeurs calculées de D_t (ou D_{tc}), D_B, D_s présentées sous forme de tableaux et de courbes d'élimination,

— informations sur les phases de latence et de plateau, durée de l'essai, degré d'élimination de la substance d'essai, de la substance de référence (si testée) et du milieu organique (dans l'unité témoin), données statistiques, conclusions sur la biodégradabilité et validité de l'essai,

— examen des résultats.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Gerike P., Fischer W., Holtmann W. (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753-758.

(2) Truesdale G.A., Jones K., Vandyke K.G. (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441-444.

(3) Baumann U., Kuhn G. and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(4) Gloyna E.F., Comstock R.F., Renn C.E. (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

(5) Kumke G.W., Renn C.E. (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92-94.

(6) Tomlinson T.G., Snaddon D.H.M. (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865-881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

(9) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité «facile», A-F.

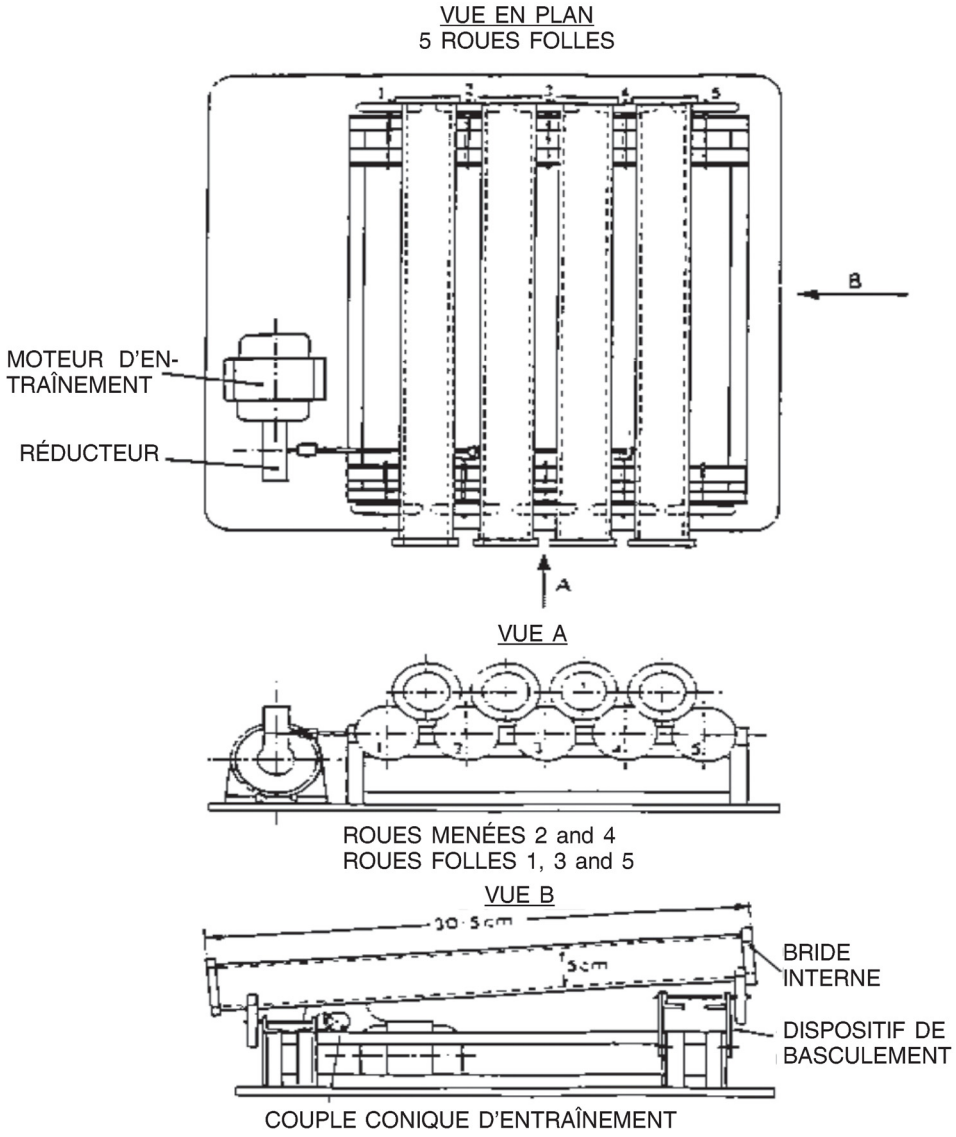
(10) ISO 14593 (1998). Qualité de l'eau – Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques. Méthode par analyse du carbone inorganique dans des récipients hermétiquement clos (Essai au CO_2 dans l'espace de tête).

▼**M4**

Appendice 8

Figure 1

Tubes rotatifs



Glossaire

vue en plan.

vue A/B.

roues menées.

roues folles.

moteur d'entraînement.

réducteur.

bride interne.

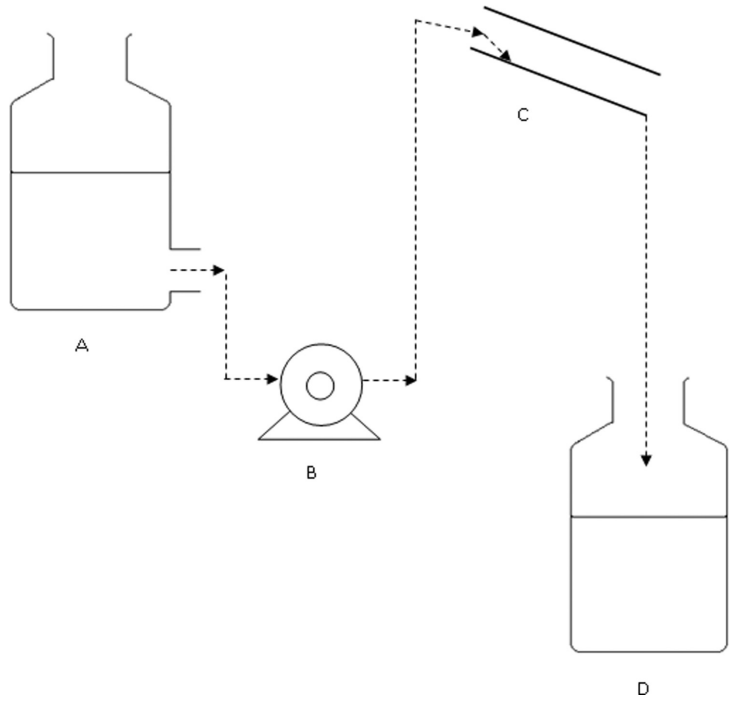
dispositif de basculement.

couple conique d'entraînement.

▼**M4**

Figure 2

Schéma de déroulement



A: réservoir.

B: pompe péristaltique.

C: tube rotatif.

D: récipient recueillant les effluents.

DÉFINITIONS:

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Substances chimiques: «il est à noter que le terme "produit chimique" utilisé dans les accords de la CNUED et dans les documents ultérieurs comprend les substances, les produits, les mélanges, les préparations et tout autre terme utilisé dans les systèmes actuels pour décrire les produits chimiques visés».

▼B

C. 11 **BIODÉGRADATION**

BOUES ACTIVÉES; ESSAI D'INHIBITION DE LA RESPIRATION

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

La méthode décrite évalue l'effet d'une substance d'essai sur les micro-organismes en mesurant le rythme de respiration dans des conditions déterminées, en présence de différentes concentrations de la substance.

L'objectif de cette méthode est de fournir un procédé de sélection rapide permettant d'identifier les substances d'essai qui peuvent nuire au fonctionnement des installations de traitement biologique aérobie et de faire une estimation des concentrations adéquates non inhibitrices des substances d'essai à utiliser dans les expériences de biodégradabilité.

Un essai de détermination de l'ordre de grandeur peut précéder l'essai plus complet. Il fournit des informations sur la gamme de concentrations à utiliser dans l'essai principal.

En plus des essais avec la substance étudiée, on effectue deux essais témoins, l'un au début et l'autre à la fin de série expérimentale. Chaque lot de boue activée doit également être vérifié à l'aide d'une substance de référence.

Cette méthode s'applique surtout aux substances qui, en raison de leur solubilité dans l'eau et de leur faible volatilité, sont susceptibles de demeurer dans l'eau.

Pour les substances dont la solubilité dans le milieu d'essai est limitée, il peut ne pas être possible de déterminer la CE_{50}.

Les résultats basés sur la consommation d'oxygène peuvent mener à des conclusions erronées lorsqu'une substance d'essai a tendance à interférer sur la phosphorylation oxydative.

Il est utile de disposer des informations suivantes pour faire l'essai:

— solubilité dans l'eau,

— tension de vapeur,

— formule de structure,

— pureté de la substance d'essai.

Recommandation:

Les boues activées peuvent contenir des organismes pathogènes et doivent être manipulées avec prudence.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Le taux de respiration est la consommation d'oxygène des micro-organismes aérobies contenus dans les boues ou dans les eaux usées, exprimée généralement en mg 0_2 par milligramme de boue, par heure.

▼B

Pour calculer l'effet inhibiteur d'une substance d'essai, à une concentration donnée, le taux de respiration est exprimé en pourcentage de la moyenne des taux de respiration des deux témoins:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{pourcentaged}'\text{inhibition}$$

ou:

R_s = taux de consommation de l'oxygène à une concentration donnée en substance étudiée,

Rc_1 = taux de consommation d'oxygène du Témoin C_1,

Rc_2 = taux de consommation d'oxygène du témoin C_2.

Dans cette méthode, la CE_{50} est la concentration de la substance d'essai pour laquelle le taux de respiration est égal à 50 % de celui des témoins dans les conditions décrites.

1.3. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Il est recommandé d'utiliser comme substance de référence le 3,5-dichlorophénol, qui est un inhibiteur connu de la respiration. Pour chaque lot de boue activée, on mesure la CE_{50} de cette substance, afin de déterminer si la sensibilité de la boue n'est pas anormale.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

On mesure le taux de respiration d'une boue activée alimentée en une quantité donnée d'effluent synthétique après un temps de contact de 30 minutes ou de 3 heures, ou à ces deux moments. On mesure également dans des conditions identiques le taux de respiration de la même boue activée en présence de la substance d'essai à différentes concentrations. L'effet inhibiteur de la substance d'essai à une concentration donnée s'exprime en pourcentage de la valeur moyenne des taux de respiration des deux témoins. À partir des déterminations faites à différentes concentrations, on calcule une valeur de la CE_{50}.

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

Les résultats sont valables si:

— les taux de respiration des deux témoins ne diffèrent pas l'un de l'autre de plus de 15 %,

— la CE_{50} (30 minutes et/ou 3 heures) du 3,5-dichlorophénol se situe dans l'intervalle 5 à 30 mg/l.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. *Réactifs*

1.6.1.1. Solutions de la substance d'essai

Des solutions de la substance d'essai sont préparées au début de l'essai à partir d'une solution de réserve. Une solution de réserve à 0,5 g/l convient quand le mode opératoire indiqué ci-dessous est suivi.

▼B

1.6.1.2. Solution de la substance de référence

On peut préparer par exemple une solution de 3,5-dichlorophénol en dissolvant 0,5 g de 3,5-dichlorophénol dans 10 ml de 1M NaOH, en diluant à 30 ml à l'eau distillée, en ajoutant, tout en agitant, du 0,5M H_2SO_4 jusqu'au point où la précipitation commence — environ 8 ml sont nécessaires — et, enfin, en diluant à 1 litre avec de l'eau distillée. Le pH devrait alors être compris dans l'intervalle 7 à 8.

1.6.1.3. Effluent synthétique

On prépare un effluent synthétique en dissolvant les quantités suivantes de substance dans 1 litre d'eau:

— 16 g de peptone,

— 11g d'extrait de viande,

— 3 g d'urée,

— 0,7 g de NaCl,

— 0,4g de $CaCl_2.2H_2O$,

— 0,2 g de $MgSO_4.7H_20$,

— 2,8 g de K_2HP0_4.

Note 1: Cet effluent synthétique est 100 fois plus concentré que celui décrit dans le rapport technique de l'OCDE «Méthode proposée pour la détermination de la biodégradabilité des agents tensio-actifs utilisés dans les détergents synthétiques» du 11 juin 1976, et contient en outre de l'hydrogénophosphate de potassium.

Note 2: Si le milieu ainsi préparé n'est pas immédiatement utilisé, il sera stocké à l'obscurité, entre 0 et 4 °C pendant une durée maximale d'une semaine, dans des conditions qui ne conduiront à aucun changement en ce qui concerne sa composition. Le milieu peut aussi être stérilisé avant son stockage, ou bien la peptone et l'extrait de viande peuvent être ajoutés immédiatement avant le début de l'essai. Avant son emploi, le milieu sera agité avec soin et son pH sera ajusté.

1.6.2. *Équipement*

Appareil de mesure: aucune prescription n'est fournie à ce sujet. Toutefois, il faut veiller à ce qu'il n'y ait pas de volume libre au-dessus du liquide et à ce que l'électrode s'adapte parfaitement au récipient.

Un équipement normal de laboratoire et notamment les articles suivants sont nécessaires:

— appareil de mesure,

— dispositif d'aération,

— électrode et appareil de mesure pour le pH,

— électrode à oxygène.

1.6.3. *Préparation de l'inoculum*

Comme inoculum pour l'essai, on utilise de la boue activée provenant d'une installation de traitement des eaux usées traitant un effluent à dominance domestique.

En cas de nécessité, à l'arrivée au laboratoire, les grosses particules pourront être éliminées par sédimentation pendant une courte période, par exemple pendant 15 minutes, puis par décantation des particules fines de la couche supérieure. Comme solution alternative, la boue peut être agitée quelques secondes au moyen d'un mixeur.

▼B

Si des produits inhibiteurs sont présents la boue peut être lavée avec de l'eau du robinet ou avec la solution isotonique. Après centrifugation, le surnageant est décanté (cette manipulation est répétée 3 fois).

Une petite quantité de boue est pesée et séchée. À partir de ce résultat, il est possible de déterminer la quantité de boue humide qui doit être mise en suspension dans l'eau dans le but d'obtenir une boue activée renfermant 2 à 4 g/l de matières en suspension. Cette concentration permet d'obtenir une teneur en matières en suspension comprise entre 0,8 et 1,6 g/l dans le milieu d'essai, si le protocole expérimental recommandé est appliqué.

Si la boue ne peut être utilisée le jour même de sa collecte, on ajoute 50 ml d'effluent synthétique à chaque litre de boue activée préparée de la façon décrite ci-dessus; elle est ensuite aérée toute la nuit à 20 °C ± 2 °C. Elle est alors conservée sous aération en vue de son emploi dans la journée. Avant de l'utiliser, on vérifie le pH et, si nécessaire, on l'ajuste de façon à atteindre un pH se situant entre 6,0 et 8,0. La teneur en matière en suspension du mélange peut être déterminée selon la méthode décrite dans le précédent paragraphe.

Si l'on doit utiliser le même lot de boue pendant plusieurs jours consécutifs (4 au maximum), on ajoute un autre volume de S0 ml d'effluent synthétique par litre de boue à la fin de chaque jour de travail.

1.6.4. *Exécution de l'essai*

Durée/temps de contact:	30 minutes et/ou 3 heures, pendant lesquelles le milieu d'essai est aéré
Eau:	Eau potable (déchlorurée, si nécessaire)
Apport d'air:	Air propre, exempt d'huile. Débit d'air de 0,5 à 1 litre par minute
Appareil de mesure:	Fiole a fond plat du type DBO
Mesure de l'oxygène:	Électrode à oxygène adéquate, avec enregistrement
Solution nutritive:	Effluent synthétique (voir ci-dessus)
Substance d'essai:	Préparée au début de l'essai
Substance de référence:	Par exemple 3,5-dichIorophénol (au moins 3 concentrations)
Témoins:	Échantillon inoculé, sans substance d'essai
Température:	20 °C ± 2 °C

On trouvera ci-après une méthode expérimentale pouvant être appliquée à la fois pour la substance d'essai et pour la substance de référence pendant une période de 3 heures:

On utilise plusieurs récipients (par exemple béchers d'un litre). On peut utiliser au moins 5 concentrations croissantes, selon une progression de raison n'excédant pas 3,2.

Au temps «O», on verse 16 ml d'effluent synthétique dans un verre cylindrique graduée de 500 ml et l'on complète à 300 ml avec de l'eau. On ajoute 200 ml d'inoculum bactérien et l'on verse l'ensemble du mélange dans le premier récipient (premier témoin C_1).

▼B

Les récipients d'essai doivent être aérés en continu de façon à être certain que les concentrations en oxygène dissout ne seront pas inférieures à 2,5 mg/l et qu'immédiatement avant détermination du taux de respiration, la concentration en oxygène dissout sera au moins égale à 6,5 mg/l.

Au temps «15 minutes» (15 minutes représentant un intervalle de temps arbitraire, mais commode), on répète l'opération précédente, sauf que l'on ajoute 100 ml de la solution de réserve de la substance d'essai aux 16 ml d'effluent synthétique avant de procéder à l'addition d'eau jusqu'à 300 ml et d'inoculum jusqu'à 500 ml. Ce mélange est ensuite versé dans le deuxième récipient, puis aéré comme ci-dessus. On recommence cette opération toutes les 15 minutes avec différents volumes de la solution de réserve de la substance d'essai, afin d'obtenir une série de récipients avec des concentrations différentes en substance d'essai. Enfin, on prépare un deuxième témoin (C_2).

Au bout de trois heures, on mesure et note le pH; un échantillon homogène du contenu du premier récipient est versé dans l'appareil de mesure et le taux de respiration est mesuré pendant une période allant jusqu'à 10 minutes.

Cette détermination est répétée sur le contenu de chaque récipient à des intervalles de 15 minutes, de manière à obtenir un temps de contact de 3 heures pour chaque récipient.

La substance de référence est testée de la même façon sur chaque lot d'inoculum bactérien.

Une organisation différente (par exemple plus d'un appareil de mesure d'oxygène) est nécessaire, si les mesures doivent être faites après un contact de 30 minutes.

S'il est nécessaire de mesurer la consommation chimique en oxygène, on ajoute des récipients supplémentaires contenant la substance d'essai, l'effluent synthétique, de l'eau, mais pas de boue activée.

La consommation d'oxygène est mesurée et enregistrée après un temps d'aération de 30 minutes et/ou de 3 heures (temps de contact).

2. **TRAITEMENT ET ÉVALUATION DES DONNÉES**

Le taux de respiration est calculé à partir du tracé de l'enregistreur en mg 0_2/l.h pour les concentrations comprises approximativement entre 6,5 mg de 0_2/l et 2,5 mg de 0_2/l, ou pendant une période de dix minutes quand le taux de respiration est faible. La partie de la courbe à partir de laquelle on mesure le taux de respiration doit être linéaire.

Si les taux de respiration des deux témoins diffèrent l'un de l'autre de plus de 15 % ou si la CE_{50} (30 minutes et/ou 3 heures) de la substance de référence n'est pas dans l'intervalle requis (5 à 30 mg/l pour le 3,5-dichlorophénol), l'essai n'est pas valable et doit être recommencé.

Le pourcentage d'inhibition est calculé pour chaque concentration d'essai (voir 1.2). On porte le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration sur du papier log-normal (ou log-probabilité) et on en déduit une valeur de la CE_{50}.

Des limites de confiance à 95 % pour les valeurs de la CE_{50} peuvent être déterminées par application de méthodes normalement utilisées.

▼B

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible les renseignements suivants:

— substance d'essai: données permettant son identification,

— système d'essai: origine, concentration et traitement préalable éventuel de la boue activée,

— conditions d'essai:

  — pH du mélange avant mesure de la consommation d'oxygène,

  — température d'essai,

  — durée de l'essai,

  — substance de référence et CE_{50} mesurée,

  — consommation chimique d'oxygène (s'il y a lieu),

— résultats:

  — toutes les données obtenues,

  — courbe d'inhibition et méthode de calcul de la CE_{50},

  — CE_{50} et, si possible, limites de confiance à 95 %, CE_{20} et CE_{50},,

  — toutes les observations et tous les écarts par rapport à la méthode d'essai qui auraient pu influencer les résultats.

3.2. INTERPRÉTATION DES DONNÉES

La valeur de la CE_{50} doit simplement être considérée comme une indication de la toxicité probable de la substance d'essai pour le traitement des eaux usées par des boues activées ou pour les micro-organismes des eaux usées. En effet, les interactions complexes qui se produisent dans l'environnement ne peuvent pas être simulées avec précision dans un essai de laboratoire. En outre, les substances testées qui pourraient avoir des effets inhibiteurs sur l'oxydation de l'ammoniaque peuvent fournir des courbes d'inhibition atypiques. En conséquence, de telles courbes doivent être interprétées avec précaution.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) International Standard ISO 8192-1986.

(2) Broecker, B., Zahn, R., Water Research 11,1977, p. 165.

(3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., Chemosphere 10, 1981, p. 245.

(4) ETAD (Ecological and Tox.icological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), Recommended Method nº 103, also described by:

(5) Robra, B., Wasserl Abwasser 117, 1976, p. 80.

(6) Schefer, W., Textilveredlung 6,1977, p. 247.

(7) OECD, Paris, 1981, Ligne directrice 209, décision du Conseil C(84) 30 final.

▼B

C. 12. **BIODÉGRADATION**

TEST S.C.A.S. MODIFIÉ

1. **MÉTHODE**

1.1. INTRODUCTION

Le but de la méthode est de mesurer la biodégradabilité totale potentielle de composés organiques non volatils et solubles dans l'eau, lorsqu'ils sont exposés à des concentrations relativement élevées de micro-organismes pendant une longue période. La viabilité des micro-organismes est maintenue tout au long de cette période par un apport journalier d'eaux résiduaires décantées. (Pendant le week-end, les eaux résiduaires peuvent être stockées à 4 ºC. Les eaux résiduaires synthétiques de l'essai de confirmation de l'OCDE peuvent également être utilisées.)

Une adsorption physico-chimique sur les particules solides en suspension peut se produire et doit être prise en considération lors de l'interprétation des résultats (voir 3.2).

Étant donné la longue période de rétention de la phase aqueuse (36 heures) et l'ajout régulier de substances nutritives, l'essai n'est pas une simulation des conditions rencontrées dans une station d'épuration des eaux usées. Les résultats obtenus avec diverses substances d'essai indiquent que cet essai a un potentiel élevé de biodégradation.

Les conditions dans lesquelles se déroule l'essai facilitent la sélection et/ou l'acclimatation de micro-organismes susceptibles de dégrader la solution d'essai (la procédure peut également être utilisée en vue de préparer un inoculum acclimaté pour d'autres essais).

Dans cette méthode, on mesure la concentration de carbone organique dissous (COD) pour évaluer la biodégradabilité finale des substances d'essai. Il est préférable de déterminer le COD après acidification et purge plutôt qu'en établissant la différence C_{total}—$C_{minéral}$.

Le recours simultané à une analyse spécifique permet de déterminer la biodégradabilité primaire de la substance (disparition de la structure chimique initiale).

La méthode n'est applicable qu'aux substances organiques qui, à la concentration d'essai:

— sont solubles dans l'eau (au moins 20 mg de COD par litre),

— ont une pression de vapeur négligeable,

— n'ont pas d'effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries,

— ne font pas l'objet d'une adsorption importante au cours de l'essai,

— ne sont pas éliminées par moussage de la solution d'essai.

La teneur en carbone organique de la substance d'essai doit être déterminée.

▼B

Il est utile de connaître les proportions relatives des principaux éléments constitutifs de la substance d'essai pour interpréter les résultats obtenus, notamment lorsque ceux-ci sont peu élevés ou marginaux.

Il est souhaitable de connaître le seuil de toxicité de la substance vis-à-vis des micro-organismes pour interpréter les résultats peu élevés et pour choisir les concentrations d'essai appropriées.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

C_T = concentration de la substance d'essai en carbone organique contenu dans ou ajouté à l'effluent décanté au début de la période d'aération (mg par litre)

C_t = concentration en COD du liquide surnageant de la substance d'essai à la fin de la période d'aération (mg par litre)

C_c = concentration en COD du liquide surnageant du témoin à la fin de la période d'aération (mg par litre)

Dans cette méthode, la biodégradation est déterminée par la disparition du carbone organique. La dégradation biotique peut être exprimée en:

1) pourcentage d'élimination de D_{da} de l'apport journalier de la substance:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad (1)$$

où:

D_{da} = dégradation/apport journalier;

2) pourcentage d'élimination des substances présentes en début de journée:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2(a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(b)]$$

où:

D_{ssd} = dégradation/substance en début de journée.

Les facteurs i et (i + 1) se réfèrent au jour où la mesure a été effectuée.

Il est recommandé d'utiliser l'équation 2(a) si l'effluent COD varie d'un jour à l'autre et l'équation 2(b) lorsque l'effluent COD reste relativement constant d'un jour à l'autre.

▼B

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Quand on étudie une nouvelle substance, les produits de référence peuvent parfois se révéler utiles; on ne peut cependant pas encore recommander de produits de référence particuliers.

Il est fait mention de données relatives à plusieurs composés qui ont fait l'objet d'essais d'intercomparaison (voir appendice 1), notamment pour pouvoir procéder à l'étalonnage périodique de la méthode et pour permettre de comparer des résultats obtenus par une autre méthode.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Placer des boues activées provenant d'une station d'épuration des eaux usées dans une unité de traitement de boue activée à alimentation semi-continue (SCAS). Ajouter la substance d'essai et des eaux domestiques décantées et aérer le mélange pendant 23 heures. Arrêter ensuite l'aération, mettre la boue à décanter et retirer le liquide surnageant.

Puis, mélanger les boues restées dans l'aérateur à une autre partie aliquote de substance d'essai et d'eaux résiduaires et répéter le cycle.

La biodégradabilité est mesurée en déterminant la teneur en carbone organique dissous du liquide surnageant. Cette valeur est comparée à celle du liquide provenant d'un témoin alimenté uniquement avec des eaux domestiques décantées.

Lorsqu'on effectue une analyse spécifique, la modification de la concentration de la molécule mère en fonction de la biodégradabilité peut être mesurée (biodégradation primaire).

1.5. CRITÈRES DE QUALITÉ

La reproductibilité de cette méthode basée sur l'élimination de COD n'a pas encore été établie (en ce qui concerne la biodégradation primaire, on obtient des données très précises pour les substances qui sont fortement dégradées).

La sensibilité de la méthode est en grande partie conditionnée par la variabilité du témoin et, dans une moindre mesure, par la précision de la détermination de COD et par la concentration de la substance d'essai dans le liquide au début de chaque cycle.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.6.1. *Préparations*

Réunir un nombre suffisant d'unités d'aération (l'unité d'essai SCAS de 1,5 litre peut également être utilisée) et de tuyaux d'aération (figure 1) pour chaque substance d'essai et de référence. L'air comprimé fourni aux unités d'essai, nettoyées au moyen d'un filtre de coton hydrophile, ne doit pas contenir de carbone organique et doit être saturé préalablement à l'eau pour réduire les pertes dues à l'évaporation.

Prélever un échantillon de liqueur mixte, contenant de 1 à 4 grammes de solides en suspension par litre dans une station d'épuration de boues activées traitant plus particulièrement les eaux ménagères. Prévoir environ 150 ml de liqueur mixte par aérateur.

▼B

Préparer la solution mère de la substance d'essai dans de l'eau distillée; la concentration normalement requise est de 400 mg/l de carbone organique, ce qui donne une concentration en carbone de la substance d'essai de 20 mg/l au début de chaque cycle d'aération s'il n'y a pas de biodégradation.

Des concentrations plus élevées peuvent être utilisées si la toxicité vis-à-vis des micro-organismes le permet.

On mesure la teneur en carbone organique de la solution mère.

1.6.2. *Mode opératoire*

L'essai doit être effectué à une température comprise entre 20 et 25 °C.

Utiliser une concentration élevée de micro-organismes aérobies (de 1 à 4 g/l de matières en suspension) et respecter une période de rétention effective de 36 heures. Largement oxyder les substances carbonées dans l'effluent d'alimentation, normalement pendant une période de 8 heures suivant le début de chaque cycle d'aération. Laisser ensuite respirer la boue en façon endogène pendant le reste de la période d'aération. Le seul substrat disponible est la substance d'essai, à moins qu'elle n'ait été également métabolisée. Ces conditions, combinées à une réinoculation journalière de l'essai lorsque des eaux domestiques sont utilisées comme milieu, sont extrêmement favorables à l'acclimatation et à une biodégradation rapide.

1.6.3. *Réalisation de l'essai*

Prélever un échantillon de liqueur mixte dans une station d'épuration de boues activées traitant plus particulièrement les eaux domestiques ou dans une unité de laboratoire et le maintenir en aérobiose jusqu'à son utilisation en laboratoire. Chaque aérateur ainsi que l'unité de référence sont remplis avec 150 ml (en cas d'utilisation de l'unité d'essai SCAS originelle, il faut multiplier les volumes donnés par 10) de liqueur mixte et l'aération commence. Après 23 heures, l'aération est arrêtée et on laisse reposer les boues pendant 45 minutes. Ouvrir un à un les robinets de chaque récipient et retirer 100 ml du liquide surnageant. Prélever un échantillon des eaux domestiques décantées immédiatement avant l'utilisation et ajouter 100 ml aux boues demeurant dans chaque aérateur. L'aération est répétée. À ce stade, ne plus ajouter aucune substance d'essai et alimenter journellement les unités avec des eaux ménagères jusqu'à l'obtention d'un liquide surnageant limpide lors de la précipitation. Cette opération prend normalement deux semaines. À ce moment, le COD dans le liquide surnageant à la fin de chaque cycle d'aération tend vers une valeur constante.

À la fin de cette période, mélanger les boues décantées individuellement et ajouter 50 ml de boues composites à chaque unité.

Ajouter 95 ml d'eaux résiduaires décantées et 5 ml d'eau aux unités de référence et 95 m) d'eaux résiduaires décantées et 5 ml de solution mère de la substance d'essai appropriée (400 mg par litre) aux unités d'essai. Procéder à une nouvelle aération pendant 23 heures. Laisser les boues décanter pendant 45 minutes, retirer le liquide surnageant et l'analyser pour déterminer sa teneur en COD.

Cette procédure de prélèvement et de remplissage décrite ci dessus est répétée tous les jours pendant la période de l'essai.

▼B

Avant la décantation, il peut s'avérer nécessaire de nettoyer les parois des unités afin d'empêcher l'accumulation de solides au-dessus du niveau du liquide. Pour nettoyer chaque unité, un hérisson ou une brosse séparée sont utilisés afin d'empêcher la contamination croisée.

Théoriquement, il faudrait déterminer journellement le COD dans les liquides surnageants, mais des analyses moins fréquentes sont autorisées. Avant d'être analysées, les liqueurs doivent être filtrées sur une membrane de 0,45 μm ou centrifugées. Les membranes filtrantes conviennent s'il a été prouvé qu'elles ne libèrent pas de carbone et qu'elles n'absorbent pas la substance d'essai au cours de la filtration. La température de l'échantillon ne doit pas dépasser 40 °C lorsqu'il se trouve dans la centrifugeuse.

La durée de l'essai pour les composés peu ou non biodégradables est indéterminée, mais l'expérience démontre qu'il faut compter au moins 12 semaines et qu'il ne faut pas dépasser 26 semaines.

2. DONNÉES ET ÉVALUATION

La courbe de la teneur en COD des liquides surnageants des unités d'essai et des unités de référence est établie en fonction du temps.

Lorsque la biodégradation est terminée, le niveau constaté dans la substance d'essai est voisin de celui du témoin. Lorsque la différence entre ces deux niveaux ne varie plus sur trois mesures consécutives, il suffit alors d'obtenir un nombre de mesures complémentaires suffisantes pour permettre l'analyse statistique des données et de calculer le pourcentage de biodégradation de la substance d'essai (D_{da} ou D_{ssd}: voir 1.2).

3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

3.1. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible:

— toutes les informations relatives à la nature des eaux résiduaires, au type d'unité utilisé et aux résultats expérimentaux concernant la substance d'essai, a la substance de référence s'il y a lieu et au témoin,

— la température,

— la courbe de disparition avec description, mode de calcul (voir 1.2),

— la date et l'endroit du prélèvement des échantillons de boues activées et d'eaux résiduaires, le degré d'acclimatation, de concentration etc.,

— les raisons scientifiques de toute modification du mode opératoire,

— la signature et la date.

▼B

3.2. INTERPRETATION DES RESULTATS

Étant donné que, en l'occurrence, la substance d'essai n'est pas facilement biodégradable, toute disparition de COD due uniquement à la biodégradation devrait se faire graduellement sur une période de quelques jours ou de quelques semaines, sauf dans les cas où l'acclimatation est soudaine, ce qui se traduit par une brusque disparition après quelques semaines.

Toutefois, l'adsorption physico-chimique peut parfois jouer un rôle important; cela se manifeste par la disparition partielle ou complète du COD ajouté au départ. Ce qui se passe ultérieurement dépend de facteurs tels que les degrés d'adsorption et de concentration des solides en suspension dans l'effluent écarté. Généralement, la différence de concentration en COD dans les liquides surnageants d'essai et de référence augmente graduellement à partir d'une valeur initiale peu élevée et se maintient au niveau de la nouvelle valeur pour la durée restante de l'expérience, à moins qu'une acclimatation n'intervienne.

Pour distinguer la biodégradation (ou la biodégradation partielle) de l'adsorption, il faut procéder à d'autres essais. Il existe plusieurs méthodes mais la plus probante consiste à utiliser les liquides surnageants ou les boues comme inoculum dans un test du dossier de base (de préférence un test respirométrique).

Les substances d'essai faisant disparaître de grandes quantités de COD sans adsorption doivent être considérées comme potentiellement biodégradables. Une disparition partielle, qui n'est pas due à l'adsorption, indique que le produit est susceptible de se dégrader partiellement.

Des disparitions de COD peu importantes ou nulles peuvent être dues à l'inhibition de micro-organismes par des substances d'essai, ce qui peut également se traduire par lyses et perte de boues; dans ce cas, les liquides surnageants sont troubles. Le test doit alors être répété en utilisant une concentration moins élevée de substances d'essai.

L'utilisation d'une analyse spécifique ou d'une substance d'essai marquée au ^{14}C peut permettre une plus grande sensibilité. Dans le cas d'un composé d'essai marqué au ^{14}C, la récupération de $^{14}C0_2$ confirmera la biodégradation.

Lorsque les résultats sont également exprimés en termes de biodégradation primaire, il convient de donner, dans la mesure du possible, des explications sur les modifications intervenues dans les structures chimiques aboutissant au défaut de réponse de la substance d'essai mère.

La validation de l'analyse doit être indiquée avec! e résultat obtenu dans le milieu de l'essai témoin.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) OCDE, Paris, Lignes directrices 302 A, décision du Conseil C(81) 30 final.

▼B

Appendice 1

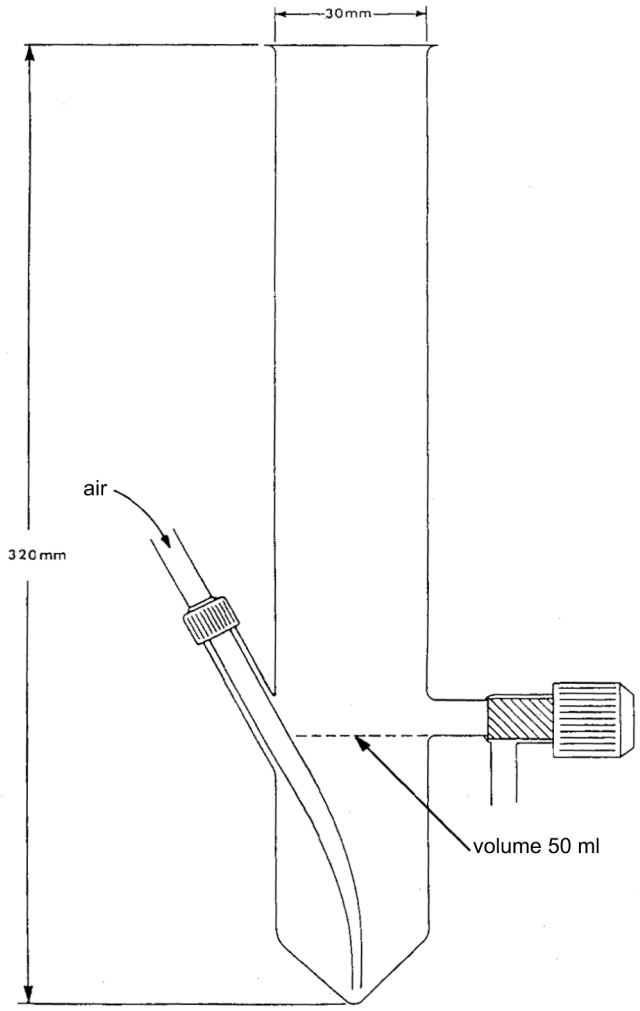
Test S.C.A.S.: exemple de résultats

Substance	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Pourcentage biodégradation D_{da}	Durée de l'essai (jours)
4-acétyl aminobenzène sulphonate	17,2	2,0	85	40
Tetra propylène benzène sulphonate	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrophénol	16,9	0,8	95,3	40
Diéthylène glycol	16,5	0,2	98,8	40
Aniline	16,9	1,7	95,9	40
Cyclopentane tétra carboxylate	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Appendice 2

Exemple d'appareil d'essai



▼B

C.13 BIOCONCENTRATION: ESSAI AVEC RENOUVELLEMENT CONTINU SUR LES POISSONS

1. MÉTHODE

La présente méthode de bioconcentration reproduit les directives OECD TG 305 (1996).

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode décrit une procédure de caractérisation du potentiel de bioconcentration dans le cas de poissons soumis à un renouvellement continu de certaines substances. Les régimes d'essais avec renouvellement continu seront très largement préférés, mais des régimes semi-statiques sont également acceptables dans la mesure où les critères de validité sont satisfaits.

La méthode donne toutes informations nécessaires à l'exécution de fessai mais laisse les libertés indispensables à l'adaptation du concept expérimental aux conditions spécifiques de chaque laboratoire et n'impose pas strictement les caractéristiques des substances à tester. Elle convient particulièrement bien aux produits organiques stables dont les valeurs log P_{ow} sont comprises entre 1,5 et 6,0 (1) mais reste applicable aux substances superlipophiles (log P_{ow}> 6,0). Pour ces dernières, l'estimation préalable du facteur de bioconcentration (BCF), parfois dénommé K_B, sera vraisemblablement supérieure à la valeur du facteur de bioconcentration à l'état stable (BCF_{SS}) auquel on peut s'attendre dans une expérience de laboratoire. Les évaluations préliminaires du facteur de bioconcentration des produits organiques dont les valeurs log P_{ow} vont jusqu'à 9,0 environ sont calculables à l'aide de l'équation de Bintein et al (2). Le potentiel de bioconcentration se caractérise par certains paramètres, dont la constante de vitesse d'absorption (k_1), la constante de vitesse d'élimination (k_2) et le BCF_{SS}.

Les substances d'essai radiomarquées peuvent faciliter l'analyse des échantillons d'eau et de poissons et peuvent aussi servir à définir s'il est souhaitable d'identifier et quantifier la dégradation. Si les résidus radioactifs totaux sont mesurés (par exemple par combustion ou solubilisation des tissus), le BCF est basé sur le composé d'origine, tous les métabolites retenus ainsi que le carbone assimilé. Les BCF basés sur les résidus radioactifs totaux ne peuvent donc pas être directement comparables à un BCF dérivé d'une analyse chimique particulière du composé d'origine seul.

On pourra mettre en œuvre des procédures d'assainissement dans les études radiomarquées pour déterminer le BCF sur ta base du composé d'origine et les principaux métabolites seront déterminés si on le juge nécessaire. Il est possible aussi de combiner une étude du métabolisme du poisson avec une étude de bioconcentration par analyse et identification des résidus tissulaires.

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Bioconcentration/Bioaccumulation: augmentation de la concentration de la substance à tester dans ou sur un organisme (des tissus spécifiques de celui-ci) par rapport à la concentration de cette substance dans le milieu ambiant.

Facteur de bioconcentration (BCF ou K_b): à tout moment pendant la phase d'absorption de l'essai d'accumulation, concentration de la substance à tester dans/sur le poisson, ou des tissus déterminés de celui-ci, [C_t en µg/g (ppm)] divisée par la concentration de la substance chimique dans le milieu ambiant [C_w en µg/ml (ppm)].

▼B

Facteur de bioconcentration à l'état stable (BCF_{SS} ou K_b): il ne change pas notablement pendant un laps de temps prolongé, la concentration de la substance d'essai dans le milieu ambiant étant constante pendant cette même période.

Plateau ou état stable; sur la représentation graphique de la substance d'essai dans le poisson (C_t) en fonction du temps, il est atteint lorsque la courbe devient parallèle à l'axe du temps et que trois analyses successives du C_f réalisées sur des échantillons prélevés à des intervalles de deux jours au moins restent dans une plage de 20 % les unes des autres, et qu'il n'y a pas de différences significatives entre les trois périodes d'échantillonnage. Lorsqu'on analyse des échantillons mis en commun, il faut procéder à quatre analyses successives au moins. Si les substances d'essais ont des caractéristiques d'absorption lentes, on optera de préférence pour des intervalles hebdomadaires.

Facteurs de bioconcentration: calculés directement à partir des constantes cinétiques (k_l/k_2) on les appelle facteurs de concentration cinétique, BCF_k.

Coefficient de partage octanol-eau ($P_{ow)}$: rapport de la solubilité d'un produit chimique dans le n-octanol et dans l'eau, à l'équilibre (Méthode A.8), également désigné par K_{ow}. Le logarithme de P_{ow} indique le potentiel de bioconcentration d'un produit chimique par les organismes aquatiques.

Phase d'exposition ou d'absorption: temps pendant lequel les poissons sont exposés au produit chimique teste.

Constante de vitesse d'absorption (k_1): valeur numérique définissant la vitesse d'accroissement de la concentration dans la substance à tester dans/sur le poisson (ou des tissus spécifiques de celui-ci) lorsqu'il est exposé à ce produit chimique (k_1 est exprimé en jours $-^1$).

Phase de post-exposition ou d'élimination (perte), à la suite du transfert des poissons d'un milieu contenant la substance à tester à un milieu exempt de celle-ci, temps pendant lequel l'élimination (ou perte nette) de la substance par les poissons de l'essai (ou les tissus spécifiques) est étudiée.

Constante de vitesse d'élimination (perte) (k_2: valeur numérique définissant la vitesse de diminution de la concentration de la substance à tester dans les poissons de l'essai (ou les tissus spécifiques) à la suite de leur transfert d'un milieu contenant la substance à tester à un milieu qui en est exempt (k_2 exprimé en jours $-^1$).

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

L'essai se décompose en deux phases: la phase d'exposition (absorption) et de post-exposition (élimination). Pendant la phase d'absorption, des groupes distincts de poissons d'une espèce sont exposés à au moins deux concentrations de la substance d'essai. Puis ils sont transférés dans un milieu exempt de cette substance, pour la phase d'élimination. Cette dernière est toujours nécessaire sauf lorsque l'absorption de la substance pendant la phase d'absorption a été insignifiante (par exemple si le BCF est inférieur à 10). La concentration de la substance à tester dans/sur le poisson (ou des tissus spécifiques) est suivie pendant les deux phases de l'essai. Outre les deux concentrations de l'essai, un groupe témoin de poissons est maintenu dans des conditions identiques hormis la substance à tester, qui est absente. Ceci pour établir les éventuelles relations entre les effets néfastes observés dans le test de bioconcentration et ce groupe témoin assorti, et déduire les concentrations de fond de la substance à tester.

▼B

La phase d'absorption dure 28 jours sauf s'il est démontré que l'équilibre a été atteint plus tôt. On peut prévoir la durée de la phase d'absorption et le temps nécessaire à l'obtention de l'état stable grâce à l'équation donnée à l'annexe 3- La période de dépuration commence alors par le transfert des poissons dans un autre récipient propre contenant le même milieu, exempt cette fois de la substance à tester. Lorsque cela est possible, on calcule le facteur de bioconcentration de préférence à la fois en tant que rapport (BCF_{ss}) de concentration des poissons (C_f) et dans l'eau (C .) à l'état d'équilibre apparent et en tant que facteur de bioconcentration cinétique; et BCF_k en tant que rapport des constantes de vitesse d'absorption (k_1) et de dépuration (k_2), en supposant une cinétique de premier ordre. Si, à l'évidence, on n'entre pas dans une cinétique de premier ordre, des modèles plus complexes devront être mis en œuvre (annexe 5).

Si l'on ne parvient pas à un état stable dans les 28 jours, la phase d'absorption sera prolongée jusqu'à cet état stable, ou bien pendant 60 jours, l'alternative la plus courte prévalant; puis commence la phase d'élimination.

La constante de vitesse d'absorption, la constante de vitesse de dépuration (perte) (ou les constantes, lorsque des modèles plus complexes entrent en jeu), le facteur de bioconcentration et, si possible, les limites de confiance de chacun de ces paramètres, sont calculés à partir du modèle décrivant le plus fidèlement les mesures de concentrations de la substance à tester dans les poissons et l'eau.

Le BCF est exprimé en fonction du poids frais total du poisson. Cependant, pour certaines études, des tissus ou organes spécifiques (par exemple muscles, foie) peuvent être utilisés si les poissons sont suffisamment gros ou s'il est possible d'en séparer les parties comestibles (filets) et non comestibles (viscères). La relation claire liant le potentiel de bioconcentration et la lipophilie pour de nombreuses substances organiques, entraîne une relation correspondante entre la teneur en lipides des poissons de l'essai et des bioconcentrations observées de ces substances. Donc, pour réduire cette source de variabilité dans les résultats des essais concernant les substances à forte lipophilie (c'est-à-dire ayant un log P_{ow} > 3), la bioconcentration devrait être exprimée en fonction de la masse corporelle totale, mais aussi de la teneur lipidique.

La teneur lipidique sera établie si possible sur les mêmes matériels biologiques qui auront servi à déterminer la concentration de la substance à tester.

1.4. INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Avant d'entreprendre l'essai de bioconcentration, les informations suivantes devront être réunies au sujet de la substance à tester:

a) solubilité dans l'eau;

b) coefficient de partage octanol-eau P_{ow}, (noté également K_{ow}, déterminé par une méthode HPLC en A.8);

c) hydrolyse;

d) caractéristiques de la phototransformation dans l'eau sous rayonnement solaire ou solaire artificiel et dans les conditions de rayonnement de l'essai de bioconcentration (3),

▼B

e) tension superficielle (c'est-à-dire pour les substances dont le log P_{ow} ne peut être établi;

f) pression de vapeur;

g) biodégradabilité dite «facile» (le cas échéant).

Il faudra aussi connaître la toxicité relative à l'espèce de poissons utilisée dans l'essai, de préférence la LC_{50} à l'asymptote (c'est-à-dire indépendante du temps). Il est indispensable de disposer d'une méthode analytique correcte, d'une exactitude, d'une précision et d'une sensibilité connues pour la quantification de la substance à tester dans les solutions d'essai et dans le matériel biologique, ainsi que d'informations précises sur la préparation et le stockage des échantillons. Il faut aussi connaître la limite de détection analytique de la substance à tester tant dans l'eau que dans les tissus des poissons. Si une substance à tester marquée au ^{14}C est utilisée, le pourcentage de radioactivité associée aux impuretés devra être connu.

1.5. CONDITIONS DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

Pour qu'un essai soit valide, les conditions suivantes devront être vérifiées:

— la variation de température est inférieure à ± 2 ºC,

— la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas au-dessous de 60 º/o du niveau de saturation

— la concentration de la substance à tester dans les enceintes est maintenue à ± 20 % de la moyenne des valeurs mesurées pendant la phase d'absorption,

— la mortalité et autres effets/maladies indésirables tant parmi les poissons témoins que chez ceux traités sont inférieures à 10 % à la fin de l'essai; lorsque l'essai est prolongé sur plusieurs semaines ou mois, la mortalité ou les autres effets indésirables dans les deux ensembles de poissons devront être inférieurs à 5 % par mois et ne pas excéder 30 % au total.

1.6. COMPOSÉS DE RÉFÉRENCE

L'utilisation de composés de référence ayant un potentiel de bioconcentration connu pourra aider au contrôle de la procédure expérimentale, si nécessaire. On ne peut cependant encore recommander de substances spécifiques.

1.7. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.7.1. *Appareillage*

On prendra soin d'éviter les matériaux susceptibles de présenter un effet indésirable d'adsorption, de dissolution ou de lessivage sur les poissons, et ce pour toutes les pièces de l'équipement. Des réservoirs standards rectangulaires ou cylindriques, en matériaux chimiquement inertes et d'une capacité adaptée au régime de remplissage seront utilisés. On réduira au minimum l'usage de tuyaux en plastique souple. Les tubages en Téflon ®, acier inoxydable et/ou verre auront la préférence. L'expérience a montré que pour les substances présentant de forts coefficients d'adsorption, tels que les pyréthrines de synthèse, le verre silanisé peut être nécessaire. Il faudra, dans ces cas-là, se débarrasser des équipements après usage.

▼B

1.7.2. *Eau*

On utilise généralement pour les essais une eau naturelle provenant d'une source non polluée et de qualité uniforme. L'eau de dilution doit être d'une qualité permettant la survie de l'espèce de poissons choisie, pour la durée des périodes d'acclimatation et d'essai, sans qu'apparaissent aucun comportement ni aspect anormaux. Dans l'idéal, il faudrait démontrer que les espèces soumises à l'essai peuvent survivre, grandir et se reproduire dans l'eau de dilution (par exemple en élevage de laboratoire ou par une étude de toxicité sur un cycle biologique). L'eau sera caractérisée au minimum selon son pH, sa dureté, ses matières solides totales, son carbone organique total et, de préférence aussi, ses teneurs ammoniacales, en nitrates et son alcalinité et, pour les espèces marines, sa salinité. On connaît parfaitement les paramètres importants du bien-être optimal chez les poissons, mais l'annexe 1 indique les concentrations maximales recommandées d'un certain nombre de paramètres concernant les eaux d'essais, douces et marines.

Pendant toute la durée d'un essai, l'eau sera d'une qualité constante. Le pH se tiendra entre 6,0 et 8,5, mais pour un essai donné il restera à l'intérieur d'une plage de ± 0,5 unité de pH. Pour s'assurer que l'eau de dilution n'influencera pas indûment les résultats de l'étude (par exemple par complexation de la substance à tester) ou n'affectera pas négativement les performances du stock de poissons, on prélèvera régulièrement des échantillons pour analyses. Il conviendra par exemple de procéder tous les trois mois, lorsqu'une eau de dilution est connue pour être relativement constante en qualité, à la détermination des métaux lourds (par exemple Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), des anions et cations principaux (par exemple Ca, Mg, Na, K, CI, $S0_4$), des pesticides (par exemple organophosphorés totaux et organochlorés totaux), du carbone organique total et des solides en suspension. S'il est démontré que la qualité de l'eau est constante pendant une année au moins, ces analyses pourront être moins fréquentes et leurs intervalles espacés (par exemple tous les six mois).

La teneur en particules naturelles ainsi que le carbone organique total (TOC) de l'eau de dilution seront aussi faibles que possible pour éviter l'adsorption de la substance à tester sur les matières organiques, qui pourrait réduire sa biodisponibilité (4). La valeur maximale admissible est de 5 mg/l pour les particules de matière (matière sèche ne traversant pas un filtre de 0,45 μm) et 2 mg/l pour le carbone organique total (voir annexe 1). Si nécessaire, l'eau sera filtrée avant usage. La contribution des poissons de l'expérience (excréta) et des résidus alimentaires, et la teneur de l'eau en carbone organique total devra être aussi faible que possible. Tout au long de l'essai, la concentration en carbone organique dans le récipient concerné ne devra pas dépasser de plus de 10 mg/l (± 20 %) celle du carbone organique provenant de la substance à tester et, le cas échéant, de l'agent de dissolution.

1.7.3. *Solutions d'essai*

On prépare une solution stock de la substance à tester, à la concentration voulue. La solution stock sera de préférence préparée par simple mélange ou agitation de la substance à tester dans l'eau de dilution. L'utilisation de solvants ou de dispersants (agents de dissolution) n'est pas recommandée; on peut y recourir cependant dans certains cas pour produire une solution stock à la concentration nécessaire. Les solvants susceptibles d'être utilisés sont l'éthanol, le méthanol, l'éther monométhylique d'éthylène glycol, l'éther diméthylique d'éthylène glycol, le diméthylformamide et le triéthylène glycol. Les dispersants utilisables sont le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 % et le HCO-40. Des précautions seront prises en cas d'utilisation d'agents facilement biodégradables, ces derniers pouvant provoquer des problèmes de croissance bactérienne dans les tests avec renouvellement continu. La substance d'essai peut être radiomarquée et devra être du plus haut niveau de pureté (par ex. de préférence > 98 %).

▼B

Pour les essais avec renouvellement continu, un appareillage apportera et diluera en permanence la solution stock de la substance à tester (par exemple pompe doseuse, dilueur proportionnel, système saturateur) pour amener les concentrations d'essai jusqu'aux enceintes. Il sera préférable de prévoir au moins cinq volumes de remplacement par jour pour chaque enceinte d'essai. Le mode avec renouvellement continu sera préféré, mais en cas d'impossibilité (par exemple les organismes de l'essai subissent des effets néfastes) une technique semistatique pourra être mise en œuvre si les critères de validité restent satisfaits. Les régimes d'écoulement des solutions stocks et de l'eau de dilution seront contrôlés 48 heures avant l'essai puis au moins quotidiennement pendant celui-ci. Ce contrôle comportera la détermination du débit dans chaque enceinte d'essai et l'on s'assurera qu'il ne s'écarte pas de plus de 20 % pour chacune d'elles ou bien entre elles et les autres.

1.7.4. *Sélection des espèces*

Parmi les critères importants de sélection des espèces figurent la facilité de se les procurer, leur taille, et la possibilité d'un entretien aisé en laboratoire. On sélectionnera aussi les espèces de poissons en fonction de leur importance en matière de loisirs, commerce ou écologie; ils doivent également être de sensibilités comparables, avoir produit de bons résultats dans le passé, etc.

On trouvera à l'annexe 2 une liste d'espèces recommandées pour les essais. D'autres espèces peuvent être utilisées mais la procédure d'essai peut devoir être adaptée pour établir des conditions expérimentales convenables. Dans un tel cas, on exposera les motivations du choix des espèces et la méthode expérimentale retenue.

1.7.5. *Conservation des poissons*

Il faut acclimater la population de poissons pendant deux semaines au moins dans une eau à la température de l'essai et apporter une quantité de nourriture suffisante et du même type que celle qui sera utilisée pendant l'essai.

Après une période d'installation de 48 heures, on enregistre les taux de mortalité et les critères suivants sont appliques:

— mortalité supérieure à 10 % de la population en sept jours: rejeter le lot entier,

— mortalité entre 5 et 10 % de la population en sept jours: prolonger l'acclimatation pendant sept jours de plus,

— mortalité inférieure à 5 % de la population en sept jours: accepter le lot — si la mortalité dépasse 5 % pendant les sept jours suivants, rejeter le lot entier.

S'assurer que les poissons utilisés pour les essais ne présentent pas de maladies ni d'anomalies observables. Écarter tout poisson malade. Les poissons ne sont pas censés être traités contre une quelconque maladie pendant les deux semaines précédant l'essai, ni pendant celui-ci.

▼B

1.8. EXÉCUTION DE L'ESSAI

1.8.1. *Essai préliminaire*

Il peut être utile de procéder à une expérimentation préliminaire pour optimiser les conditions d'exécution de l'essai réel, en ce qui concerne par ex. la sélection de la/des concentration(s) de la substance à tester, la durée des phases d'absorption et d'élimination.

1.8.2. *Conditions d'exposition*

1.8.2.1. Durée de la phase d'absorption

On peut prévoir la durée de la phase d'absorption en s'appuyant sur une expérience concrète (par ex. à partir d'une étude antérieure ou d'un produit chimique ayant des propriétés d'accumulation) ou à partir de certaines relations empiriques fondées sur ce que l'on sait de la solubilité dans l'eau ou bien du coefficient de partage octanol/eau de la substance à tester (voir annexe 3).

La phase d'absorption durera 28 jours sauf s'il peut être démontré qu'un équilibre a été atteint plus tôt. Si l'on ne parvient pas à un état stable dans les 28 jours, la phase d'équilibre sera prolongée et l'on procédera à d'autres mesures, jusqu'à état stable ou pendant 60 jours, l'alternative la plus courte prévalant.

1.8.2.2. Durée de la phase d'élimination

La moitié de la durée de la phase d'absorption convient généralement pour que se produise une réduction convenable (par exemple 95 %) de la charge corporelle en substance d'essai (voir les explications de l'estimation à l'annexe 3). Si le temps nécessaire pour parvenir à une perte de 95 % est démesurément long, dépassant par exemple de deux fois la durée normale de la phase d'absorption (à savoir plus de 56 jours), on pourra en rester à une période plus courte (c'est-à-dire jusqu'à ce que la concentration de la substance à tester soit inférieure à 10 % de la concentration d'état stable). Cependant, pour les substances ayant des schémas d'absorption et d'élimination plus complexes que le modèle de poissons à compartiment unique, donnant une cinétique de premier ordre, on autorisera des phases de dépuration plus longues pour déterminer les constantes de vitesse d'élimination. Ce laps de temps peut néanmoins être régi par la période durant laquelle la concentration dans les poissons de la substance à tester demeure au-dessus de la limite de détection analytique.

1.8.2.3. Nombre de poissons de l'essai

Choisir les nombres de poissons par concentrations d'essai de telle sorte qu'au minimum quatre poissons par échantillon seront disponibles à chaque échantillonnage. Si l'on souhaite une statistique plus fine, le nombre de poissons par échantillon devra augmenter.

Si on utilise des poissons adultes, indiquer s'ils sont mâles ou femelles ou si les deux sexes servent à l'expérience. Dans ce dernier cas, avant de commencer l'exposition, il faudra vérifier que les différences de teneurs lipidiques ne sont pas significatives; il pourra être nécessaire de faire des lots distincts de mâles et de femelles.

▼B

Tous les essais se feront avec un choix de poissons de poids similaires, de sorte que les plus petits ne soient pas inférieurs aux deux tiers du poids des plus gros. Ils appartiendront tous à la même classe d'âge et proviendront de la même source. Le poids et l'âge d'un poisson ayant apparemment parfois des effets notables sur les valeurs BCF (1), ces informations seront enregistrées avec précision. Il est souhaitable qu'un sous-échantillon de la population de poissons soit pesé avant l'essai, pour en estimer le poids moyen.

1.8.2.4. Chargement

Les rapports eau/poissons seront élevés afin de minimiser la réduction du C_w due à l'ajout des poissons au début de l'essai, mais aussi pour éviter les diminutions de concentration en oxygène dissous. Il importe que le régime de chargement soit adapté à l'espèce utilisée pour l'essai. Un régime de chargement de 0,1-1,0 g de poisson (poids humide) par litre d'eau et par jour est recommandé en tout état de cause. On peut réaliser des chargements à hauts régimes s'il est démontré que la concentration voulue en substance à tester est maîtrisable dans des limites de ± 20 % et que la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas au-dessous de 60 % du niveau de saturation.

On tiendra compte de l'habitat normal de l'espèce dans le choix du régime de chargement. Les poissons benthiques par exemple peuvent demander un aquarium ayant davantage de surface de fond que les espèces pélagiques, pour un même volume d'eau.

1.8.2.5. Alimentation

Pendant les périodes d'alimentation et d'essai, les poissons sont nourris selon un régime approprié ayant des teneurs en lipides et protéines totales déterminées, en quantités suffisantes pour les maintenir en bonne santé et conserver leur poids corporel. Les poissons sont nourris quotidiennement pendant les périodes d'acclimatation et d'essai à raison d'environ 1 à 2 % de leur poids corporel chaque jour; on maintient ainsi pour la plupart des espèces une concentration lipidique d'un niveau relativement constant pendant l'essai. La quantité de nourriture devra être recalculée une fois par semaine par exemple, afin de maintenir un poids corporel et des teneurs lipidiques cohérents. Pour ce calcul, le poids des poissons de chaque enceinte d'essai sera estimé à partir du poids des poissons échantillonnés le plus récemment dans cette enceinte. Ne pas peser les poissons restant dans l'enceinte.

La nourriture non consommée et les excréments sont évacués par siphonage quotidien des enceintes d'essai peu après le nourrissage (30 minutes à une heure). Les enceintes seront tenues aussi propres que possible tout au long de l'essai de sorte que la concentration de matière organique reste au plus bas niveau envisageable, car la présence de carbone organique peut limiter la biodisponibilité de la substance à tester. (1)

Nombre d'aliments étant des dérivés de farines de poissons, ils seront analysés pour déterminer leur teneur en substance d'essai. Il est préférable aussi d'analyser les teneurs de ces nourritures en pesticides et métaux lourds.

▼B

1.8.2.6. Éclairage et température

La photopériode est généralement de 12 à 16 heures et la température (+ 2 °C) correspondra à l'espèce utilisée (voir annexe 2). Le type et les caractéristiques de l'éclairage seront nettement définis. Il faudra prendre garde aux phototransformations éventuelles de la substance à tester dans les conditions de rayonnement de l'étude. L'éclairage ne devra pas exposer les poissons à des photoproduits non naturels. Dans certains cas, il peut être essentiel d'utiliser un filtre pour bloquer les rayons UV inférieurs à 290 nm.

1.8.2.7. Concentrations de l'essai

Les poissons sont exposés a un renouvellement continu de deux concentrations aqueuses au moins de la substance à tester. Normalement, la concentration haute (ou la plus haute) de la substance à tester sera d'environ 1 % de sa LC_{50} aiguë à l'asymptote, et au moins 10 fois supérieure à sa limite de détection dans l'eau par la méthode d'analyse retenue.

La plus forte concentration de l'essai peut aussi être établie en divisant la LC_{50} à 96 heures par un ratio approprié aigu/chronique (les ratios adéquats de certains produits chimiques peuvent aller de 3 à 100). Si possible, choisir l'autre (les autres) concentration(s) de sorte que la différence avec celle qui lui est supérieure atteigne un facteur dix. En cas d'impossibilité due au critère de 1 % de la $LC_{\cdot 50}$ et de la limite analytique, un facteur inférieur à dix pourra être utilisé ou bien on songera à l'intervention d'une substance radiomarquée du ^{14}C. Aucune concentration mise en œuvre ne devrait dépasser la solubilité de la substance d'essai.

Lorsqu'un agent de dissolution est utilisé sa concentration ne doit pas dépasser 0,1 ml/1 et doit être identique dans tous les récipients de l'essai. Sa contribution, ajoutée à celle de la substance à tester, à la teneur globale en carbone organique dans l'eau de l'expérience doivent être connues. Tout sera néanmoins fait pour éviter le recours à ce type de matériels.

1.8.2.8. Témoins

Une eau de dilution témoin ou, si nécessaire, un témoin contenant l'agent de dissolution sera disponible en marge de la série des tests, dans la mesure où il a été établi que l'agent n'a aucun effet sur les poissons. Dans le cas contraire, on mettra en place les deux témoins.

1.8.3. *Fréquence des mesures de la qualité de l'eau*

Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le TOC, le pH et la température seront mesurés dans tous les récipients. La dureté totale, et la salinité éventuellement, seront mesurées dans les témoins et un récipient contenant la concentration haute (la plus haute). Au minimum, l'oxygène dissous et éventuellement la salinité seront mesurés trois fois — au début, vers le milieu et à la fin de la période d'absorption — et une fois par semaine pendant la période d'élimination. Le TOC sera mesuré au début de l'essai (24 et 48 heures avant le démarrage de la phase d'absorption), avant l'ajout des poissons et au moins une fois par semaine pendant les périodes d'absorption et d'élimination. La température sera mesurée quotidiennement, le pH au début et à la fin de chaque période et la dureté une fois pour chaque essai. La température sera de préférence surveillée en continu dans un récipient au moins.

▼B

1.8.4. *Échantillonnage et analyse des poissons et de l'eau*

1.8.4.1. Calendrier d'échantillonnage des poissons et de l'eau

De l'eau sera prélevée dans les enceintes d'essai pour établir la concentration de la substance a tester avant l'ajout des poissons et pendant les phases d'absorption et de dépuration. Au minimum, l'eau est prélevée en même temps que les poissons et avant leur alimentation. Pendant la phase d'absorption, les concentrations de substance à tester sont déterminées pour vérifier qu'elles satisfont aux critères de validité.

Les poissons sont échantillonnés en cinq occasions au moins pendant la phase d'absorption et en quatre occasions au moins pendant la phase de dépuration. Il est parfois difficile de calculer une valeur estimative raisonnablement précise du BCF sur la base de ce nombre d'échantillons, en particulier lorsque l'on sort du cadre d'une simple cinétique de dépuration de premier ordre. Dans ce cas, on pourra alors échantillonner à des rythmes plus rapides dans les deux périodes (voir annexe 4). Les échantillons supplémentaires sont stockés et analysés uniquement si les résultats de la première série d'analyses se révèlent insuffisants au calcul du BCF avec la précision voulue.

On trouvera à l'annexe 4 un exemple de calendrier d'échantillonnage acceptable. D'autres peuvent être facilement établis sur la base d'autres valeurs supposées du P_{OW} pour calculer le temps d'exposition correspondant à une absorption de 95 %.

On poursuit l'échantillonnage pendant la phase d'absorption jusqu'à établissement d'un état stable ou pendant 28 jours, l'alternative la plus courte prévalant. Si l'on ne parvient pas a un état stable en 28 jours, l'échantillonnage continue jusqu'à obtention d'un état stable ou pendant 60 jours, l'alternative la plus courte prévalant. Avant de commencer la phase d'élimination, les poissons sont transférés dans des réservoirs propres.

1.8.4.2. Échantillonnage et préparation des échantillons

On prélève les échantillons d'eau destinés aux analyses, par exemple en siphonnant à l'aide d'un tube inerte un point central de l'enceinte d'essai. Puisqu'il semble que l'on ne peut séparer ni par centrifugation ni par filtration la fraction non biodisponible de la substance à tester de celle qui est biodisponible (en particulier dans le cas des produits chimiques super-lipophiles, c'est-à-dire ceux ayant un log $P_{Ow} > 5$) (1) (5), on peut s'abstenir de soumettre les échantillons à ces traitements.

Par contre, il faudra veiller à ce que les réservoirs restent aussi propres que possible et à ce que la teneur en carbone organique total soit surveillée tout au long des phases d'absorption et d'élimination.

Un nombre convenable de poissons (normalement quatre au minimum) est prélevé dans chaque enceinte d'essai pour chaque échantillonnage. Les poissons prélevés sont rapidement rincés à l'eau, séchés avec un papier absorbant, et sacrifiés instantanément de la manière la plus humaine possible, puis pesés.

Il est préférable d'analyser les poissons et l'eau immédiatement après l'échantillonnage pour éviter toute dégradation ou autres pertes et pour calculer approximativement les régimes d'absorption et de dépuration pendant que l'essai se poursuit. L'analyse immédiate évite aussi de ne pas retarder le constat qu'un plateau a été atteint.

▼B

Faute d'une analyse immédiate, les échantillons sont conservés selon une méthode convenable. Avant le début de l'étude, on réunira toutes informations sur la méthode de stockage adéquate de cette substance à tester, par exemple congélation, maintien à 4 ºC, durée du stockage, extraction, etc.

1.8.4.3. Qualité de la méthode analytique

L'intégralité de la procédure étant régie principalement par l'exactitude, la précision et la sensibilité de la méthode analytique mise en œuvre pour la substance à tester, il faut contrôler expérimentalement que la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique, ainsi que la récupération de la substance à tester tant dans l'eau que dans les poissons donnent toute satisfaction dans le cadre particulier de cette méthode. Vérifier aussi que la substance à tester n'est pas détectable dans l'eau de dilution utilisée.

Si nécessaire, les valeurs de C_w et C_f dérivées des essais seront corrigées au vu des valeurs fournies par les témoins et la concentration naturelle de la substance d'essai. Les échantillons de poissons et d'eau sont manipulés en permanence de manière à minimiser les pollutions et les pertes (résultant par exemple de l'absorption par le matériel d'échantillonnage).

1.8.4.4. Analyse des poissons échantillonnés

Si l'on utilise pour l'essai des matériels radiomarqués, on peut analyser le marquage radioactif total (c.à.d. composés d'origine et métabolites) ou purifier les échantillons de sorte que le composé d'origine puisse être analysé séparément. En outre, les principaux métabolites peuvent être caractérisés soit à l'état stable soit à la fin de la phase d'absorption, l'alternative la plus courte prévalant. Si le BCF en termes de résidus radiomarqués totaux est > 1 000 %, il peut être conseillé (et, pour certaines catégories de produits chimiques tels que les pesticides, fortement recommandé), d'identifier et quantifier les produits de dégradation représentant ≥10 % des résidus totaux dans les tissus des poissons à l'état stable. Si ces produits représentant ≥ 10 % des résidus totaux radiomarqués dans les tissus de poissons sont identifies et quantifiés, il est alors recommandé de les identifier et les quantifier aussi dans l'eau de l'essai.

La concentration de la substance à tester devrait généralement être déterminée pour chaque poisson pesé. Si cela n'est pas possible, on pourra mettre en commun les échantillons à chaque échantillonnage, mais cette mise en commun restreint véritablement les procédures statistiques dont les données pourraient bénéficier. Si une procédure et une finesse statistiques spécifiques sont souhaitées, il conviendra alors de faire participer à l'essai un nombre adéquat de poissons pour satisfaire à la procédure de regroupement et à la précision statistique désirées (6) (7).

Le BCF sera exprimé à la fois en fonction du poids frais total et, pour les substances fortement lipophiles, en fonction de la teneur lipidique. La teneur lipidique des poissons est établie si possible lors de chaque échantillonnage. Des méthodes bien adaptées seront utilisées pour déterminer la teneur en lipides (réf. 8 et 2 de l'annexe 3). On recommande les techniques d'extraction par chloroforme/méthanol comme méthode standard (9). Toutes les méthodes ne donnant pas des valeurs identiques (10), il importe de bien préciser celle utilisée. L'analyse des lipides sera si possible faite sur les mêmes extraits que ceux consacrés à l'analyse de la substance à tester, puisque les lipides doivent souvent être enlevés de l'extrait avant qu'on puisse l'analyser par chromatographie. La teneur lipidique des poissons (en mg/kg de poids frais) à la fin de l'expérience ne devrait pas s'écarter de celle du début de ± 25 %. Le pourcentage de solides dans les tissus sera lui aussi indique pour permettre la conversion de la concentration lipidique de la base humide à la base sèche.

▼B

2. **DONNÉES**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

La courbe d'absorption de la substance à tester résultera du tracé de sa concentration, en fonction du temps, dans/sur les poissons (ou des tissus spécifiques) pendant la phase d'absorption, sur une échelle arithmétique. Si la courbe a atteint un plateau, c'est-à-dire adopte approximativement un tracé asymptotique à Taxe du temps, l'état stable BCF_{ss} sera calculé comme suit:

$$\frac{C_f \text{ étatstable (médian)}}{C_w \text{ état stable (médian)}}$$

Lorsqu'on ne parvient à aucun état stable, il reste possible de calculer un BCF_{ss} d'une précision suffisante pour l'évaluation des risques à partir d'un «état stable» à 80 % ($1{,}6/k_2$) ou 9,5 % ($3{,}0/k_2$) de l'équilibre.

En outre, le facteur de concentration (BCF_k) sera défini comme le rapport k_1/k_2, des deux constantes cinétiques de premier ordre. La constante de vitesse d'élimination (k_2) est généralement déterminée à partir de la courbe d'élimination (c.a.d. un tracé de la décroissance en fonction du temps de la concentration de la substance à tester dans le poisson). La constante de vitesse d'absorption (k_t) est alors calculée en fonction de k_2 et d'une valeur de C_1 dérivée de la courbe d'absorption (voir aussi annexe 5). La méthode de choix pour obtenir BCF_k et les constantes de vitesse k_1 et k_2, est de recourir à des méthodes informatiques non linéaires d'estimation des paramètres (11). On peut alternativement utiliser des méthodes graphiques pour calculer k_t et k_2. Si la courbe de dépuration est à l'évidence autre que de premier ordre, alors il conviendra d'utiliser des modèles plus complexes (voir références à l'annexe 3) et de demander conseil à un biostatisticien.

2.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats seront interprétés avec précaution lorsque les concentrations de solution d'essai mesurées se trouvent à des niveaux proches de la limite de détection de la méthode d'analyse.

La clarté de définition des courbes d'absorption et d'élimination témoigne de la bonne qualité des données de bioconcentration. La variation des constantes absorption/élimination entre les deux concentrations d'essai doit être inférieure à 20 %. Les différences notables observées dans les taux d'absorption/élimination entre les deux essais de concentration seront enregistrées et expliquées si possible. En général, la limite de confiance des BCF approche ± 20 % dans les études bien connues.

3. **RAPPORT**

Le procès-verbal d'essai doit comporter les informations suivantes:

3.1. SUBSTANCE D'ESSAI

— nature physique et, le cas échéant, propriétés physico-chimiques,

— données d'identification chimique (y compris la teneur en carbone organique, si besoin),

— en cas de marquage radioactif, position précise du/des atome(s) marqué(s) et pourcentage de radioactivité associée aux impuretés.

▼B

3.2. ESPÈCES UTILISÉES

— Dénomination scientifique, souche, source, tout traitement préalable éventuel, acclimatation, âge, gamme des tailles, etc.

3.3. CONDITIONS DE L'ESSAI

— procédure mise en œuvre (par exemple renouvellement continu ou semi-statique),

— type et caractéristiques de l'éclairage utilisé et photopériode(s),

— concept de l'essai (par exemple nombre et taille des enceintes d'essai, régime de remplacement des volumes d'eau, nombre de sous-échantillons et de poissons par sous-échantillon, nombre de concentrations testées, durée des phases d'absorption et de dépuration, fréquence des échantillonnages pour les poissons et l'eau),

— méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (l'agent de dissolution, sa concentration et sa contribution à la teneur en carbone organique de l'eau de l'essai seront indiqués, le cas échéant),

— les concentrations d'essai nominales, les moyennes des valeurs mesurées et leurs écarts-types dans les récipients d'essai et leur méthode d'obtention,

— source de l'eau de dilution, description de tout traitement préalable, résultats de toute démonstration de l'aptitude des poissons utilisés à vivre dans cette eau et caractéristiques de celle-ci: pH, dureté, température, concentration en oxygène dissous, niveaux de chlore résiduel (si mesuré) carbone organique total, solides en suspension, salinité du milieu d'essai (le cas échéant) et toutes autres mesures réalisées,

— qualité de l'eau dans les récipients d'essai, pH, dureté, TOC, température et concentration en oxygène dissous,

— renseignements précis sur l'alimentation (par exemple type de nourriture, source, composition — au moins teneurs en lipides et protéines si possible, quantité donnée et fréquence),

— renseignements sur le traitement des poissons et de l'eau échantillonnés, y compris détails de préparation, stockage, extraction, procédures (et précision) de l'analyse de la substance à tester et teneur en lipides (si mesurée).

3.4. RÉSULTATS

— résultats de toute étude préliminaire effectuée,

— mortalité des poissons témoins et des poissons dans chaque enceinte d'essai et tous comportements anormaux observés,

— teneur lipidique des poissons (si détermination à l'occasion de l'essai),

— courbes (dont toutes données mesurées) montrant l'absorption et l'élimination des produits chimiques de l'essai dans les poissons, le temps d'accès à l'état stable,

▼B

— C_f et C_w (avec écart-type et plage, le cas échéant) au moment de chaque échantillonnage (C_f exprimé en µg/g de poids frais (ppm) de tout l'animal ou de certains de ses tissus, par exemple lipides et C_w en µg/ml (ppm). Valeurs C_w de la série témoin (indiquer aussi la concentration de fond),

— facteur de bioconcentration à l'état stable (BCF_{ss}) et/ou facteur de concentration cinétique (BCF_k) et, le cas échéant, limites de confiance à 95 % des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination (perte) toutes exprimées par rapport au corps entier et de la teneur totale en lipide, si elle est mesurée, de l'animal (ou certains de ses tissus), limites de confiance et écart-type (si disponible), méthodes de calcul/analyse des données pour chaque concentration de substance d'essai utilisée,

— lorsqu'on utilise des substances radiomarquées, l'accumulation de tous les métabolites détectés pourra être signalée si cela est nécessaire,

— toute situation inhabituelle concernant l'essai, tout écart de ces procédures et toutes autres informations pertinentes.

Minimiser les résultats du type «non détecté à la limite de détection» par la mise en place d'une méthode d'essai préliminaire et l'élaboration d'un concept expérimental, car ces résultats sont inutilisables pour les calculs des constantes de vitesse.

4 BIBLIOGRAPHIE

(1) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, pp 117-156.

(2) Bintein S., Devillers, J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, 29-390.

(3) OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Séries on Testing and Assessment of Chemicals No 3.

(4) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASlTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavaila-bility of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(5) US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procédure to Détermine Bioaccumulation Factors. July 1994.

(6) US FDA (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.

(7) US EPA (1974). Section 5, A(l) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

(8) Compaan H. (1980) in The détermination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environ ment: dégradation, toxicity, bioaccumulation' Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands.

▼B

(9) Gardner et al, (1995) Limn. & Oceanogr. 30, 1099-1105.

(10) Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol. Chem. 10, pp 1431-1436.

(11) CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984-1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

(12) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

▼B

Annexe 1

Caractéristiques chimiques acceptables pour l'eau de dilution

	Substance	Limite de concentration
1	Particules de matière	5 mg/l
2	Carbone organique total	2 mg/l
3	Ammoniaque non ionisé	1 µg/l
4	Chlore résiduel	10 µg/l
5	Pesticides organophosphorés totaux	50 µg/l
6	Pesticides organochlorés totaux plus polychlorobiphényles	50 ng/l
7	Chlore organique total	25 ng/l
8	Aluminium	1 µg/l
9	Arsenic	1 µg/l
10	Chrome	1 µg/l
11	Cobalt	1 µg/l
12	Cuivre	1 µg/l
13	Fer	1 µg/l
14	Plomb	1 µg/l
15	Nickel	1 µg/l
16	Zinc.	1 µg/l
17	Cadmium	100 ng/l
18	Mercure	100 ng/l
19	Argent	100 ng/l

▼B

Annexe 2

Espèces de poissons recommandées pour les essais

	Espèces recommandées	Plages de températures recommandées pour les essais (°C)	Longueur totale recommandée des animaux utilisés (cm)
1	Danio rerio (1) (*Teleostei, Cyprinidae*) (Hamilton-Buchanan) Petit Danio	20-25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas (*Teleostei, Cyprinidae*) (Rafinesque) Tète de boule	20-25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio (*Teleostei, Cyprinidae*) (Linnaeus) Carpe	20-25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes (*Teleostei, Poeciliidae*) (Temminck and Schlegel)	20-25	4,0 ± 1,0
5	Poecilia reticulata (*Teleostei, Poeciliidae*) (Peters) Guppy	20-25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus (*Teleostei, Centrarchidae*) (Rafinesque) Crapet arlequin	20-25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss (*Teleostei, Salmonidae*) (Walbaum) Truite de Kamloops	13-17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus (*Teleostei, Gasterosteidae*) (Linnaeus) Epinoche épineuse	18-20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Séries B., Vol. 252, p. 231.

Diverses espèces d'estuaires et marines ont été utilisées dans certains pays par exemple:

Tambour croca	*Leiostomus xanthurus*
Pétote	*Cyprinodon variegatus*
Siouclet	*Menidia beryllina*
Perche-méné	*Cymatogaster aggregata*
Carlottin anglais	*Parophrys vetulus*
Chabot	*Leptocottus armatus*
Epinoche épineuse	*Gasterosteus aculeatus*
Bar	*Dicentracus labrax*
Ablette	*Alburnus alburnus*

Récolte

Les poissons d'eau douce énumérés dans le tableau ci-dessus sont faciles à élever et/ou largement disponibles tout au long de l'année, alors que la disponibilité des espèces marines ou d'estuaires est en partie limitée à certains pays. Ils peuvent se reproduire et vivre soit dans des fermes piscicoles soit en laboratoire, dans des conditions où les maladies et parasites sont sous contrôle; les animaux utilisés seront donc sains et de lignées connues. On les trouve à peu près partout dans le monde.

▼B

Annexe 3

Prévision de la durée des phases d'absorption et d'élimination

1. *Prévision de la durée de la phase d'absorption*

Avant d'exécuter l'essai, on pourra estimer k_2 et donc un pourcentage du temps nécessaire pour parvenir à l'état stable, à partir de relations empiriques entre k_2 et le coefficient de partage n-octanol/eau (P_{ow}) ou k_2 et la solubilité dans l'eau (s).

On estimera k_2 (jour^{-1}) à partir, par exemple, de la relation empirique suivante (1):

$$\log_{10} k_2 = - 0{,}414 \log_{10}(P_{ow}) + 1{,}47 \quad (r^2 = 0{,}95) \qquad \text{(equation 1)}$$

Pour les autres relations, voir réf. (2).

Si le coefficient de partage ($P_{ow)}$ est inconnu, on procédera à une estimation (3) à partir de la solubilité dans l'eau (s) de la substance d'après:

$$\log_{10} (P_{ow}) = 0{,}862 \log_{10}(s) + 0{,}710 \quad (r^2 = 0{,}994) \qquad \text{(equation 2)}$$

où

s = solubilité (moles/l): (n = 36).

Ces relations ne s'appliquent qu'aux produits chimiques dont les valeurs log P_{ow} se situent entre 2 et 6,5 (4).

Le temps nécessaire pour atteindre un certain pourcentage de l'état stable résultera de l'équation cinétique générale illustrant l'absorption et l'élimination (cinétique de premier ordre), par application du k_2 estimé:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

où, si C_w est constant:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{(equation 3)}$$

Lorsque l'on se rapproche de l'état stable ($t \rightarrow \infty$), l'équation 3 se réduit (5) (6) à:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} . C_w \text{ or } C_f / C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}.$$

Le rapport k_1/k_2 . C_w approche alors la concentration dans le poisson à «l'état stable» (C_{fs}).

L'équation 3 peut être ainsi transcrite:

$$C_f = C_{f,s}(1 - e^{-k_2 t}) \text{ ou } \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{(equation 4)}$$

Le temps nécessaire pour atteindre un certain pourcentage de l'état stable peut être prévu grâce à l'équation 4 lorsque k_2, est estimé au préalable à l'aide des équations 1 ou 2.

▼B

À titre indicatif, la durée optimale statistique de la phase d'absorption permettant d'obtenir des données statistiquement acceptables (BCF_k) est la période nécessaire pour que la courbe du logarithme de la concentration de la substance à tester dans le poisson, portée en temps linéaire, parvienne à son point médian, soit à $1,6/k_2$, ou à 80 % de l'état stable, mais ne dépasse pas 3,0/k, ou 95 % de l'état stable (7).

Le temps d'accession à 80 % de l'état stable est (équation 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ ou } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad \text{(equation 5)}$$

De même, pour 95 % de l'état stable:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \quad \text{(equation 6)}$$

Par exemple, la durée de la phase d'absorption (abs.) d'une substance à tester ayant un log P_{ow} = 4 serait (avec les équations 1, 5 et 6):

$\log_{10} k_2 = - 0,414.(4) + 1,47$ $\quad k_2 = 0,652$ jours^{-1}

abc. (80 %) = 1,6/0,652, c'est à dire. 2,45 jours (59 heures)

ou abc. (95 %) = 3,0/0,652, c'est à dire. 4,60 jours (110 heures)

De même, pour une substance à tester avec s = 10^{-5} mol/l (log(s) = - 5,0), la durée de l'absorption serait (avec les équations 1, 2, 5 et 6):

$\log_{10} (P_{ow}) = 0,862 (- 5,0) + 0,710 = 5,02$

$\log_{10} K_2 = 0,414 (5,02) + 1,47$

$k_2 = 0,246$ jours $^{-1}$

abc. (80 %) = 1,6/0,246, c'est à dire 6,5 jours (156 heures)

ou abc. (95 %) = 3,0/0,246, c'est à dire 12,2 jours (293 heures)

On utilisera aussi, à titre d'alternative, l'expression:

$t_{eq} = 6,54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55,31$ (heures)

pour calculer le temps d'accession effective à l'état stable (4).

2. *Prévision de la durée de la phase d'élimination*

On pourra également prévoir le temps nécessaire pour que la charge corporelle se réduise à un certain pourcentage de la concentration initiale grâce à l'équation générale illustrant l'absorption et l'élimination (cinétique de premier ordre) (1) (8).

Pour la phase d'élimination, C_w est supposé nul. L'équation peut être réduite à:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \text{ ou } C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

▼B

où C_{fo} est la concentration au début de la période d'élimination. On parviendra ensuite à une élimination de 50 % à l'instant (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \; ou \; t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

De même, 95 % d'élimination seront atteints à:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Si l'on se place à 80 % de l'absorption pour la première période ($1,6/k_2$) et 95 % de perte dans la phase d'élimination ($3,0/k_2$), alors la phase d'élimination est approximativement le double de la durée de la phase d'absorption.

Il importe cependant de noter que ces estimations sont fondées sur l'hypothèse que les schémas d'absorption et d'élimination suivent une cinétique de premier ordre. Si l'on n'est pas, à l'évidence, dans ce cadre, des modèles plus complexes devront être employés [par exemple réf (1)].

Bibliographie (de l'annexe 3)

(1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem. 1, pp 309-320.

(2) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

(3) Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. Environ. Sci. Technol. 16 (1), pp 4-10.

(4) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (é), pp 701-707.

(5) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), pp 785-792.

(6) Ernst W. (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 pp 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.

(7) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kenetic models, Can. J. Chem. Eng. 55, pp 614-622.

(8) Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, pp 3-19.

▼B

Annexe 4

Exemples théoriques de calendriers d'échantillonnage pour les tests de bioconcentration des substances ayant un log P_{ow} = 4

Prélèvements de poissons	Calendrier d'échantillonnage		Nombre d'échantillons d eau	Nombre de poissons par échantillon
	Fréquence minimale requise (jours)	Échantillonnage supplémentaire		
Phase d'absorption	– 1 0		2 (*) 2	ajouter 45-80 poissons
1er	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2e	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3e	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4e	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5e	4,7		2	6
Phase de dépuration				Transférer les poissons dans une eau exempte du produit à tester
6e	5,0	5,3		4 (4)
7e	5,9	7,0		4 (4)
8e	9,3	11,2		4 (4)
9e	14,0	17,5		6 (4)

(*) Prélever l'eau après apport de 3 «volumes d'enceintes» au moins.

Les valeurs entre parenthèses sont les nombres d'échantillons (eau, poissons) à prélever si l'on procède a un échantillonnage supplémentaire.

Note: L'estimation avant essai de k_2, pour un log P_{ow} de 4,0 est de 0,652 jour $^{-1}$. La durée totale de l'expérience est fixée à: 3 × abs. = 3 × 4,6 jours, soit 14 jours. Se reporter a l'annexe 3 pour l'estimation de l'«absorption».

▼B

Annexe 5

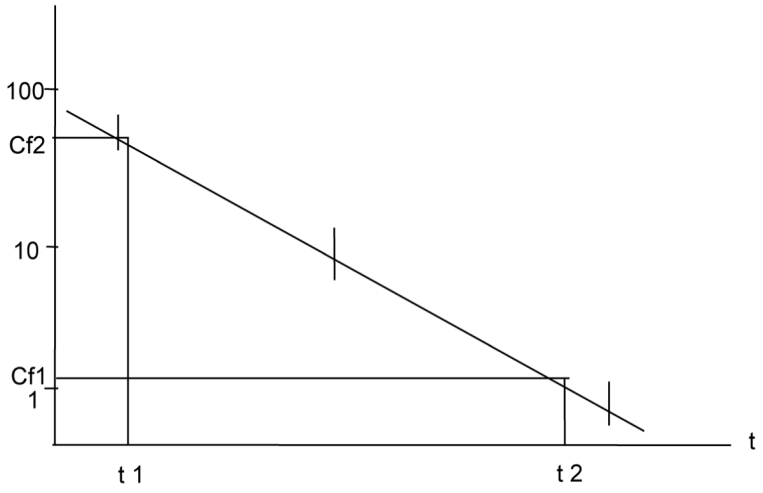
Discrimination des modèles

On suppose que la plupart des données de bioconcentration sont «raisonnablement» bien décrites par un modèle simple à deux compartiments/deux paramètres, selon la courbe rectiligne qui reprend approximativement les points de mesure des concentrations dans les poissons pendant la phase d'élimination, sur papier semilogarithmique. (Lorsque ces points ne peuvent se ramener à une droite, il convient de recourir à des modèles plus complexes, voir par exemple Spacie and Hamelink, réf. 1 à l'annexe 3.)

Méthode graphique de détermination de la constante de vitesse d'élimination (perte) k_2

Porter sur du papier semilogarithmique la concentration de la substance à tester trouvée dans chaque échantillon de poisson, selon le calendrier d'échantillonnage. La pente de cette droite est k_2

$$k_2 = \frac{\ln\,(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Attention: les écarts par rapport à cette ligne droite peuvent indiquer un schéma d'élimination plus complexe qu'une cinétique de premier ordre. Une méthode graphique peut résoudre des types d'élimination s'écartant de la cinétique de premier ordre.

Méthode graphique de détermination de la constante de vitesse d'absorption k_t

K_2 étant établi, on calcule k_1 comme suit:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{[equation 1]}$$

On lit la valeur de C_f au point médian de la courbe d'absorption lissée produite par les données lorsque la concentration logarithmique est portée en fonction du temps (sur une échelle arithmétique).

▼B

Méthode de calcul informatique des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination (perte)

Pour obtenir le facteur de bioconcentration et les constantes de vitesse k_1 et k_2 on utilisera de préférence des méthodes informatiques non linéaires d'estimation paramétriques. Ces programmes établissent les valeurs de k_1 et k_2 en fonction d'un ensemble de données séquentielles de concentration dans le temps et du modèle:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{[equation 2]}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t < t_c \qquad \text{[equation 3]}$$

où t_e = temps à la fin de la phase d'absorption.

Cette démarque débouche sur des estimations de l'écart-type pour k_1 et k_2

Puisqu'on peut dans la plupart des cas estimer k_2, à partir de la courbe d'élimination et ce avec une précision relativement grande, et puisqu'il existe une forte corrélation entre les deux paramètres k_1 et k_2, il peut être souhaitable de calculer d'abord k_2, à partir des données d'élimination uniquement, puis de calculer k_1, à partir des données d'absorption à l'aide d'une régression non linéaire.

▼B

C.14. **POISSON, ESSAI SUR LA CROISSANCE DES JUVÉNILES**

1. **MÉTHODE**

La méthode décrite pour cet essai de toxicité sur la croissance des juvéniles reprend la ligne directrice nº 215 de l'OCDE (2000).

1.1. INTRODUCTION

Cet essai vise à évaluer les effets d'une exposition prolongée à des produits chimiques sur la croissance des poissons au stade juvénile. Il s'appuie sur une méthode mise au point et soumise à des essais tournants (1) (3) dans l'Union européenne, qui a pour objet d'évaluer les effets de substances chimiques sur la croissance de la truite arc-en-ciel (*Oncorynchus mvkiss*) au stade juvénile dans des conditions dynamiques. D'autres espèces de poissons bien étudiées peuvent être utilisées. Par exemple, on possède une certaine expérience des essais de croissance sur le danio (*Danio rerio*) ([1]) (2) (4) (5) et sur le medaka (*Oryzias latipes*) (6) (7) (8).

Voir aussi introduction générale, partie C.

1.2. DÉFINITIONS

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): la plus faible concentration de la substance d'essai à laquelle on observe un effet significatif (à $p < 0,05$) par rapport au témoin. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO doivent exercer un effet nocif égal ou supérieur à celui observé à la CMEO.

Concentration sans effet observé (CSEO): la concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

CE_X: dans la méthode décrite pour cet essai, la concentration de la substance d'essai qui provoque une variation de x % du taux de croissance des poissons par rapport aux témoins.

Taux de charge: le poids frais des poissons par unité de volume d'eau.

Densité de peuplement: le nombre de poissons par unité de volume d'eau.

Taux de croissance spécifique de chaque poisson: le taux de croissance d'un individu par rapport à son poids initial.

Taux de croissance spécifique moyen par récipient: le taux de croissance moyen de la population d'un récipient (cuve) à une concentration donnée.

Taux de croissance pseudo-spécifique: le taux de croissance individuel comparé au poids initial moyen de la population du récipient.

([1]) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, p. 231-236.

▼B

1.3. PRINCIPE DE L'ESSAI

Des juvéniles en phase de croissance exponentielle sont pesés, puis placés dans des enceintes expérimentales où ils sont exposés à une gamme de concentrations sublétales de la substance d'essai dissoute dans l'eau, de préférence dans des conditions dynamiques ou, à défaut, dans des conditions semi-statiques (renouvellement discontinu) adéquates. L'essai dure 28 jours. Les poissons sont nourris quotidiennement. La ration alimentant est déterminée en fonction du poids initial des poissons et peut être recalculée après 14 jours. On pèse à nouveau les poissons à la fin de l'essai. Les effets sur le taux de croissance sont analysés à l'aide d'un modèle de-régression afin d'estimer la concentration qui provoquerait une variation de x % du taux de croissance, soit CE_X (CE_{10}, CE_{20} ou CE_{30} par exemple). Les données peuvent aussi être comparées aux valeurs des témoins pour déterminer la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et, de là, la concentration (maximale) sans effet observé (CSEO).

1.4. INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Il faudrait disposer des résultats d'un essai de toxicité aigué (voir méthode d'essai C.1) réalisé de préférence sur l'espèce choisie pour le présent essai. Cela implique que la solubilité dans l'eau et la pression de vapeur de la substance d'essai soient connues et que l'on dispose d'une méthode d'analyse fiable pour déterminer la quantité de substance dans les solutions d'essai avec une précision et une limite de détection connues et mentionnées dans le rapport.

Il est utile de connaître la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité dans l'eau et à la lumière, le pK_a, le P_{oe} et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir méthode d'essai C.4).

1.5. VALIDITÉ DE L'ESSAI

Pour qu'un essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies:

— la mortalité dans le(s) groupe(s) témoin(s) ne doit pas dépasser 10 % a la fin de l'essai,

— le poids moyen des poissons du (des) groupe(s) témoin(s) doit avoir augmenté suffisamment pour que la variation minimale du taux de croissance qui est jugée significative soit détectable. Un essai tournant (2) a montré que, dans le cas de la truite arc-en-ciel, le poids moyen des poissons dans les groupes témoins doit avoir au moins doublé (soit 50 %) par rapport à leur poids moyen initial sur 28 jours; par exemple, poids initial: 1 g/poisson (= 100 %), poids final après 28 jours: > 1,5 g/poisson (> 150 %),

— la concentration de l'oxygène dissous doit se situer à au moins 60 % de la valeur de saturation en air tout au long de l'essai,

— à aucun moment, durant l'essai, la température de l'eau ne doit varier de plus de ± 1 °C entre les enceintes expérimentales et devrait être maintenue dans un intervalle de 2 °C compris dans la plage spécifiée pour l'espèce testée (voir appendice 1).

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Appareillage**

On utilise du matériel courant de laboratoire et notamment:

a) un pH-mètre et un appareil à mesurer l'oxygène;

▼B

b) un instrument pour mesurer la dureté et l'alcalinité de l'eau;

c) un dispositif adéquat de régulation de la température avec, de préférence, une surveillance en continu;

d) des récipients (cuves) fabriqués en un matériau chimiquement inerte et d'une capacité adaptée à la charge et à la densité de peuplement recommandées (voir point 1.8.5 et appendice 1);

e) une balance suffisamment précise (précision de ± 0,5 %).

1.6.2. **Eau**

Toute eau dans laquelle l'espèce testée présente des taux de survie et de croissance à long terme adéquates peut être utilisée pour l'essai. Sa qualité doit demeurer constante pendant toute la durée de l'essai. Le pH de l'eau sera compris dans un intervalle de 6,5 à 8,5 unités, mais sans varier de plus de ± 0,5 unité (de pH) au cours d'un même essai. Une dureté supérieure à 140 mg/l ($CaC0_3$) est recommandée, Pour s'assurer que l'eau de dilution n'influencera pas indûment le résultat de l'essai (par exemple en complexant la substance d'essai), on prélèvera des échantillons à différents intervalles pour analyse. Il y a lieu de mesurer la teneur en métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple), en principaux anions et cations (Ca, Mg, Na, K, Cl, $S0_4$, par exemple), en pesticides (total des pesticides organophosphorés et organochlorés, par exemple), en carbone organique total et en solides en suspension. Ces mesures devraient être effectuées tous les trois mois, par exemple, pour une eau de dilution dont on sait que la qualité est relativement constante. Si la qualité de l'eau s'est avérée constante durant au moins un an, on pourra espacer les déterminations (par exemple tous les 6 mois). Certaines caractéristiques chimiques requises pour une eau de dilution acceptable sont énumérées a l'appendice 2.

1.6.3. **Solutions d'essai**

Par dilution d'une solution mère, on prépare des solutions d'essai aux concentrations choisies.

La solution mère devrait, de préférence, être préparée par simple mélange ou agitation de la substance d'essai dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (agitateur ou ultrasons, par exemple). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) peuvent être utilisées pour amener la solution mère à la concentration souhaitée.

L'emploi de solvants ou de dispersants (agents solubilisants) peut être indiqué dans certains cas pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Les solvants qui conviennent sont, par exemple, l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthylsulfoxyde, le dimethylformamide et le triethylèneglycol. Parmi les dispersants adéquats. citons le Cremophor RH40. le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 % et le HCO-40. Il convient d'être vigilant lorsqu'on utilise des agents facilement biodégradables (comme l'acétone) et/ou des composés très volatils car ils peuvent entraîner une prolifération bactérienne dans les essais dynamiques. Lorsqu'on utilise un agent solubilisant, il ne doit pas avoir d'effet significatif sur la croissance des poissons ni d'effets nocifs visibles sur les juvéniles, ce que révélera l'observation d'un témoin ne comprenant que le solvant.

▼B

Les essais dynamiques nécessitent un système qui délivre et dilue en continu une solution mère de la substance d'essai (par exemple, une pompe doseuse, un dilueur proportionnel, un système de saturation), pour distribuer une série de concentrations dans les enceintes d'essai. Les débits des solutions mères et de l'eau de dilution doivent être contrôlés à intervalles quotidiens de préférence, au cours de l'essai, et ne devraient pas varier de plus de 10 % tout au long de celui-ci. Un essai tournant (3) a montré que, pour la truite arc-en-ciel, une fréquence de renouvellement de l'eau au cours de l'essai de 6 litres/g de poisson/jour était acceptable (voir point 1.8.2.2).

S'agissant des essais semi-statiques (essais avec renouvellement), la fréquence de renouvellement du milieu dépendra de la stabilité de la substance d'essai, mais un renouvellement quotidien de l'eau est recommandé. Si des essais de stabilité préliminaires (voir point 1.4) révèlent que la concentration de la substance n'est pas stable (c'est-à-dire qu'elle sort d'un intervalle de 80 à 120 % de la concentration nominale ou qu'elle tombe en dessous de 80 % de la concentration mesurée initialement) au cours de la période de renouvellement, il faudra envisager de pratiquer un essai dynamique.

1.6.4. **Sélection de l'espèce**

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchas mykiss*) est recommandée dans cet essai car c'est à propos de cette espèce que l'on a acquis la plus grande expérience au cours d'essais tournants (1) (3). D'autres espèces bien étudiées peuvent cependant être utilisées, mais le mode opératoire devra éventuellement être adapté afin d'offrir les conditions adéquates. Par exemple, on dispose également d'une certaine expérience au sujet du danio (*Danio rerio*) (4) (5) et du medaka (*Oryzias latipes*) (6) (7) (8). Dans ce cas, le choix de l'espèce et de la méthode expérimentale doit être justifié.

1.6.5. **Soins des poissons**

Les poissons d'essai seront sélectionnes au sein d'une même population, issue de préférence du même frai, qui aura été gardée pendant au moins deux semaines avant l'essai dans des conditions de qualité de l'eau et d'illumination similaires à celles de l'essai. Ils devraient recevoir une ration alimentaire quotidienne atteignant au moins 2 % de leur poids corporel et de préférence 4 % pendant toute la durée des soins et de l'essai.

Après une période de mise en condition de 48 heures, on mesure la mortalité et on applique les critères suivants:

— mortalité supérieure à 10 % de la population en sept jours: le lot entier est rejeté,

— mortalité comprise entre 5 et 10 % de la population: période d'acclimatation prolongée de sept jours, si la mortalité dépasse 5 % pendant la deuxième période de sept jours, le lot entier est rejeté,

— mortalité inférieure à 5 % de la population en sept jours: le lot est accepté.

Les poissons ne devraient pas recevoir un traitement pour une maladie durant les deux semaines précédant l'essai ou pendant l'essai.

▼B

1.7. CONCEPTION DE L'ESSAI

Par «conception de l'essai», on entend le choix du nombre et de l'espacement des concentrations d'essai, le nombre de récipients par concentration et le nombre de poissons par récipient. Idéalement, l'essai devrait être conçu en fonction de:

a) l'objectif de l'étude:

b) la méthode d'analyse statistique qui sera utilisée;

c) la disponibilité et le coût des ressources expérimentales.

L'énoncé de l'objectif devrait, si possible, spécifier la puissance statistique que requiert une différence donnée (par exemple, dans le taux de croissance) pour être détectée, ou encore la précision avec laquelle la CE, doit être fournie (avec x = 10, 20 ou 30, par exemple et de préférence pas au-dessous de 10) pour être estimée. Faute de quoi il est impossible de donner une indication précise de l'échelle de l'étude.

Il importe de reconnaître qu'une conception qui est optimale (qui tire le meilleur parti des ressources) lorsqu'on utilise une certaine méthode d'analyse statistique ne l'est pas nécessairement avec une autre méthode. La conception recommandée pour l'estimation d'une CMEO/CSEO ne sera donc pas identique à celle recommandée pour une analyse par régression.

Dans la plupart des cas, l'analyse par régression est préférable à l'analyse de la variance, pour des raisons exposées par Stephan et Rogers (9) Cependant, si on ne trouve aucun modèle de régression adéquat ($r^2 < 0,9$), il faut recourir à la CSEO/CMEO.

1.7.1. **Conception pour l'analyse par régression**

Les considérations importantes pour la conception d'un essai à analyser par régression sont les suivantes:

a) La concentration avec effet (par exemple, $CE_{10,\ 20,\ 30}$) et la gamme de concentrations dans laquelle la substance d'essai produit un effet intéressant doivent nécessairement être couvertes par les concentrations incluses dans l'essai. La précision avec laquelle les concentrations produisant un effet peuvent être estimées sera la meilleure lorsque la concentration avec effet se trouve au milieu de la plage des concentrations testées. Un essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur peut s'avérer utile pour sélectionner les concentrations d'essai appropriées.

b) Pour satisfaire les conditions de la modélisation statistique, l'essai doit comporter au moins un récipient témoin et cinq autres à différentes concentrations. Le cas échéant, lorsqu'on utilise un agent solubilisant, il faudrait étudier un groupe témoin contenant l'agent solubilisant à la concentration d'essai la plus élevée en plus des groupes d'essai (voir paragraphes 1.8.3 et 1.8.4).

c) Une série géométrique ou logarithmique appropriée (10) (voir appendice 3) peut être utilisée. Un espacement logarithmique entre les concentrations d'essai est préférable.

▼B

d) Si on dispose de plus de six récipients, les récipients supplémentaires devraient servir de répliques ou être répartis dans la gamme des concentrations de manière à diminuer l'espacement entre les concentrations. Ces deux mesures sont aussi valables l'une que l'autre.

1.7.2. **Conception pour l'estimation de la CSEO/CMEO à l'aide de l'analyse de la variance**

Il serait préférable d'avoir plusieurs récipients répliques pour chaque concentration, et d'effectuer l'analyse statistique au niveau du récipient (11). Sans récipients répliques, il est impossible de prendre en compte la variabilité entre les récipients en plus de celle qui existe d'un poisson à l'autre. L'expérience a cependant montré (12) que la variabilité entre les récipients était très inférieure à celle qui existe au sein de chaque récipient (autrement dit, entre les poissons) dans le cas examiné. C'est pourquoi une alternative relativement acceptable consiste à effectuer l'analyse statistique au niveau de chaque poisson.

On doit normalement utiliser au moins cinq concentrations d'essai selon une série géométrique obéissant à un facteur qui ne dépasse pas de préférence 3.2.

Généralement, lorsque les essais sont conduits dans des récipients répliques, le nombre de récipients témoins répliques, et par conséquent le nombre de poissons, devrait être le double du nombre choisi à chaque concentration d'essai, qui devrait être toujours le même (13) (14) (15). A contrario, sans récipients répliques, le nombre de poissons dans le groupe témoin devrait être le même que dans chaque concentration d'essai.

Si l'analyse de la variance est conduite au niveau des récipients plutôt qu'à celui des poissons [ce qui exigerait un marquage individuel des poissons ou l'utilisation de taux de croissance «pseudo-spécifiques» (voir paragraphe 2.1.2)], il faut un nombre suffisant de récipients répliques pour pouvoir déterminer l'écart-type entre les «récipients de même concentration». Ce qui signifie que l'erreur dans l'analyse de la variance ait au moins 5 degrés de liberté (1l). Si seuls les témoins ont des répliques, la variabilité de l'erreur risque d'être faussée puisqu'elle pourrait s'accroître avec la valeur moyenne du taux de croissance en question. Comme le taux de croissance a des chances de diminuer lorsque la concentration augmente, on aura tendance à surestimer la variabilité.

1.8. MODE OPÉRATOIRE

1.8.1. **Sélection et pesée des poissons d'essai**

Il importe que le poids des poissons varie le moins possible au début de l'essai. On trouvera à l'appendice 1 les gammes de poids qui conviennent aux différentes espèces recommandées pour cet essai. Idéalement, au début de l'essai, la gamme des poids de l'ensemble du lot de poissons utilisés dans l'essai devrait rester comprise dans un intervalle de ± 10 % de la moyenne arithmétique et en aucun cas excéder 25 %. Il est recommandé de peser un sous-échantillon de poissons avant l'essai afin d'estimer le poids moyen.

▼B

Les poissons doivent être privés de nourriture pendant les 24 heures qui précèdent le début de l'essai. Ils sont ensuite choisis au hasard. À l'aide d'un anesthésique général [par exemple, une solution aqueuse de 100 mg/litre de méthanesulphonate de tricaïne (MS 222) neutralisée par l'adjonction de deux parts de bicarbonate de sodium par part de MS 222], les poissons doivent être pesés individuellement en poids frais (*blolted dry*, poissons essuyés) avec la précision indiquée à l'appendice 1. Les poissons dont le poids se situe à l'intérieur de l'intervalle voulu seront retenus puis répartis au hasard entre les récipients d'essai. On notera le poids frais (*wet weighl*) total des poissons dans chaque récipient, l'utilisation d'anesthésique de même que la manipulation des poissons (y compris le séchage et la pesée) peuvent stresser et blesser les jeunes poissons, en particulier les espèces de petite taille. Les juvéniles doivent donc être manipulés avec la plus grande précaution afin d'éviter de stresser et de blesser les animaux testés.

Les poissons sont pesés à nouveau le 28^{e} jour de l'essai (voir point 1.8.6). Si toutefois on juge nécessaire de recalculer la ration alimentaire, on pèsera à nouveau les poissons au 14^{e} jour de l'essai (voir point 1.8.2.3). On pourra recourir à une autre méthode telle que la technique photographique par exemple pour évaluer les variations de taille des poissons à partir de quoi la ration alimentaire pourra être ajustée.

1.8.2. **Conditions d'exposition**

1.8.2.1. *Durée*

La durée de l'essai est de ≥ 28 jours.

1.8.2.2. *Taux de charge et densité de peuplement*

Il importe que le taux de charge et la densité soient adaptés à l'espèce testée (voir appendice 1). Si la densité de peuplement est trop élevée, le stress engendré par la surpopulation entraînera une diminution des taux de croissance, et probablement la maladie. Si elle est trop faible, elle peut induire un comportement territorial susceptible d'affecter également la croissance. En tout état de cause, le taux de charge doit être suffisamment bas pour que la concentration de l'oxygène dissous puisse être maintenue à au moins 60 % de la valeur de saturation en air, sans aération. Un essai tournant (3) a montré que, dans le cas de la truite arc-en-ciel, un taux de charge de 16 truites de 3 à 5 grammes dans un volume de 40 litres était acceptable. La fréquence de renouvellement de l'eau recommandée durant l'essai est de 6 litres/g de poissons par jour.

1.8.2.3. *Alimentation*

Les poissons doivent recevoir une alimentation adéquate (voir appendice 1) en quantité suffisante pour permettre un taux de croissance acceptable. Il faut veiller à éviter la prolifération microbienne et la turbidité de l'eau. Dans le cas de la truite arc-en-ciel, une ration quotidienne de 4 % de son poids corporel par jour devrait remplir ces conditions (3) (16) (17) (18). La ration quotidienne peut être divisée en deux parts égales et administrée aux poissons en deux fois, à au moins 5 heures d'intervalle. La ration est fonction du poids total initial des poissons dans chaque récipient d'essai. Si les poissons sont pesés à nouveau le 14^{e} jour, on recalcule la ration. Les poissons doivent être privés de nourriture pendant les 24 heures qui précèdent leur pesée.

▼B

Les aliments non consommés et les matières fécales doivent être enlevés quotidiennement des récipients d'essai par un nettoyage soigneux du fond de chaque récipient à l'aide d'un suceur.

1.8.2.4. *Lumière et température*

La photopériode et la température de l'eau d'essai doivent être adaptées à l'espèce testée (voir appendice 1).

1.8.3. **Concentrations d'essai**

On doit normalement utiliser cinq concentrations de la substance d'essai, quelle que soit la conception de l'essai (voir point 1.7.2). Une connaissance préalable de la toxicité de la substance d'essai (tirée par exemple d'un essai de toxicité aiguë et/ou d'études de détermination de l'ordre de grandeur) devrait faciliter le choix des concentrations d'essai adéquates. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. La concentration d'essai la plus élevée ne doit pas dépasser la limite de solubilité de la substance dans l'eau.

Si un agent solubilisant est utilisé pour faciliter la préparation de la solution mère, sa concentration finale ne doit pas dépasser 0,1 ml/1 et doit, de préférence, être identique dans tous les récipients d'essai (voir point 1.6.3). Le recours à ce genre de produit devrait cependant être évité dans toute la mesure du possible.

1.8.4. **Témoins**

Le nombre de récipients témoins contenant l'eau de dilution dépend de la conception de l'essai (voir points 1.7-1.7.2). Si l'on utilise un agent solubilisant, on inclura le même nombre de témoins pour l'eau de dilution que pour l'agent solubilisant.

1.8.5. **Fréquence des analyses quantitatives et des mesures**

Au cours de l'essai, les concentrations de la substance à tester sont déterminées à intervalles réguliers (voir ci-après).

Dans les essais dynamiques, les débits du diluant et de la solution mère de substance toxique seront vérifiés périodiquement, de préférence chaque jour. Ces débits ne devraient pas varier de plus de 10 % tout au long de l'essai. Lorsque les concentrations de la substance d'essai sont censées ne pas s'écarter de ± 20 % des valeurs nominales (autrement dit rester comprises dans une plage de 80 à 120 %; voir points 1.6.2 et 1.6.3), on recommande d'analyser au moins la concentration la plus basse et la plus élevée au début de l'essai et périodiquement toutes les semaines par la suite. Pour les essais dans lesquels la concentration de la substance d'essai n'est pas censée rester comprise dans un intervalle de ± 20 % des valeurs nominales (d'après les données sur la stabilité de la substance d'essai), il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations d'essai, mais selon le même régime.

Dans les essais semi-statiques (avec renouvellement) où la concentration de la substance d'essai est censée rester comprise dans un intervalle de ± 20 % des valeurs nominales, il est recommandé, au minimum, d'analyser la concentration la plus basse et la plus élevée juste après leur préparation et juste avant le renouvellement au début de l'essai et toutes les semaines par la suite. Pour les essais dans lesquels la concentration de la substance d'essai n'est pas censée rester comprise dans un intervalle de ± 20 % des valeurs nominales, il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations selon le même régime que pour les substances plus stables.

▼B

On préconise de fonder les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si les données disponibles démontrent que la concentration de la substance d'essai en solution a été correctement maintenue, tout au long de l'essai, dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale ou de la concentration mesurée au départ, les résultats peuvent s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées.

Il peut s'avérer nécessaire de filtrer (par exemple, à l'aide d'un filtre à porcs de 0,45 μm) ou de centrifuger les échantillons. La centrifugation est la procédure recommandée. Toutefois, si le milieu d'essai ne s'absorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable.

Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le pH et la température doivent être mesurés dans tous les récipients d'essai. La dureté totale, l'alcalinité et la salinité, s'il y a lieu, doivent être mesurées dans les récipients témoins et dans celui qui contient la concentration la plus forte. L'oxygène dissous et la salinité, s'il y a lieu, doivent être mesurés au moins trois fois: au début, au milieu et à la fin de l'essai. Dans les essais semi-statiques, on recommande de mesurer l'oxygène dissous plus souvent, de préférence avant et après chaque renouvellement de l'eau ou au moins une fois par semaine. Il faut mesurer le pH au début et à la fin de chaque période de renouvellement de l'eau dans les essais à renouvellement statique et au moins une fois par semaine dans les essais dynamiques. La dureté et l'alcalinité devraient être mesurées une fois au cours de chaque essai. 11 est préférable de surveiller la température en continu dans au moins un récipient d'essai.

1.8.6. **Observations**

Poids: à la fin de l'essai tous les poissons survivants seront pesés en poids frais (poissons essuyés, *blotted dry*) soit en groupes par récipient d'essai soit individuellement. Il est préférable de peser les animaux par récipient d'essai plutôt qu'individuellement, cette dernière méthode obligeant à marquer chaque poisson. Si l'on mesure le taux de croissance spécifique de chaque poisson (pesée individuelle), la technique de marquage devra être choisie de façon à perturber le moins possible les animaux [on peut utiliser une technique différente du cryo-marquage (par congélation), par exemple un mince fil de pêche coloré].

Il faut examiner quotidiennement les poissons durant l'essai et relever toutes les anomalies externes éventuelles (hémorragie, décoloration, par exemple) et les comportement anormaux. Les décès doivent être comptés et les poissons morts retirés du récipient dès que possible. Les poissons morts ne seront pas remplacés, le taux de charge et la densité de peuplement étant suffisamment élevés pour éviter que la modification du nombre de poissons ait des effets sur la croissance. Cependant, la ration alimentaire devra être ajustée.

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Il est recommandé qu'un statisticien participe à la fois à la conception et à l'analyse de l'essai, car cette méthode autorise des variations considérables dans la procédure expérimentale, par exemple en ce qui concerne le nombre d'enceintes expérimentales, de concentrations d'essai, de poissons etc. Compte tenu des choix possibles dans la conception de l'essai, aucune orientation ou méthode statistique précise n'est proposée ici.

▼B

Il n'y a pas lieu de calculer les taux de croissance dans les récipients d'essai où la mortalité dépasse 10 %. Le taux de mortalité doit cependant être spécifié pour toutes les concentrations d'essai.

Quelle que soit la méthode utilisée pour analyser les données, le concept central est le taux de croissance spécifique r entre l'instant t_1 et l'instant t_2. Il peut être défini de diverses manières selon que les poissons ont été ou non marqués individuellement ou selon que l'on recherche une moyenne par récipient.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

où:

r_1 = taux de croissance spécifique de chaque poisson

r_2 = taux de croissance spécifique moyen par récipient

r_3 = taux de croissance «pseudo»-spécifique

w_1, w_2 = poids d'un poisson donné aux instants t_1 et t_2, respectivement

$\log_e w_1$ = logarithme du poids d'un poisson donné au début de la période d'étude

$\log_e w_2$ = logarithme du poids d'un poisson donné à la fin de la période d'étude

$\log_e W_1$ = moyenne des logarithmes des valeurs w_1 des poissons du récipient à la fin de la période d'étude

$\log_e W_2$ = moyenne des logarithmes des valeurs w_2 des poissons du récipient à la fin de la période d'étude

t_1, t_2 = moments (jours) du début et de la fin de la période d'étude

r_1, r_2, r_3 peuvent être calculés pour la période comprise entre le jour 0 et le jour 28 et, s'il y a lieu (c'est-à-dire lorsqu'une mesure a été effectuée au 14e jour), pour les périodes entre 0 et 14 jours et 14 et 28 jours.

2.1.1. **Analyse des résultats par régression (modélisation concentration-effet)**

Cette méthode d'analyse établit une relation mathématique adéquate entre le taux de croissance spécifique et la concentration, ce qui permet d'estimer la «CE_X» c'est-à-dire toute valeur de CE requise. Si l'on utilise cette méthode, il est inutile de calculer r pour chaque poisson (r_1) et l'analyse peut alors s'appuyer sur la valeur moyenne de r pour le récipient (r_2). Cette dernière méthode est préférable. En outre, elle se prête mieux à l'utilisation d'espèces plus petites.

Pour étudier la relation concentration-effet, on porte sur un graphique les taux de croissance spécifiques moyens par récipient (r_2) en fonction de la concentration.

▼B

Pour exprimer la relation entre r_2 et la concentration, il convient de choisir un modèle adéquat et d'étayer ce choix par un raisonnement pertinent.

Si le nombre de poissons survivants varie suivant le récipient, le processus d'ajustement du modèle, qu'il soit simple ou non linéaire, doit être pondéré pour tenir compte de la taille inégale des groupes.

La méthode d'ajustement du modèle doit permettre d'estimer, par exemple, la CE_{20} et de déduire sa dispersion (écart-type ou intervalle de confiance). Le graphique du modèle ajusté devrait être montré en regard des données pour permettre d'apprécier l'adéquation de l'ajustement du modèle (9) (19) (20) (21).

2.1.2. **Analyse des résultats pour l'estimation de la CMEO**

Si le test porte sur plusieurs récipients d'essai répliques (identiques) pour toutes les concentrations, l'estimation de la CMEO pourrait s'appuyer sur une analyse de la variance du taux de croissance spécifique moyen de chaque récipient (voir point 2.1), suivie de l'utilisation d'une méthode pertinente [par exemple, un test de Dunnett ou de Williams (13) (14) (15) (22)] consistant à comparer la moyenne r à chaque concentration avec la moyenne r des témoins afin d'identifier la concentration minimale à laquelle cette différence est significative avec un seuil de probabilité de 0,05. Si les hypothèses requises concernant les méthodes paramétriques ne sont pas remplies — distribution non normale (par exemple, test de Shapiro-Wilk) ou variance hétérogène (test de Bartlett) — il faudra envisager de transformer les données pour homogénéiser les variances avant de mener l'analyse de la variance ou de réaliser une analyse pondérée de la variance.

Si l'essai ne porte pas sur plusieurs récipients par concentration, l'analyse de la variance fondée sur les récipients sera insensible ou impossible. Dans ces circonstances, on peut parvenir à un compromis acceptable en fondant l'analyse de la variance sur le taux de croissance «pseudo» spécifique r_3 de chaque poisson.

La moyenne r_3 pour chaque concentration d'essai peut ensuite être comparée à la moyenne r_3 des témoins. Et la CMEO peut alors être déterminée comme précédemment. Il faut admettre que cette méthode ne tient absolument pas compte de la variabilité entre les récipients, en dehors de celle imputable à la variabilité entre les poissons, et n'offre aucune protection à cet égard. L'expérience a cependant montre (9) que la variabilité entre les récipients était très faible par rapport à celle qui existe dans les récipients (c'est-à-dire entre les poissons). Si l'analyse n'englobe pas les données concernant chaque poisson, il convient d'indiquer la méthode d'identification des valeurs aberrantes (erronées) et de justifier son emploi.

2.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats doivent être interprétés avec prudence lorsque les concentrations mesurées des produits toxiques dans les solutions d'essai sont proches des limites de détection de la méthode d'analyse ou, dans les essais semi-statiques, lorsque la concentration de la substance d'essai diminue entre le moment où la solution vient d'être préparée et le moment qui précède le renouvellement.

2.3. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit fournir les informations suivantes:

▼B

2.3.1. **Substance d'essai**

— État physique et propriétés physico-chimiques pertinentes,

— données relatives à l'identification chimique, notamment la pureté et la méthode d'analyse quantitative de la substance d'essai, s'il y a lieu.

2.3.2. **Espèce testée**

— Nom scientifique,

— souche éventuelle, taille, fournisseur, traitement préalable éventuel, etc.

2.3.3. **Conditions d'essai**

— Méthode utilisée (par exemple, semi-statique/avec renouvellement, dynamique, charge, densité de peuplement, etc.),

— conception de l'essai (par exemple, nombre d'enceintes expérimentales, de concentrations d'essai et de répliques, nombre de poissons par récipient),

— méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (le solubilisant et sa concentration doivent être indiqués, le cas échéant),

— concentrations d'essai nominales, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les récipients d'essai, méthode de détermination et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations de la substance d'essai en solution vraie,

— caractéristiques de l'eau de dilution: pH. dureté, alcalinité, température, concentration de l'oxygène dissous, teneurs résiduelles en chlore (si mesurées), carbone organique total, solides en suspension, salinité du milieu d'essai (si mesurée) et toute autre mesure effectuée,

— qualité de l'eau dans les récipients d'essai: pH, dureté, température et concentration de l'oxygène dissous,

— informations détaillées sur l'alimentation, [par exemple, le type d'aliment{s), la source, la quantité donnée et la fréquence].

2.3.4. **Résultats**

— Données montrant que les témoins remplissent les critères de validité relatifs à la survie, et données sur la mortalité à toutes les concentrations d'essai,

— techniques d'analyse statistique appliquées, statistiques fondées sur les répliques ou les poissons, traitement des données et justification des méthodes utilisées,

— tableaux donnant les poids individuels et moyens des poissons aux jours 0, 14 (si mesurés) et 28, valeurs des moyennes par récipient ou taux de croissance pseudo-spécifiques (s'il y a lieu) pour les périodes de 0 à 28 jours, ou éventuellement de 0 à 14 et de 14 à 28 jours,

— résultats de l'analyse statistique (analyse par régression ou analyse de la variance) fournis de préférence sous forme de tableau ou de graphique, CMEO ($p = 0,05$) et CSEO ou CE_X avec leurs écarts-types si possible,

▼B

— incidence de toute réaction inhabituelle des poissons et de tout effet visible produit par la substance d'essai.

3. BIBLIOGRAPHIE

(1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.

(2) Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(3) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp 1855-1870.

(4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (Brachydanio rerio): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp 157-164.

(5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(6) Holcombe, G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (Oryzias latipes).Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, pp 287-297.

(7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (Oryzias latipes). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.

(8) Stephan C.E. and Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 328-338.

(9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.

(10) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(12) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp 1096-1121.

(13) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp 482-491.

▼B

(14) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp 103-117.

(15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food t o determine food intake by individual rainbow trout, Oncorhynchus mykiss: effect of feeding level. Aquaculture 120, 123-133.

(16) Quinton, J. C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Journal of Fish Biology, 37, 33-41.

(17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.

(18) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1485-1494.

(19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.

(20) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(21) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp 510-531.

▼B

Appendice 1

ESPÈCES DE POISSONS RECOMMANDÉES POUR L'ESSAI ET CONDITIONS D'ESSAI APPROPRIÉES

Espèce	Gamme de températures recommandée (°C)	Photopériode (heures)	Gamme recommandée pour le poids initial des poissons (g)	Précision requise de la mesure	Taux de charge (g/l)	Densité de peuplement (par litre)	Alimentation	Durée de l'essai (jours)
Espèce recommandée:								
Oncorhynchus mykiss Truite arc-en-ciel	12,5-16,0	12-16	1-5	à 100 mg près	1,2-2,0	4	Spécialité alimentaire sèche pour frai de salmonidé	≥ 28
Autres espèces bien étudiées:								
Danio rerio Danio	21-25	12-16	0,050-0,100	à 1 mg près	0,2-1,0	5-10	nourriture vivante *(Brachionus Artemia)*	≥ 28
Oryzias latipes Medaka	21-25	12-16	0,050-0,100	à 1 mg près	0,2-1,0	5-20	nourriture vivante *(Brachionus Artemia)*	≥ 28

▼B

Appendice 2

QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

Substance	Concentrations
Matières particulaires (particules)	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

▼B

Appendice 3

Série logarithmique de concentrations convenant à un essai de toxicité (9)

Colonne (nombre de concentrations entre 100 et 10, ou entre 10 et 1)(*)

1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Une série de cinq concentrations successives (ou plus) peut être choisie dans une colonne. Les points intermédiaires entre les concentrations d'une colonne (x) se trouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées sous forme de pourcentage en volume ou en poids (mg/l ou µg/l). Les valeurs peuvent être multipliées ou divisées par la puissance de 10, adéquate. On pourra utiliser la première colonne si le degré de toxicité est très incertain.

▼B

C.15. POISSON, ESSAI DE TOXICITÉ À COURT TERME AUX STADES DE L'EMBRYON ET DE L'ALEVIN

1. MÉTHODE

La méthode décrite pour cet essai de toxicité à court terme reprend la ligne directrice nº 212 de l'OCDE (1998).

1.1. INTRODUCTION

Cet essai de toxicité à court terme chez le poisson aux stades de l'embryon et de l'alevin consiste à exposer l'animal depuis le stade de l'œuf qui vient d'être fécondé jusqu'à la fin du stade de l'alevin. Aucune alimentation n'est fournie durant l'essai sur les embryons et les alevins, et l'essai devrait donc prendre fin alors que les alevins se nourrissent encore grâce à leur sac vitellin.

Cet essai vise à déterminer les effets létaux et, dans une moindre mesure, sublétaux de produits chimiques à des stades définis de la vie des espèces testées. Il devrait fournir des informations utiles en ce sens qu'il pourrait a) permettre de faire le lien entre les essais létaux et sublétaux, b) servir d'essai de sélection en vue soit d'un essai (complet) de toxicité aux premiers stades de la vie, soit d'un essai de toxicité chronique, et c) être utilisé pour tester des espèces pour lesquelles les techniques d'élevage ne sont pas suffisamment au point pour couvrir la période de transition entre alimentation endogène et alimentation exogène. Il faut savoir que seuls les essais couvrant tous les stades de la vie du poisson sont généralement susceptibles de donner une estimation précise de la toxicité chronique de produits chimiques pour les poissons et que toute limitation de l'exposition écartant tel ou tel stade de la vie risque de diminuer la sensibilité et donc de donner lieu à une sous-estimation de la toxicité chronique. L'essai aux stades de l'embryon et de l'alevin devrait donc être moins sensible que l'essai (complet) de toxicité aux premiers stades de la vie, notamment en ce qui concerne les produits chimiques fortement lipophiles (log P_{oe} > 4) et les substances possédant un mode d'action toxique particulier. On s'attend toutefois à ce que la différence de sensibilité entre les deux essais soit moindre pour les produits chimiques à mode d'action narcotique non spécifique (1).

Avant la publication du présent essai, l'essai aux stades de l'embryon et de l'alevin a surtout été réalisé sur le poisson d'eau douce *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (téléostéens, cyprinidés — nom commun: danio). C'est la raison pour laquelle l'appendice 1 donne des indications détaillées pour la réalisation de l'essai sur cette espèce. Cela n'exclut pas pour autant l'utilisation d'autres espèces de poissons pour lesquelles on dispose déjà d'une certaine expérience (tableaux A et B).

1.2. DÉFINITIONS

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration la plus basse d'une substance d'essai à laquelle on observe un effet significatif (à $p \leq 0,05$) par rapport au témoin. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO doivent exercer un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CMEO.

Concentration (maximale) sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

▼B

1.3. PRINCIPE DE L'ESSAI

Les poissons aux stades de l'embryon et de l'alevin sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dissoute dans l'eau. Le protocole permet de choisir entre un essai semi-statique ou dynamique. Le choix dépend de la nature de la substance d'essai. L'essai débute au moment où l'on place les œufs fécondés dans les enceintes expérimentales et prend fin juste avant que le sac vitellin d'une quelconque larve d'une quelconque enceinte expérimentale ait été complètement absorbé ou avant que des poissons témoins ne meurent d'inanition. Les effets létaux et sublétaux sont évalués et comparés aux valeurs des témoins, en vue de déterminer la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et, de là. la concentration (maximale) sans effet observé (CSEO). Une autre possibilité consiste à analyser ces effets à l'aide d'un modèle de régression permettant d'estimer la concentration qui provoquerait un certain pourcentage d'effet (CL/CE_x) où x représente un pourcentage d'effet défini).

1.4. INFORMATIONS CONCERNANT LA SUBSTANCE D'ESSAI

Il faudrait disposer des résultats d'un essai de toxicité aiguë réalisé de préférence sur l'espèce choisie pour le présent essai. Ces résultats pourront s'avérer utiles pour sélectionner une plage de concentrations appropriée pour l'essai aux premiers stades de la vie. La solubilité dans l'eau (y compris la solubilité dans l'eau de l'essai) et la pression de vapeur de la substance d'essai doivent être connues. Pour déterminer la concentration de la substance dans les solutions d'essai, il convient d'appliquer une méthode d'analyse fiable, dont la précision et la limite de détection sont connues et mentionnées dans le rapport.

Les informations sur la substance d'essai qui peuvent être utiles pour établir les conditions de l'essai comprennent la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pKa, le coefficient de partage n-octanol/eau (P_{oe}) et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir méthode C.4).

1.5. VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai repose sur les conditions suivantes:

— le taux global de survie des œufs fécondés dans les groupes témoins et, s'il y a lieu, dans les récipients ne contenant que le solvant, doit être supérieur ou égal aux limites définies dans les appendices 2 et 3,

— la concentration de l'oxygène dissous doit se situer entre 60 et 100 % de la valeur de saturation en air tout au long de l'essai,

— à aucun moment au cours de l'essai, la température de l'eau ne doit varier de plus de ± 1,5 °C entre les différentes enceintes expérimentales ou entre deux jours consécutifs, et devrait être maintenue dans la plage spécifiée pour l'espèce testée (appendices 2 et 3).

▼B

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Enceintes d'essai**

N'importe quel récipient en verre ou fabriqué dans un matériau chimiquement inerte peut être utilisé. Les récipients doivent être suffisamment grands pour répondre aux critères de charge (voir point 1.7.1.2). Il est recommandé de placer les enceintes expérimentales au hasard dans la partie du laboratoire où se déroule l'essai. Il est souhaitable de disposer les enceintes expérimentales selon un schéma randomisé par blocs, chaque traitement étant représenté dans chaque bloc, plutôt que de les placer de façon complètement aléatoire, lorsqu'il existe des effets systématiques dans le laboratoire qui peuvent être contrecarrés par la randomisation par blocs. Si celle-ci est utilisée, elle doit être prise en compte dans l'analyse ultérieure des résultats. Les enceintes expérimentales doivent être protégées de toute perturbation indésirable.

1.6.2. **Sélection des espèces de poissons**

Les espèces de poissons recommandées sont énumérées dans le tableau 1A. Cela n'exclut pas l'utilisation d'autres espèces (des exemples figurent dans le tableau 1B), mais le mode opératoire devra éventuellement être adapté afin d'offrir les conditions adéquates. Dans ce cas, les choix de l'espèce et de la méthode expérimentale doivent être justifiés.

1.6.3. **Soin des poissons géniteurs**

La ligne directrice 210 de l'OCDE ([1]) et les références (2) (3) (4) (5) (6) donnent des indications détaillées sur la façon de maintenir les poissons géniteurs dans des conditions satisfaisantes.

1.6.4. **Manipulation des embryons et des larves**

Les embryons et les larves peuvent être exposés, au sein de la cuve principale, dans des récipients plus petits pourvus de côtés ou d'extrémités en filet, permettant le passage de la solution d'essai. Il est possible d'induire un écoulement non turbulent dans ces petits récipients en les suspendant à un bras qui déplace le récipient verticalement, en gardant toujours les organismes submergés; un système de siphon peut aussi être employé. Les œufs fécondés des salmonidés peuvent être posés sur des supports ou des grilles ayant des ouvertures suffisantes pour permettre aux larves de passer au travers après l'éclosion. Les pipettes Pasteur conviennent au prélèvement des embryons et des larves dans les essais semi-statiques où le milieu est entièrement renouvelé chaque jour (voir point 1.6.6).

Quand on utilise des récipients, des grilles ou des filets pour maintenir les œufs à l'intérieur de la cuve d'essai principale, ces dispositifs doivent être enlevés après l'éclosion des larves ([1]), mais il faut conserver des filets pour empêcher les poissons de s'échapper. Si les larves doivent être transférées, il ne faut pas les exposer à l'air ni utiliser de filets pour enlever les poissons des récipients contenant les œufs (ces précautions sont superflues pour des espèces moins fragiles, comme la carpe). Le moment de ce transfert varie avec l'espèce et il n'est pas toujours nécessaire. Dans les essais semi-statiques, des béchers ou des récipients peu profonds peuvent être utilisés, munis, si nécessaire, d'une grille placée un peu au-dessus du fond du récipient. Si le volume de ces récipients est suffisant pour satisfaire aux critères de charge (voir point 1.7.1.2), il n'est pas nécessaire de transférer les embryons ou les larves.

([1]) OCDE. Paris, 1992, ligne directrice 210, «Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie».

▼B

1.6.5. **Eau**

Toute eau répondant aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable (énumérées à l'appendice 4) et dans laquelle les témoins de l'espèce testée ont un taux de survie au moins aussi satisfaisant que celui décrit dans les appendices 2 et 3 peut être utilisée pour l'essai. La qualité de cette eau devrait rester constante pendant toute la durée de l'essai. La variation du pH devrait rester comprise dans un intervalle de ± 0,5 unités. Pour s'assurer que l'eau de dilution n'influencera pas indûment les résultats de l'essai (par exemple en complexant la substance d'essai) ou ne nuira pas au comportement des poissons géniteurs, des échantillons doivent être prélevés périodiquement en vue d'être analysés. Il y a lieu de mesurer la teneur en métaux lourds (par exemple, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd et Ni), en principaux anions et cations (par exemple, Ca, Mg, Na, K, Cl et SO_4), en pesticides (par exemple, la totalité des organophosphorés et la totalité des organochlorés), en carbone organique total et en solides en suspension. Ces mesures devraient être effectuées tous les trois mois, par exemple, lorsqu'on sait que l'eau de dilution présente une qualité relativement constante. Si la qualité de l'eau s'est avérée constante sur une période d'au moins un an, les déterminations pourront être plus espacées (par exemple, tous les six mois).

1.6.6. **Solutions d'essai**

Par dilution d'une solution mère, on prépare des solutions d'essai aux concentrations choisies.

La solution mère devrait, de préférence, être préparée par simple mélange ou agitation mécanique de la substance d'essai dans l'eau de dilution (par exemple, au moyen d'un agitateur ou par ultrasons). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) peuvent être utilisées pour amener la solution mère à la concentration souhaitée. Le recours à des solvants ou dispersants (agents solubilisants) doit être évité dans toute la mesure du possible; il peut toutefois s'avérer nécessaire d'utiliser ces produits pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Les solvants qui conviennent sont, par exemple, l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthyl-formamide et le triéthylèneglycol. Parmi les dispersants adéquats, citons le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 % et le HCO-40. Il convient d'être vigilant lorsque l'on utilise des agents facilement biodégradables (par exemple, l'acétone) et/ou volatils, car ils peuvent entraîner une prolifération bactérienne dans les essais dynamiques. L'agent solubilisant, le cas échéant, ne doit pas exercer d'effet significatif sur la survie ni nuire de façon visible aux premiers stades de la vie. d'après l'observation d'un témoin ne comportant que le solvant. Cependant, l'usage de ces substances doit être évité dans toute la mesure du possible.

S'agissant des essais semi-statiques, deux méthodes de renouvellement peuvent être adoptées: soit i) les nouvelles solutions d'essai sont préparées dans des récipients propres et l'on transvase avec précaution les œufs et les larves survivants dans les nouveaux récipients avec un petit volume de solution ancienne, en évitant de les exposer à l'air, soit ii) les organismes testés sont laissés dans leur récipient d'essai pendant que l'on renouvelle au moins les trois-quarts de leur eau. La fréquence de renouvellement du milieu dépend de la stabilité de la substance d'essai, mais un renouvellement quotidien de l'eau est recommandé. Si les tests préliminaires de stabilité (voir point 1.4) révèlent que la concentration de la substance n'est pas stable (sort de l'intervalle de 80 à 120 % de la concentration nominale ou tombe en dessous de 80 % de la concentration mesurée initialement) au cours de la période de renouvellement, il faudrait envisager de pratiquer un essai dynamique. Quoi qu'il en soit, il convient d'éviter de stresser les larves durant le renouvellement de l'eau.

▼B

Les essais dynamiques nécessitent un système qui délivre et dilue en continu la solution mère de la substance d'essai (par exemple, une pompe doseuse, un dilueur proportionnel, un système de saturation), pour distribuer une série de concentrations vers les enceintes d'essai. Les débits des solutions mères et de l'eau de dilution doivent être contrôlés à intervalles quotidiens de préférence, et ne devraient pas varier de plus de 10 % tout au long de l'essai. Un débit équivalent à au moins cinq volumes d'enceintes expérimentales par 24 heures s'est avéré adéquat (2).

1.7. MODE OPÉRATOIRE

Des informations utiles concernant la marche à suivre pour les essais de toxicité sur les embryons de poisson et les alevins se trouvent dans les publications; la bibliographie de ce texte en donne quelques références (7) (8) (9).

1.7.1. **Conditions d'exposition**

1.7.1.1. *Durée*

L'essai devrait débuter de préférence dans les 30 minutes qui suivent la fécondation des œufs. Les embryons sont immergés dans la solution d'essai avant, ou aussitôt que possible après, le commencement de la phase de segmentation du blastodisque et, dans tous les cas. avant le début du stade de la gastrula. Quand les œufs proviennent d'un fournisseur commercial, il n'est pas toujours possible de débuter l'essai juste après la fécondation. Comme la sensibilité de l'essai peut être fortement influencée par un retard dans son lancement, l'essai devrait débuter dans les 8 heures qui suivent la fécondation. Les larves n'étant pas nourries durant la période d'exposition, l'essai doit s'achever juste avant que le sac vitellin d'une quelconque larve d'une quelconque enceinte expérimentale soit complètement absorbé ou avant que les témoins ne meurent d'inanition. La durée de l'essai dépend de l'espèce utilisée. Certaines durées sont recommandées aux appendices 2 et 3.

1.7.1.2. *Charge*

Le nombre d'œufs fécondés au début de l'essai doit être suffisant pour répondre aux critères statistiques. Il y a lieu de les répartir au hasard entre les différents traitements et d'utiliser au moins 30 œufs fécondés répartis en nombre égal (ou aussi proche de l'égalité que possible, car il peut être difficile d'obtenir des lots identiques avec certaines espèces) entre au moins trois enceintes d'essai identiques pour chaque concentration. Le taux de charge (biomasse par volume de solution d'essai) doit être suffisamment bas pour qu'une concentration d'oxygène dissous d'au moins 60 % de la valeur de saturation en air puisse être maintenue sans aération. Dans le cas des essais dynamiques, un taux de charge n'excédant pas 0,5 g/l par 24 heures et ne dépassant pas 5 g/l de solution, à tout moment, a été recommandé (2).

1.7.1.3. *Lumière et température*

La photopériode et la température de l'eau d'essai doivent être adaptées à l'espèce testée (voir appendices 2 et 3). En vue de surveiller la température, il peut être approprié d'utiliser un récipient d'essai supplémentaire.

▼B

1.7.2. **Concentrations d'essai**

On doit normalement utiliser cinq concentrations de la substance d'essai espacées par un facteur constant ne dépassant pas 3,2. La courbe de la CL_{50} en fonction de la période d'exposition, obtenue au cours de l'étude de toxicité aiguë, doit être prise en considération lors de la sélection de la plage des concentrations d'essai. Il peut être judicieux, dans certaines circonstances, d'utiliser moins de cinq concentrations, par exemple, dans les essais limites, et un intervalle plus faible entre les concentrations. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Il n'est pas nécessaire de tester les concentrations supérieures à la CL_{50} après 96 heures ou supérieures à 100 mg/l lorsque la CL_{50} est supérieure à cette concentration. Les substances ne devraient pas être testées au-delà de leur limite de solubilité dans l'eau d'essai.

Lorsqu'un agent solubilisant est utilisé pour faciliter la préparation des solutions d'essai (voir point 1.6.6), sa concentration finale dans les récipients d'essai ne doit pas dépasser 0,1 ml/1 et doit être identique dans tous les récipients d'essai.

1.7.3. **Témoins**

Un témoin contenant l'eau de dilution (en autant d'exemplaires que de besoin) et, le cas échéant, un témoin contenant l'agent solubilisant (en autant d'exemplaires que de besoin) doivent être étudiés parallèlement aux séries traitées avec la substance.

1.7.4. **Fréquence des analyses quantitatives et des mesures**

Au cours de l'essai, les concentrations de la substance à tester sont déterminées à intervalles réguliers.

Dans les essais semi-statiques où la concentration de la substance d'essai est censée rester comprise dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale (dans une plage de 80 à 120 %, voir points 1.4 et 1.6.6), il est recommandé, au minimum, d'analyser la concentration la plus basse et la plus élevée, dès leur préparation et juste avant le renouvellement du milieu, à au moins trois occasions régulièrement espacées au cours de l'essai (les analyses devraient être pratiquées sur des échantillons prélevés dans la même solution, dès leur préparation et au moment du renouvellement).

Pour les essais dans lesquels la concentration de la substance d'essai n'est pas censée rester comprise dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale (d'après les résultats concernant la stabilité de la substance), ii est nécessaire d'analyser toutes les concentrations, dès leur préparation et au moment du renouvellement, mais selon le même régime, c'est-à-dire à au moins trois occasions, régulièrement espacées au cours de l'essai. La détermination des concentrations de la substance d'essai avant le renouvellement ne doit être réalisée que sur un seul récipient par concentration. Les déterminations ne devraient pas être espacées de plus de sept jours. On préconise de baser les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si les données disponibles montrent que la concentration de la substance d'essai dans la solution s'est maintenue correctement dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale ou mesurée au départ, tout au long de l'essai, les résultats peuvent s'appuyer sur la concentration nominale ou les valeurs mesurées au départ.

Dans le cas des essais dynamiques, il convient d'appliquer un régime de prélèvement des échantillons similaire à celui décrit pour les essais semi-statiques (mais le dosage des solutions juste avant leur renouvellement ne s'applique pas ici). Néanmoins, si l'essai dure plus de sept jours, il peut être souhaitable d'augmenter le nombre de prélèvements au cours de la première semaine (par exemple, trois séries de mesures), afin de s'assurer que les concentrations d'essai restent stables.

▼B

Il peut, dans certains cas, s'avérer nécessaire de filtrer (par exemple, à l'aide d'un filtre à pores de 0,45 µm de diamètre) ou de centrifuger les échantillons. Toutefois, comme la centrifugation ou la filtration ne permettent pas toujours de séparer la fraction non biodisponible de la substance d'essai de sa fraction biodisponible, il peut être inutile de soumettre les échantillons à ces traitements.

Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le pH et la température doivent être mesurés dans tous les récipients d'essai. La dureté totale et la salinité, le cas échéant, doivent être déterminées dans les témoins et dans un des récipients contenant la concentration la plus élevée. L'oxygène dissous et la salinité, le cas échéant, doivent être mesurés au moins trois fois: au début, au milieu et à la fin de l'essai. Dans les essais semi-statiques, il est recommandé de mesurer l'oxygène dissous plus fréquemment, de préférence avant et après chaque renouvellement de l'eau ou au moins une fois par semaine. Le pH devrait être mesuré au début et à la fin de chaque période de renouvellement de l'eau dans les essais semi-statiques et au moins une fois par semaine dans les essais dynamiques. Il faudrait déterminer la dureté une fois dans chaque essai. La température devrait être mesurée quotidiennement et, de préférence, surveillée en continu dans au moins un récipient d'essai.

1.7.5. **Observations**

1.7.5.1. *Stade de développement embryonnaire*

Le stade embryonnaire (stade de la gastrula) au début de l'exposition à la substance d'essai doit être vérifié aussi précisément que possible. Cela peut se faire sur un échantillon représentatif d'œufs bien conservés et rendus translucides. Des descriptions et des illustrations des stades embryonnaires peuvent être consultées dans les publications (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *Éclosion et survie*

Il faut observer et dénombrer les éclosions et les survivants au moins une fois par jour. Il peut être souhaitable d'effectuer des observations plus fréquentes au début de l'essai (par exemple, toutes les 30 minutes au cours des trois premières heures), puisque dans certains cas, les temps de survie peuvent être plus significatifs que le seul nombre de morts (notamment en cas d'effets toxiques aigus). Les larves et les embryons morts doivent être retirés dès qu'ils sont repérés, car ils peuvent se décomposer rapidement. Il convient d'être extrêmement attentif, lorsque l'on retire les individus morts, à ne pas heurter ou léser physiquement les œufs et les larves adjacents, qui sont très délicats et sensibles. Les critères indiquant la mort varient en fonction du stade de développement:

— **pour les œufs**: en particulier au début de leur cycle, une diminution marquée de la transparence et un changement de coloration, dus à la coagulation et/ou à la précipitation de protéines et conduisant à un aspect blanc opaque,

— **pour les embryons**: absence de mouvement corporel et/ou absence de battement du cœur et/ou décoloration opaque chez les espèces dont les embryons sont normalement transparents,

— **pour les larves**: immobilité et/ou absence de mouvement respiratoire et/ou absence de battement du cœur et/ou coloration blanche opaque du système nerveux central et/ou absence de réaction aux stimuli mécaniques.

▼B

1.7.5.3. *Aspect anormal*

On doit noter le nombre de larves présentant une anomalie corporelle et/ou de la pigmentation, ainsi que le stade de résorption du sac vitellin, à des intervalles de temps adéquats, en fonction de la durée de l'essai et de la nature de l'anomalie décrite. Il faut savoir que des larves et des embryons anormaux surviennent de façon naturelle et que leur proportion peut atteindre quelques pour cent chez le ou les témoins de certaines espèces. Les animaux anormaux ne doivent être retirés des récipients d'essai qu'à leur mort.

1.7.5.4. *Comportement anormal*

Des anomalies telles qu'une hyperventilation, une nage mal coordonnée et une immobilité atypique doivent être notées à des intervalles de temps qui dépendent de la durée de l'essai. Ces effets, bien que difficiles à quantifier, peuvent le cas échéant contribuer à l'interprétation des données de mortalité, en fournissant des informations sur le mode d'action toxique de la substance.

1.7.5.5. *Longueur*

À la fin de l'essai, il est recommandé de mesurer la longueur de chaque individu en utilisant la longueur standard, la longueur à la fourche ou la longueur totale. Cependant, si l'on constate une putréfaction de la nageoire caudale ou une usure des nageoires, on doit employer la longueur standard. Habituellement, dans un essai correctement exécuté, le coefficient de variation de la longueur entre les différents récipients des témoins doit être ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Poids*

À la fin de l'essai, chaque individu peut être pesé; le poids sec (24 heures à 60° C) est préférable au poids frais (poissons essuyés). Généralement, dans un essai correctement exécuté, le coefficient de variation du poids entre les différents récipients des témoins doit être ≤ 20 %.

Ces observations permettront de livrer une partie ou la totalité des données suivantes à l'analyse statistique:

— mortalité cumulée,

— nombre de larves saines à la fin de l'essai,

— moment du commencement de l'éclosion et de la fin de celle-ci (90 % d'œufs éclos dans chaque enceinte de concentration identique),

— nombre de larves écloses chaque jour,

— longueur (et poids) des animaux survivants à la fin de l'essai,

— nombre de larves déformées ou d'aspect anormal,

— nombre de larves présentant un comportement anormal.

▼B

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Il est recommandé qu'un statisticien participe à la fois à la conception et à l'analyse de l'essai, puisque cette méthode autorise des variations considérables dans la procédure expérimentale, par exemple en ce qui concerne le nombre d'enceintes expérimentales, le nombre de concentrations d'essai, le nombre initial d'œufs fécondés et les paramètres mesurés. Compte tenu des choix possibles dans la conception de l'essai, on ne donnera pas ici d'orientations précises sur les méthodes statistiques.

Si la CMEO et la CSEO doivent être estimées, il sera nécessaire d'analyser les variations au sein de chaque série d'enceintes de concentration identique par l'analyse de la variance ou les méthodes avec tableau de contingence. La méthode de Dunnett peut être utile pour procéder à des comparaisons multiples entre les résultats obtenus à chaque concentration et ceux des témoins (12) (13). Il existe d'autres exemples pertinents (14) (15). La grandeur de l'effet détectable par l'analyse de la variance ou par d'autres méthodes (c'est-à-dire la puissance de l'essai) devrait être calculée et mentionnée dans le rapport. Il faut savoir que les observations énumérées au point 1.7.5.6 ne se prêtent pas toutes au traitement statistique par l'analyse de la variance. À titre d'exemple, la mortalité cumulée et le nombre de larves saines à la fin de l'essai pourraient être analysés à l'aide de méthodes des probits.

S'il y a lieu d'estimer la CL et la CE_X, une courbe adéquate, telle que la courbe logistique, doit être ajustée aux résultats étudiés par une méthode statistique telle que la méthode des moindres carrés ou des moindres carrés non linéaires. La ou les courbes doivent être paramétrées de façon que la CL et la CE, recherchées et leur écart-type puissent être estimés directement. Cela facilitera beaucoup le calcul des limites de confiance autour de la CL et de la CE_X. À moins d'avoir de bonnes raisons de préférer d'autres niveaux de confiance, des limites de confiance de 95 % de part et d'autre devraient être choisies. La procédure d'ajustement devrait, de préférence, permettre d'évaluer la signification du manque d'ajustement. Des méthodes graphiques d'ajustement des courbes peuvent être utilisées. Toutes les observations énumérées au point 1.7.5.6 se prêtent à l'analyse de régression.

2.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats doivent être interprétés avec prudence, lorsque les concentrations mesurées des produits toxiques dans les solutions d'essai sont proches des limites de détection de la méthode d'analyse. L'interprétation des résultats concernant les concentrations supérieures à la solubilité de la substance dans l'eau doit aussi se faire avec prudence.

2.3. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

2.3.1. **Substance d'essai**

— État physique et propriétés physico-chimiques pertinentes,

— données relatives à l'identification chimique, notamment la pureté et la méthode d'analyse quantitative de la substance d'essai, s'il y a lieu.

▼B

2.3.2. **Espèce d'expérience**

— Nom scientifique, variété, nombre de poissons parents (c'est-à-dire nombre de femelles utilisées pour fournir le nombre d'œufs requis par l'essai), source et méthode de collecte des œufs fécondés et manipulations ultérieures.

2.3.3. **Conditions d'essai**

— Méthode utilisée (par exemple, semi-statique ou dynamique, temps écoulé entre la fécondation et le début de l'essai, charge, etc.),

— photopériode(s),

— conception de l'essai (par exemple, nombre d'enceintes expérimentales et d'exemplaires de même concentration, nombre d'embryons par exemplaire),

— méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (l'agent solubilisant et sa concentration doivent être spécifiés, le cas échéant),

— concentrations nominales de l'essai, valeurs mesurées dans les récipients d'essai, moyennes et écarts-types de celles-ci et méthode de détermination; si la substance d'essai est soluble dans l'eau à des concentrations inférieures à celles qui ont été testées, il faut démontrer que les mesures se réfèrent aux concentrations de la substance d'essai dans la phase dissoute,

— caractéristiques de l'eau de dilution: pH, dureté, température, concentration d'oxygène dissous, teneur en chlore résiduel (si elle a été mesurée), carbone organique total, solides en suspension, salinité du milieu d'essai (si elle a été mesurée) et toute autre mesure effectuée,

— qualité de l'eau dans les récipients d'essai, pH, dureté, température et concentration d'oxygène dissous.

2.3.4. **Résultats**

— Résultats des éventuelles études préliminaires sur la stabilité de la substance d'essai,

— données montrant que les témoins répondent à la norme générale d'acceptabilité relative à la survie de l'espèce (appendices 2 et 3),

— résultats concernant la mortalité et la survie aux stades de l'embryon et de la larve et taux de mortalité et de survie globaux,

— délais d'éclosion et nombre d'œufs éclos,

— longueur (et poids),

— description et fréquence des anomalies morphologiques, le cas échéant,

— description et fréquence des effets sur le comportement, le cas échéant,

— analyse statistique et traitement des données,

— pour les essais soumis à l'analyse de la variance, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) à $p = 0,05$ et la concentration sans effet observé (CSEO) pour chaque réponse évaluée, ainsi qu'une description des méthodes statistiques utilisées et une indication de la grandeur de l'effet qui peut être détecté.

▼B

— pour les essais analysés à l'aide de techniques de régression, la CL et la CE_x et leurs intervalles de confiance et un graphique du modèle ajusté utilisé pour les calculer,

— justification de tout écart par rapport à la présente méthode d'essai.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FEES Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, p. 128, Ecological Research Scries EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121-173.

(6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish *(Brachydanio rerio)* Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry. 6, pp. 61-71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout *(Salmo gairdneri)*. J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 pp.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury. Nickel. Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio.* Arch, of Environmental Contamination and Toxicology, 21, pp. 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology — an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: pp. 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C, Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, pp. 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias* latipes. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, *(Oryzias latipes).* EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow *{Pimephales pwmelas)* larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, pp. 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

Tableau 1A

Espèces de poissons recommandées pour l'essai

Eau douce
Oncorhynchus mykiss
Truite arc-en-ciel (9) (16)
Danio rerio
Danio (7) (17) (18)
Cyprinus caprio
Carpe commune (8) (19)
Oryzias latipes
Medaka (20) (21)
Pimephales promelas
Tête-de-boule (8) (22)

▼B

Tableau 1B

Exemples d'autres espèces également utilisées et sur lesquelles on possède une bonne documentation

Eau douce	Eau salée
Carassius auratus Cyprin doré (8)	*Menidia peninsulae* Capucette nord-américaine (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus Crapet arlequin (8)	*Clupea harengus* Hareng (24) (25)
	Gadus morhua Morue (24) (25)
	Cyprinodon variegalus Fondule tête de mouton (23) (24) (25)

▼B

Annexe 1

ORIENTATIONS POUR LA RÉALISATION D'UN ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES EMBRYONS ET LES ALEVINS DU DANIO *(BRACHYDANIO RERIO)*

INTRODUCTION

Le danio est originaire de la côte de Coromandel. en Inde, où il peuple les rivières à courant rapide. C'est une espèce courante en aquarium, appartenant à la famille des carpes. Des informations sur les méthodes d'élevage et les soins à lui apporter se trouvent dans des manuels de référence sur les poissons tropicaux. Sa biologie et son utilisation dans la recherche liée à la pêche ont été passées en revue par Laale (1).

Ce poisson dépasse rarement 45 mm de longueur. Son corps cylindrique arbore 7 à 9 rayures horizontales bleu foncé et argentées. Ces rayures se prolongent dans les nageoires caudales et anales. Son dos est vert olive. Les mâles sont plus minces que les femelles. Les femelles sont plus argentées et leur abdomen est distendu, en particulier avant le frai.

Les poissons adultes sont capables de supporter de grandes fluctuations de température, de pH et de dureté. Toutefois, afin de disposer de poissons sains qui produisent des œufs de bonne qualité, il faut leur fournir des conditions optimales.

Pendant la parade nuptiale, le mâle poursuit la femelle et lui donne des coups de tête; les œufs sont fécondés dès qu'ils sont expulsés. Les œufs, qui sont transparents et non adhérents, tombent au fond où ils peuvent être mangés par les parents. Le frai est influencé par la lumière. Si la lumière du matin est suffisante, le poisson fraie habituellement au cours des premières heures qui suivent le lever du soleil.

Une femelle peut produire des pontes de plusieurs centaines d'œufs à des intervalles d'une semaine.

ÉTAT DES POISSONS PARENTS, REPRODUCTION ET PREMIERS STADES DE LA VIE

Un nombre adéquat de poissons sains est sélectionné et gardé dans une eau appropriée (voir à l'appendice 4 par exemple) pendant au moins deux semaines avant le frai prévu. Le groupe de poissons devrait s'être reproduit au moins une fois avant d'engendrer la série d'œufs utilisés dans l'essai. La densité des poissons durant cette période ne devrait pas excéder 1 gramme de poissons par litre. La densité pourra être plus élevée si l'eau est renouvelée régulièrement ou si on a recours à des systèmes de purification. La température des aquariums devrait être maintenue à 25 ± 2 ºC. Les poissons devraient recevoir un régime alimentaire varié, qui pourrait se composer, par exemple, d'aliments déshydratés appropriés trouvés dans le commerce, d'Artemia vivants récemment éclos, de chironomidés, de *Daphnia* et de vers blancs de la famille des enchytréidés.

Deux méthodes ayant permis d'obtenir un lot suffisant d'œufs fécondés sains, en vue de l'essai, sont résumées ci-dessous:

i) Huit femelles et seize mâles sont placés dans un aquarium contenant 50 litres d'eau de dilution, protégé de la lumière directe. On évitera le plus possible de les perturber pendant au moins 48 heures. Un support de frai est disposé au fond de l'aquarium, pendant l'après-midi du jour qui précède le début de l'essai. Le support de frai se compose d'un cadre (en plexiglas ou dans un autre matériau adapté) de 5 à 7 cm de haut, muni d'un filet à grosse; mailles (2-5 mm) à son sommet et d'un filet à mailles fines (10-30 um) à sa base. Plusieurs «arbres à frai», consistait en une corde de nylon non torsadée, sont attachés au filet à grosses mailles du support. Après que les poissons on été laissés dans l'obscurité pendant 1 2 heures, on allume une faible lumière qui va déclencher le frai. 2 à 4 heure après le frai, le support de frai est retiré et les œufs sont récupérés. Le support de frai empêchera les poissons d manger les œufs et facilitera en même temps la collecte des œufs. Le groupe de poissons devra avoir frayé au moin une fois avant le frai qui donnera les oeufs destinés à l'essai.

▼B

ii) Cinq à dix poissons mâles et femelles sont gardés dans des aquariums individuels pendant au moins deux semaint avant le frai prévu. Après 5 à 10 jours, les abdomens des femelles seront distendus et leurs papilles génitales app, raîtront visiblement. Les poissons mâles n'ont pas de papilles. Le frai se déroule dans des cuves équipées d'un fat fond en filet (voir ci-dessus}. La cuve est remplie d'eau de dilution jusqu'à une hauteur de 5 à 10 cm au-dessus c filet. Une femelle et deux mâles sont placés dans la cuve un jour avant le frai prévu. La température de l'eau (portée progressivement à un degré au-dessus de la température d'acclimatation. On éteint la lumière et on évi autant que possible toute perturbation aux poissons. Au matin, une faible lumière est allumée, qui déclenchera frai. Après 2 à 4 heures, les poissons sont enlevés et les œufs récoltés. Si le nombre d'œufs nécessaire dépasse capacité de production d'une femelle, un nombre suffisant de cuves de frai peut être disposé en parallèle. En nota la capacité de reproduction de chaque femelle avant l'essai (taille de la ponte et qualité des œufs), on peut sélectio ner les femelles qui possèdent la capacité de reproduction la plus avantageuse pour l'essai.

Les œufs doivent être transférés vers les récipients d'essai dans des tubes en verre (diamètre intérieur supérieur ou égal à 4 mm) dotés d'une poire aspirante souple. La quantité d'eau accompagnant les œufs lors de leur transfert devrait être aussi faible que possible. Les œufs sont plus denses que l'eau et tombent hors du tube. Il faut veiller à ce que les œufs (et les larves) n'entrent pas en contact avec l'air. On procédera à un examen microscopique d'un ou de plusieurs échantillons de pontes, pour vérifier s'il n'y a pas d'anomalies aux premiers stades de développement. La désinfection des œufs n'est pas autorisée.

Le taux de mortalité des œufs est le plus élevé dans les 24 heures qui suivent la fécondation. On observe souvent une mortalité de 5 à 40 % durant cette période. Les œufs dégénèrent parce que la fécondation a échoué ou le développement ne se déroule pas normalement. La qualité des œufs d'une ponte semble dépendre de la femelle, certaines femelles produisant systématiquement des œufs de bonne qualité, tandis que d'autres n'y arrivent jamais. La vitesse de développement et d'éclosion varie aussi d'une ponte à l'autre. Les œufs dont la fécondation s'est bien déroulée et les alevins présentent un taux de survie élevé, normalement supérieur à 90 % pour cent. À 25 ºC, les œufs éclosent 3 à 5 jours après la fécondation et le sac vitellin est absorbé environ 13 jours après la fécondation.

Le développement embryonnaire a été bien caractérisé par Hisaoka et Battle (2). Grâce à la transparence des œufs et des larves écloses, il est possible de suivre le développement des poissons et d'observer la présence de malformations. Environ 4 heures après le frai, les œufs fécondés peuvent être distingués des œufs non fécondés (3). Les œufs et les larves sont placés dans des récipients d'essai de petit volume puis examinés au microscope.

Les conditions d'essai qui s'appliquent aux premiers stades de la vie sont énumérées à l'appendice 2. Les valeurs optimales pour le pH et la dureté de l'eau de dilution sont respectivement de 7,8 et de 250 mg de $CaCO_3$/l.

CALCULS ET STATISTIQUES

Une démarche en deux étapes est proposée. Tout d'abord, on procède à l'analyse statistique des données concernant la mortalité, les anomalies du développement et le moment de l'éclosion. Ensuite, on évalue statistiquement la longueur corporelle des poissons pour les concentrations auxquelles aucun effet nuisible n'a été détecté sur l'ensemble de ces trois premiers paramètres. Cette démarche est souhaitable étant donné que le produit toxique peut sélectivement tuer les plus petits poissons, retarder l'éclosion et induire des malformations évidentes, et par conséquent fausser les mesures de la longueur. En outre, il y aura à peu près le même nombre de poissons à mesurer par traitement, ce qui garantira la validité de l'analyse statistique de l'essai.

▼B

DÉTERMINATION DE LA CL_{50} ET DE LA CE_{50}

Le pourcentage d'œufs et de larves survivants est calculé et corrigé en fonction de la mortalité chez les témoins à l'aide de la formule d'Abbott (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P}{C} \times 100 \right)$$

où:

P = pourcentage de survivants corrigé

P' = pourcentage de survivants observé dans la concentration d'essai

C = pourcentage de survivants chez les témoins

Si possible, la CL_{50} devra être déterminée par une méthode appropriée à la fin de l'essai.

Si l'on souhaite intégrer les données relatives aux malformations morphologiques dans le traitement statistique de In CE_{50} on trouvera des indications à ce sujet dans l'article de Stephan (5).

ESTIMATION DE LA CMEO ET DE LA CSEO

L'essai de toxicité aux stades de l'embryon et de l'alevin vise notamment à comparer les expériences menées à des concentrations non nulles avec les témoins afin de déterminer la CMEO. Il y a donc lieu d'appliquer les méthodes de comparaisons multiples (6) (7) (8) (9) (10).

BIBLIOGRAPHIE

(1) Laale H. W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanïo* rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10. pp. 121-173.

(2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio reno* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102. 311 pp.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173-181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control.). Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(7) Dunnett C. W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103-117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519-531.

(10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

Appendice 2

CONDITIONS ET DURÉE DE L'ESSAI ET CRITÈRES DE SURVIE POUR LES ESPÈCES RECOMMANDÉES

Espèce	Température (degrés C)	Salinité (‰o)	Photopériode (heures)	Durée des stades (jours)		Durée habituelle de l'essai	Survie des témoins (% minimum)	
				Embryon	Alevin		Taux de réussite de l'éclosion	Après éclosion
EAU DOUCE								
Brachydanio rerio Danio	25 ± 1	—	12-16	3-5	8-10	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (8-10 jours)	80	90
Oncorhynchus mykiss Truite arc-en-ciel	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (3)	30-35	25-30	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 20 jours après l'éclosion (50-55 jours)	66	70
Cyprinus carpio Carpe commune	21-25	—	12-16	5	> 4	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (8-9 jours)	80	75
Oryzias latipes Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12-16	8-11	4-8	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (13-16 jours)	80	80
Pimephales promelas Tête-de-boule	25 ± 2	—	16	4-5	5	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (8-9 jours)	60	70

(1) Pour les embryons.
(2) Pour les larves.
(3) Obscurité pour les embryons et les larves jusqu'à une semaine après l'éclosion, sauf pendant qu'on les examine. Une lumière tamisée est ensuite appliquée jusqu'à la fin de l'essai.

Appendice 3

Conditions de l'essai, durée et critères de survie pour d'autres espèces sur lesquelles on possède une bonne documentation

Espèce	Température (degrés C)	Salinité (% 0)	Photopériode (heures)	Durée des stades (jours)		Durée habituelle de l'essai sur l'embryon et l'alevin	Survie des témoins (% minimum)	
				Embryon	Alevin		Taux de réussite de l'éclosion	Après éclosion
EAU DOUCE								
Carassius auratus Cyprin doré	24 ± 1	—	—	3-4	> 4	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (7 jours)	_	80
Léopomis macrochirus Crapet arlequin	21 ± 1	—	16	3	> 4	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (7 jours)	—	75
EAU SALÉE								
Menidia peninsulae Capucette nord-américaine	22-25	15-22	12	1,5	10	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (6-7 jours)	80	60
Clupea harengus Hareng	10 ± 1	8-15	12	20-25	3-5	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 3 jours après l'éclosion (23-27 jours)	60	80
Gadus morhua Morue	5 ± 1	5-30	12	14-16	3-5	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 3 jours après l'éclosion (18 jours)	60	80
Cyprinodon variegatus Fondule tête de mouton	25 ± 1	15-30	12	—	—	Dès que possible après la fécondation (début du stade gastrula) jusqu'à 4/7 jours après l'éclosion (28 jours)	> 75	80

▼B

APPENDICE 4

QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

Substance	Concentrations
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

▼B

C.16. ABEILLE DOMESTIQUE — ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË PAR VOIE ORALE

1. MÉTHODE

La méthode décrite pour cet essai de toxicité aiguë reprend la ligne directrice nº 213 de l'OCDE (1998).

1.1. INTRODUCTION

Le présent essai de toxicité est une méthode d'essai en laboratoire destinée à évaluer la toxicité aiguë par voie orale des pesticides et d'autres produits chimiques pour des abeilles domestiques ouvrières adultes.

Lorsqu'on apprécie et évalue les caractéristiques toxiques d'une substance, il peut être nécessaire de déterminer sa toxicité aiguë par voie orale pour les abeilles domestiques, par exemple, lorsque des abeilles risquent d'être exposées à cette substance. L'essai de toxicité aiguë par voie orale vise à déterminer la toxicité intrinsèque des pesticides et d'autres produits chimiques pour les abeilles. Les résultats de cet essai devraient être mis à profit pour établir la nécessité d'une évaluation plus poussée. Cette méthode peut être utilisée, en particulier, dans des programmes séquentiels destinés à évaluer les risques des pesticides pour les abeilles, selon la progression suivante: essais de toxicité en laboratoire, essais en conditions semi-naturelles et essais sur le terrain (1). Les pesticides peuvent être testés en tant que substances actives ou en tant que préparations chimiques.

Un étalon de toxicité doit être utilisé pour vérifier la sensibilité des abeilles et la précision du protocole d'essai.

1.2. DÉFINITIONS

Toxicité aiguë par voie orale: effets nocifs se produisant dans un délai maximal de 96 heures après l'administration d'une dose unique de la substance d'essai par voie orale.

Dose: de substance d'essai consommée. La dose est exprimée en masse (µg) de substance d'essai par animal testé (µg/abeille). La dose réellement consommée par chaque abeille ne peut être calculée, étant donné que les abeilles sont nourries collectivement, mais il est possible d'estimer une dose moyenne (quantité totale de substance d'essai consommée/nombre d'abeilles testées par cage).

DL_{50} (dose létale 50 %) orale: dose unique d'une substance, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 % des animaux lorsqu'elle est administrée par voie orale. La DL_{50} s'exprime en µg de substance d'essai par abeille. Pour les pesticides, la substance d'essai peut être une substance active ou une préparation chimique contenant une ou plusieurs substances actives.

Mortalité: un animal est noté comme mort lorsqu'il est complètement immobile.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Des abeilles domestiques ouvrières adultes *(Apis mellifera)* sont exposées à une gamme de doses de la substance d'essai dispersée dans une solution de saccharose. Elles reçoivent ensuite la même alimentation, mais sans la substance d'essai. La mortalité est notée quotidiennement durant au moins 48 heures et comparée aux valeurs des témoins. Si le taux de mortalité augmente entre 24 heures et 48 heures, tandis que la mortalité des témoins demeure à un niveau acceptable, c'est-à-dire ≤ 10 %, il convient d'allonger la durée de l'essai jusqu'à 96 heures au maximum. On analyse les résultats afin de calculer la DL_{50} à 24 heures et à 48 heures et, si l'étude est prolongée, à 72 heures et à 96 heures.

▼B

1.4. VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai repose sur les conditions suivantes:

— le taux moyen de mortalité de l'ensemble des témoins ne doit pas dépasser 10 % à la fin de l'essai,

— la DL_{50} de l'étalon de toxicité se trouve dans la gamme spécifiée.

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.5.1. **Collecte des abeilles**

Il convient d'utiliser de jeunes abeilles ouvrières adultes de la même race, autrement dit des abeilles du même âge, nourries de la même façon, etc. Elles doivent provenir de colonies saines, correctement nourries, dépourvues autant que possible d'individus malades, possédant une reine dans la ruche, et dont on connaît l'histoire et l'état physiologique. Elles peuvent être collectées le matin du jour où elles seront utilisées ou la veille au soir et gardées dans les conditions de l'essai jusqu'au jour suivant. Les abeilles récoltées sur des cadres dépourvus de couvain conviennent. Il faut éviter de collecter les abeilles au début du printemps ou à la fin de l'automne parce qu'elles subissent un changement physiologique à ces époques. Si les essais doivent être effectués au début du printemps ou à la fin de l'automne, on peut faire éclore les abeilles dans une étuve et elles seront ensuite élevées pendant une semaine avec du pain d'abeille (pollen récolté sur les rayons) et une solution de saccharose. Les abeilles traitées avec des substances chimiques, telles que des antibiotiques, des antivarroa, etc., ne doivent pas être soumises à des essais de toxicité durant 4 semaines à partir de la fin du dernier traitement.

1.5.2. **Conditions d'encagement et d'alimentation**

On utilise des cages faciles à nettoyer et bien ventilées. Tout matériau approprié peut être employé, par exemple des cages en acier inoxydable, en toile métallique, en plastique, des cages jetables en bois, etc. Il est préférable de répartir les abeilles en groupes de dix par cage. La dimension des cages d'essai doit être adaptée au nombre d'abeilles, c'est-à-dire leur fournir un espace suffisant.

Les abeilles doivent être gardées à l'obscurité dans une salle d'expérience chauffée à une température de 25 ± 2 ºC. L'humidité relative, comprise normalement entre 50 et 70 %, doit être enregistrée tout au long de l'essai. Les manipulations, et notamment le traitement et les observations, peuvent s'effectuer à la lumière (du jour). Les abeilles sont nourries avec une solution de saccharose dans l'eau dont la concentration finale s'élève à 500 g/l (50 % en poids par unité de volume). Après que les doses d'essai ont été administrées, l'alimentation doit être fournie ad libitum. Le système d'alimentation doit permettre l'enregistrement de la prise de nourriture dans chaque cage (voir point 1.6.3.1). Un tube de verre (de quelque 50 mm de long et 10 mm de large, dont le diamètre de l'extrémité ouverte est rétréci à environ 2 mm) peut être utilisé.

1.5.3. **Préparation des abeilles**

Les abeilles récoltées sont réparties au hasard dans les cages d'essai qui, elles-mêmes, sont disposées au hasard dans la salle d'expérience.

▼B

Les abeilles peuvent être privées de nourriture pendant une durée maximale de 2 heures avant le début de l'essai. On recommande de faire jeûner les abeilles avant le traitement pour que le niveau de remplissage de leur tube digestif soit identique au début de l'essai. Les abeilles moribondes doivent être enlevées et remplacées par des abeilles saines avant le début de l'essai.

1.5.4. **Préparation des doses**

Si la substance d'essai est miscible dans l'eau, elle peut être dispersée directement dans une solution de saccharose à 50 %. Pour les produits de qualité technique et les substances peu solubles dans l'eau, des véhicules tels que des solvants organiques, des émulsifiants ou des dispersants peu toxiques pour les abeilles peuvent être utilisés (par exemple, de l'acétone, du diméthylformamide, du diméthylsulfoxyde). La concentration du véhicule dépend de la solubilité de la substance d'essai et doit être identique pour toutes les concentrations testées. Cependant, il convient généralement d'appliquer une concentration de 1 % pour le véhicule et de ne pas la dépasser.

Des solutions témoins appropriées doivent être préparées; autrement dit, si un solvant ou un dispersant ont été employés pour solubiliser la substance d'essai, deux groupes de témoins doivent être utilisés: une solution aqueuse et une solution de saccharose renfermant le solvant ou le véhicule à la même concentration que dans les solutions d'essai.

1.6. MODE OPÉRATOIRE

1.6.1. **Groupes testés et groupes témoins**

Le nombre de doses et de groupes d'essai testés par dose doit se prêter aux exigences statistiques de la détermination de la DL_{50}, avec des limites de confiance de 95 %. L'essai demande normalement 5 doses appartenant à une série géométrique dont le facteur n'excède pas 2,2 et qui englobe la DL_{50}. Toutefois, le facteur de dilution et le nombre de concentrations du traitement doivent être déterminés en fonction de la pente de la courbe de toxicité (dose en fonction de la mortalité) et en tenant compte de la méthode statistique choisie pour analyser les résultats. Un test de détermination de l'ordre de grandeur permet de choisir les concentrations appropriées pour le dosage.

Il faut tester au moins 3 groupes d'essai identiques, comportant chacun 10 abeilles, par concentration d'essai. Pas moins de 3 groupes témoins, comportant chacun 10 abeilles, devraient être testés parallèlement aux groupes traités. Des séries de témoins devraient également être incluses pour les solvants ou les véhicules utilisés (voir point 1.5.4).

1.6.2. **Étalon de toxicité**

Un étalon de toxicité doit être testé parallèlement aux groupes traités. Il faut sélectionner au moins 3 doses afin d'englober la valeur supposée de la DL_{50}. Chaque dose doit être testée dans au moins 3 cages contenant chacune 10 abeilles. L'étalon de toxicité préféré est le diméthoate, dont la DL_{50} par voie orale après 24 heures se situe entre 0,10 et 0,35 μg de substance active/abeille (2). D'autres étalons de toxicité pourraient toutefois être acceptables, s'il existe suffisamment de données qui permettent de vérifier la relation dose/effet escomptée (par exemple le parathion).

▼B

1.6.3. **Exposition**

1.6.3.1. *Administration des doses*

Il faut fournir à chaque groupe d'abeilles testé 100 à 200 µl d'une solution aqueuse de saccharose à 50 % contenant la substance d'essai à la concentration appropriée. Il est nécessaire d'administrer un volume plus grand dans le cas des produits peu solubles, peu toxiques ou peu concentrés dans la préparation, étant donné qu'il faut utiliser des proportions plus élevées dans la solution de saccharose. La quantité de nourriture traitée consommée par groupe doit être surveillée. Une fois vidé (généralement en 3 à 4 heures), le tube contenant la solution alimentaire traitée doit être retiré de la cage et remplacé par un tube contenant une solution de saccharose pure. Les solutions de saccharose sont ensuite fournies ad libitum. Pour certains composés, la nourriture traitée avec des concentrations élevées peut être rejetée par les abeilles, si bien que la quantité de nourriture consommée risque d'être faible ou nulle. Après 6 heures au maximum, la nourriture traitée non consommée doit être remplacée par une solution de saccharose pure. La quantité de nourriture traitée consommée doit être évaluée {par exemple, en mesurant le volume ou le poids de la nourriture traitée restante).

1.6.3.2. *Durée*

L'essai dure 48 heures après que la solution d'essai a été remplacée par une solution de saccharose pure. Si! a mortalité continue de s'accroître de plus de 10 % après les premières 24 heures, la durée de l'essai doit être prolongée jusqu'à 96 heures au maximum, à condition que la mortalité des témoins n'excède pas 10 %.

1.6.4. **Observations**

La mortalité est relevée 4 heures après le début de l'essai et ensuite 24 heures et 48 heures après que la dose a été administrée. Si une période d'observation prolongée est requise, d'autres évaluations devront être pratiquées à des intervalles de 24 heures jusqu'à 96 heures au maximum, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 %.

La quantité de solution alimentaire consommée par groupe doit être estimée. La comparaison entre les taux de consommation des solutions traitées et non traitées en l'espace de 6 heures peut donner une idée des qualités organoleptiques de la nourriture traitée.

Tous les effets se traduisant par des anomalies du comportement pendant la période d'essai doivent être notés.

1.6.5. **Essai limite**

Dans certains cas (par exemple, lorsqu'on s'attend à ce qu'une substance d'essai soit peu toxique), un essai limite peut être exécuté avec 100 µg de substance active/abeille afin de démontrer que la DL_{50} est supérieure à cette valeur. Le même protocole doit être appliqué, et notamment les 3 groupes d'essai identiques pour la dose testée, les témoins nécessaires, l'évaluation de la quantité de nourriture traitée consommée et l'utilisation d'un étalon de toxicité. Si on constate une mortalité, il convient de mener une étude complète. Si on observe des effets sublétaux (voir point 1.6.4), il faut les noter.

▼B

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1. RÉSULTATS

Les résultats doivent être récapitulés sous la forme de tableaux, montrant pour chaque groupe traité avec la substance d'essai ainsi que pour les témoins et les groupes traités avec l'étalon de toxicité, le nombre d'abeilles employé, la mortalité à chaque heure d'observation et le nombre d'abeilles présentant un comportement anormal. Les données de mortalité seront analysées par les méthodes statistiques appropriées (par exemple, la méthode des probits, la moyenne mobile, la probabilité binomiale) (3) (4). On trace les courbes dose/effet pour chaque moment d'observation recommandé (24 heures, 48 heures, et, si nécessaire, 72 heures, 96 heures) et on calcule les pentes des courbes et les doses létales 50 % (DL_{50}) avec des limites de confiance de 95 %. Les corrections relatives à la mortalité des témoins doivent s'effectuer selon la méthode d'Abbott (4) (5). Lorsque la nourriture traitée n'est pas complètement consommée, la dose de la substance d'essai consommée par groupe doit être déterminée. La DL_{50} doit être exprimée en µg de substance d'essai par abeille.

2.2. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

2.2.1. **Substance d'essai**

— État physique et propriétés physico-chimiques pertinentes (par exemple, stabilité dans l'eau, pression de vapeur),

— données relatives à l'identification chimique, notamment la formule structurale, la pureté (dans le cas des pesticides, l'identité et la concentration de la ou des substances actives).

2.2.2. **Espèce d'expérience**

— Nom scientifique, race, âge approximatif (en semaines), méthode et date de collecte,

— informations sur les colonies dans lesquelles les abeilles ont été récoltées, en particulier l'état de santé, toute maladie des adultes, les prétraitements éventuels, etc.

2.2.3. **Conditions d'essai**

— Température et humidité relative de la salle d'expérience,

— conditions d'encagement, en particulier le type, la dimension et le matériau des cages,

— méthodes de préparation des solutions mères et des solutions d'essai (le solvant et sa concentration doivent être indiqués, le cas échéant),

— conception de l'essai, par exemple, nombre et niveau des concentrations d'essai appliquées, nombre de témoins; pour chaque concentration d'essai et témoin: nombre de cages et nombre d'abeilles par cage,

— date de l'essai.

▼B

2.2.4. **Résultats**

— Résultats d'une étude préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur, le cas échéant,

— données brutes: mortalité à chaque dose testée et à chaque temps d'observation.

— courbes dose/effet à la fin de l'essai,

— valeurs de la DL_{50} avec des limites de confiance de 95 %, à chaque temps d'observation recommandé, pour la substance d'essai et l'étalon de toxicité,

— méthodes statistiques utilisées pour calculer la DL_{50},

— mortalité chez les témoins,

— autres effets biologiques observes ou mesurés, par exemple, comportement anormal des abeilles (y compris rejet de la dose d'essai), vitesse de consommation de la nourriture dans les groupes traités et non traités,

— tout écart par rapport au protocole décrit ici et toute autre information utile.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265-267.

▼B

C.17. ABEILLE DOMESTIQUE — ESSAI DE TOXICITÉ AIGUË PAR CONTACT

1. MÉTHODE

La méthode décrite pour cet essai de toxicité aiguë reprend la ligne directrice nº 214 de l'OCDE (1998).

1.1. INTRODUCTION

Le présent essai de toxicité est une méthode d'essai en laboratoire destinée à évaluer la toxicité aiguë par contact des pesticides et d'autres produits chimiques pour des abeilles domestiques ouvrières adultes.

Lorsqu'on apprécie et évalue les caractéristiques toxiques d'une substance, il peut être nécessaire de déterminer sa toxicité aiguë par contact pour les abeilles domestiques, par exemple lorsque des abeilles risquent d'être exposées à cette substance. L'essai de toxicité aiguë par contact vise à déterminer la toxicité intrinsèque des pesticides et d'autres produits chimiques pour les abeilles. Les résultats de cet essai devraient être mis à profit pour établir la nécessité d'une évaluation plus poussée. Cette méthode peut être utilisée, en particulier, dans des programmes séquentiels destinés à évaluer les risques des pesticides pour les abeilles, selon la progression suivante: essais de toxicité en laboratoire, essais en conditions semi-naturelles et essais sur le terrain (1). Les pesticides peuvent être testés en tant que substances actives ou en tant que préparations chimiques.

Un étalon de toxicité doit être utilisé pour vérifier la sensibilité des abeilles et la précision du protocole d'essai.

1.2. DÉFINITIONS

Toxicité aiguë par contact: effets nocifs se produisant dans un délai maximal de 96 heures après l'application locale d'une dose unique de la substance d'essai.

Dose: quantité de substance d'essai appliquée. La dose est exprimée en masse (μg) de substance d'essai par animal testé (μg/abeille).

DL_{50} (dose létale 50 %) par contact: dose unique d'une substance, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 % des animaux lorsqu'elle est administrée par contact. La DL_{50} est exprimée en μg de substance d'essai par abeille. Pour les pesticides, la substance d'essai peut être une substance active ou une préparation chimique contenant une ou plusieurs substances actives.

Mortalité: un animal est noté comme mort lorsqu'il est complètement immobile.

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Des abeilles domestiques ouvrières adultes sont exposées à une gamme de doses de la substance d'essai dissoute dans un véhicule approprié, par application directe sur le thorax (aérosol). L'essai dure 48 heures. Si le taux de mortalité augmente entre 24 heures et 48 heures, alors que la mortalité des témoins reste à un niveau acceptable, c'est-à-dire ≤ 10 %, il convient de prolonger l'essai jusqu'à 96 heures au maximum. La mortalité est notée tous les jours et comparée avec les valeurs des témoins. On analyse les résultats afin de calculer la DL_{50} à 24 heures et à 48 heures et, au cas où l'étude est prolongée, à 72 heures et à 96 heures.

▼B

1.4. VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai repose sur les conditions suivantes:

— le taux moyen de mortalité de l'ensemble des témoins ne doit pas dépasser 10 % à la fin de l'essai,

— la DL_{50} de l'étalon de toxicité se trouve dans la gamme spécifiée.

1.5. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.5.1. **Collecte des abeilles**

Il convient d'utiliser de jeunes abeilles ouvrières adultes de la même race, autrement dit des abeilles du même âge, nourries de la même façon, etc. Elles doivent provenir de colonies saines, correctement nourries, dépourvues autant que possible d'individus malades, possédant une reine dans la ruche, et dont on connaît l'histoire et l'état physiologique. Elles peuvent être collectées le matin du jour où elles seront utilisées ou la veille au soir et gardées dans les conditions de l'essai jusqu'au jour suivant. Les abeilles récoltées sur des cadres dépourvus de couvain conviennent. Il faut éviter de collecter les abeilles au début du printemps ou à la fin de l'automne parce qu'elles subissent un changement physiologique à ces époques. Si les essais doivent être effectués au début du printemps ou à la fin de l'automne, on peut faire éclore les abeilles dans un incubateur et elles seront ensuite élevées pendant une semaine avec du pain d'abeille (pollen récolté sur les rayons) et une solution de saccharose. Les abeilles traitées avec des substances chimiques, telles que des antibiotiques, des antivarroa, etc., ne doivent pas être soumises à des essais de toxicité durant 4 semaines à partir de la fin du dernier traitement.

1.5.2. **Conditions d'encagement et d'alimentation**

On utilise des cages faciles à nettoyer et bien ventilées. Tout matériau approprié peut être employé, par exemple des cages en acier inoxydable, en toile métallique, en plastique, des cages jetables en bois, etc. La dimension des cages d'essai doit être adaptée au nombre d'abeilles, c'est-à-dire leur fournir un espace suffisant. Il est préférable de répartir les abeilles en groupes de dix par cage.

Les abeilles doivent être gardées à l'obscurité dans une salle d'expérience chauffée à 25 ± 2 ºC. L'humidité relative, généralement comprise entre 50 et 70 %, doit être enregistrée tout au long de l'essai. Les manipulations, et notamment le traitement et les observations, peuvent s'effectuer à la lumière (du jour). La nourriture se compose d'une solution de saccharose dans l'eau dont la concentration finale s'élève à 500 g/l (50 % en poids par unité de volume), fournie ad libitum durant toute la durée de l'essai à l'aide d'une mangeoire pour abeilles. Celle-ci peut consister en un tube de verre (d'environ 50 mm de long et 10 mm de large, dont le diamètre de l'extrémité ouverte est rétréci à environ 2 mm).

1.5.3. **Préparation des abeilles**

Les abeilles récoltées peuvent être anesthésiées avec du dioxyde de carbone ou de l'azote en vue de l'application de la substance d'essai. La quantité d'anesthésiant utilisée et la durée de l'exposition doivent être réduites au minimum. Les abeilles moribondes doivent être enlevées et remplacées par des abeilles saines avant le début de l'essai.

1.5.4. **Préparation des doses**

La substance d'essai doit être appliquée sous la forme de solution dans un véhicule, à savoir un solvant organique ou de l'eau avec un agent mouillant. Parmi les solvants organiques, on préfère l'acétone, mais d'autres solvants organiques peu toxiques pour les abeilles peuvent être utilisés (par exemple, le diméthylformamide, le diméthylsulfoxyde). Dans le cas des préparations chimiques dispersées dans l'eau et des substances organiques fortement polaires non solubles dans les solvants organiques, les solutions peuvent être plus faciles à appliquer si elles sont préparées dans une solution faible d'un agent mouillant commercial (par exemple, Agral, Citowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Des solutions témoins appropriées doivent être préparées, autrement dit, si un solvant ou un dispersant ont été employés pour solubiliser la substance d'essai, deux groupes de témoins doivent être utilisés, l'un étant traité avec de l'eau et l'autre avec le solvant ou le dispersant.

1.6. MODE OPÉRATOIRE

1.6.1. **Groupes testés et groupes témoins**

Le nombre de doses et de groupes d'essai testes par dose doit se prêter aux exigences statistiques de la détermination de la DL_{50}, avec des limites de confiance de 95 %. L'essai demande normalement cinq doses appartenant à une série géométrique dont le facteur n'excède pas 2,2 et qui englobe la DL_{50}. Toutefois, le nombre de doses doit être déterminé en fonction de la pente de la courbe de toxicité (dose en fonction de la mortalité) et en tenant rompre *de* la méthode statistique choisie pour analyser les résultats. Un test de détermination de l'ordre de grandeur permet de choisir les doses appropriées.

Il faut tester au moins 3 groupes d'essai identiques, comportant chacun 10 abeilles, par concentration d'essai.

Pas moins de 3 groupes témoins, comportant chacun 10 abeilles, devraient être testes parallèlement aux groupes traités. Si on utilise un solvant organique ou un agent mouillant, 3 groupes supplémentaires de 10 abeilles chacun doivent être inclus pour le solvant ou l'agent mouillant.

1.6.2. **Étalon de toxicité**

Un étalon de toxicité doit être testé parallèlement aux groupes traités. Il faut sélectionner au moins 3 doses afin d'englober la valeur supposée de la DL_{50}. Chaque dose doit être testée dans au moins 3 cages contenant chacune 10 abeilles. L'étalon de toxicité préféré est le diméthoate, dont la DL_{50} par contact après 24 heures se situe entre 0,10 et 0,30 µg de substance active/abeille (2). D'autres étalons de toxicité pourraient toutefois être acceptables, s'il existe suffisamment de données qui permettent de vérifier la relation dose/effet escomptée (par exemple, le parathion).

1.6.3. **Exposition**

1.6.3.1. *Administration des doses*

Les abeilles anesthésiées sont traitées individuellement par application locale. Les abeilles sont réparties au hasard entre les groupes traites aux différentes doses et les groupes témoins. Un volume de 1 µl de solution contenant la substance d'essai à la concentration appropriée doit être appliqué à l'aide d'un micro-applicateur sur la face dorsale du thorax de chaque abeille. D'autres volumes peuvent être utilisés si cela se justifie. Après l'application, les abeilles sont réparties entre les cages d'essai dans lesquelles on distribue une solution de saccharose.

1.6.3.2. *Durée*

L'essai dure 48 heures. Si la mortalité augmente de plus de 10 % entre 24 heures et 48 heures, la durée de l'essai doit être prolongée jusqu'à 96 heures, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 %.

▼B

1.6.4. **Observations**

La mortalité est relevée 4 heures après l'application de la dose, puis 24 heures et 48 heures après celle-ci. Si une période d'observation prolongée est requise, d'autres évaluations devront être pratiquées à des intervalles de 24 heures pendant 96 heures au maximum, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 %.

Tous les effets se traduisant par des anomalies du comportement pendant la période d'essai doivent être notés.

1.6.5. **Essai limite**

Dans certains cas (par exemple lorsqu'on s'attend à ce qu'une substance d'essai soit peu toxique), un essai limite peut être exécuté avec 100 µg de substance active/abeille afin de démontrer que la DL_{50} est supérieure à cette valeur. Le même protocole doit être appliqué, et notamment les 3 groupes d'essai identiques pour la dose testée, les témoins nécessaires et l'utilisation d'un étalon de toxicité. Si on constate une mortalité, il convient de mener une étude complète. Si on observe des effets sublétaux (voir point 1.6.4), il faut les noter.

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1. RÉSULTATS

Les résultats doivent être récapitulés sous la forme de tableaux, montrant pour chaque groupe traité avec la substance d'essai, ainsi que pour les témoins et les groupes traites avec l'étalon de toxicité, le nombre d'abeilles employé, la mortalité à chaque heure d'observation et le nombre d'abeilles présentant un comportement anormal. Les données de mortalité seront analysées par les méthodes statistiques appropriées (par exemple, la méthode des probits, la moyenne mobile, la probabilité binomiale) (3) (4). On trace les courbes dose-effet pour chaque moment d'observation recommandé (24 heures, 48 heures, et, si nécessaire, 72 heures, 96 heures) et on calcule les pentes des courbes et les doses létales 50 % (DL_{50}) avec des limites de confiance de 95 %. Les corrections relatives à la mortalité des témoins doivent s'effectuer selon la méthode d'Abbott (4) (5). La DL_{50} doit être exprimée en µg de substance d'essai par abeille.

2.2. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

2.2.1. **Substance d'essai**

— État physique et propriétés physico-chimiques pertinentes (par exemple, stabilité dans l'eau, pression de- vapeur),

— données relatives à l'identification chimique, notamment la formule structurale, la pureté (dans le cas des pesticides, l'identité et la concentration de la ou des substances actives).

2.2.2. **Espèce d'expérience**

— Nom scientifique, race, âge approximatif (en semaines), méthode et date de collecte,

— informations sur les colonies dans lesquelles les abeilles ont été récoltées, en particulier l'état de santé, toute maladie des adultes, les prétraitements éventuels, etc.

▼B

2.2.3. **Conditions d'essai**

— Température et humidité relative de la salle d'expérience,

— conditions d'encagement, en particulier le type, la dimension et le matériau des cages,

— modalités d'administration de la substance d'essai, par exemple, solvant utilisé, volume de solution d'essai appliqué, anesthésiants utilisés,

— conception de l'essai, par exemple, nombre et niveau des concentrations d'essai appliquées, nombre de témoins; pour chaque concentration d'essai et témoin: nombre de cages et nombre d'abeilles par cage,

— date de l'essai.

2.2.4. **Résultats**

— Résultats d'une étude préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur, le cas échéant,

— données brutes: mortalité à chaque concentration testée et à chaque temps d'observation,

— courbes dose/effet à la fin de l'essai,

— valeurs de la DL_{50} avec des limites de confiance de 95 %, à chaque temps d'observation recommandé, pour la substance d'essai et l'étalon de toxicité,

— méthodes statistiques utilisées pour calculer la DL_{50},

— mortalité chez les témoins,

— autres effets biologiques observés et toute réaction anormale des abeilles,

— tout écart par rapport au protocole décrit ici et toute autre information utile.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Cough, H. J., McIndoe, E. C, Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

▼B

C.18. DÉTERMINATION DE L'ADSORPTION/DÉSORPTION AU MOYEN DE LA MÉTHODE PAR AGITATION

1. MÉTHODE

La méthode décrite reprend la ligne directrice nº 106 de l'OCDE sur l'adsorption/désorption dans les sols fondée sur la méthode par agitation (2000).

1.1. INTRODUCTION

La méthode s'inspire d'un test circulaire, d'un séminaire sur la sélection des sols pour le développement d'un essai d'adsorption (1) (2) (3) (4) et de certaines lignes directrices nationales (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Les études d'adsorption/désorption donnent des informations précieuses sur la mobilité des substances chimiques et leur répartition dans les trois compartiments de la biosphère (lithosphère, hydrosphère, atmosphère) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Ces informations servent à prédire et à évaluer certaines caractéristiques d'une substance: la capacité de dégradation (22) (23), de transformation et d'absorption par les organismes (24), la lixiviation à travers le sol (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), la volatilité à partir du sol (21) (29) (30), le ruissellement à la surface du sol vers les eaux naturelles (18) (31) (32). Les données sur l'adsorption peuvent être utilisées à des fins de comparaison ou de modélisation (19) (33) (34) (35).

La distribution d'une substance chimique entre les phases solides et aqueuses est un processus complexe qui dépend d'un grand nombre de facteurs: nature chimique de la substance (12) (36) (37) (38) (39) (40), caractéristiques du sol (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49), mais aussi des conditions climatiques, telles que précipitations, température, ensoleillement, vent. La méthode présentée ici, qui est un modèle de laboratoire simplifié, ne permet pas d'expliquer entièrement les phénomènes et les mécanismes impliqués dans l'adsorption d'une substance chimique par le sol. Mais si elle n'est pas exhaustive, elle donne tout de même d'utiles informations sur les effets environnementaux de l'adsorption d'un produit chimique.

Voir également l'introduction générale.

1.2. OBJET DE LA MÉTHODE

La méthode vise à évaluer le comportement d'adsorption/désorption d'une substance dans les sols. Il s'agit d'obtenir une valeur de sorption permettant de prédire le partage d'une substance sous diverses conditions environnementales. Les coefficients d'adsorption à l'équilibre d'une substance chimique sur différents sols sont déterminés en fonction des caractéristiques du sol (par exemple, teneur en carbone organique, teneur en argile, texture, pH). Il faut utiliser plusieurs types de sols pour couvrir le plus grand nombre possible d'interactions d'une substance donnée avec des sols naturels.

La présente méthode considère l'adsorption comme la liaison d'une substance chimique à la surface des sols. Elle ne fait pas de distinction entre les différents processus d'adsorption (adsorption physique et chimique) et d'autres processus tels que la dégradation catalysée par la surface, l'adsorption de masse ou la réaction chimique. Elle ne tient pas compte de l'adsorption sur les particules colloïdales (diamètre < 0,2 μm) générées par les sols.

▼B

Les paramètres considérés comme les plus importants pour l'adsorption sont: la teneur en carbone organique (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), la teneur en argile, la texture (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48), le pH (pour les composés ionisables) (3) (4) (42). D'autres sont susceptibles d'avoir une incidence sur l'adsorption: la capacité d'échange cationique réelle (CECR), la teneur en fer amorphe et en oxydes d'aluminium, notamment dans le cas des sols volcaniques et tropicaux (4), ainsi que la surface spécifique (49).

L'essai permet d'évaluer l'adsorption d'une substance chimique sur des sols de texture et de pH différents et n'ayant pas la même teneur en carbone organique et en argile. Il comprend trois phases:

Phase 1: Étude préliminaire servant à déterminer:

— le rapport sol/solution,

— le temps d'équilibre de l'adsorption et la quantité de substance adsorbée à l'équilibre,

— l'adsorption de la substance sur la surface des récipients d'essai et la stabilité de la substance durant l'essai.

Phase 2: Essai de sélection: l'adsorption est étudiée sur cinq sols différents. On détermine la cinétique d'adsorption avec une concentration unique ainsi que le coefficient de distribution K_d et K_{oc}.

Phase 3: Détermination des isothermes d'adsorption de Freundlich: cet essai sert à évaluer l'effet de la concentration sur le degré d'adsorption sur les sols.

Étude de la désorption par l'évaluation de la cinétique et des isothermes de désorption de Freundlich (appendice 1).

1.3. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Symbole	Définition	Unités
A_{t_i}	pourcentage d'adsorption au temps t_i	%
A_{eq}	pourcentage d'adsorption à l'équilibre	%
$m_s^{ads}(t_i)$	masse de substance adsorbée sur le sol à l'instant t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	masse de substance adsorbée sur le sol durant l'intervalle de temps Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption	µg
m_0	masse de substance dans le tube au début de l'essai	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	masse de substance mesurée dans une aliquote (v_a^A) au temps t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption	µg
m_{soil}	quantité de phase de sol exprimée en masse sèche du sol	g

▼B

Symbole	Définition	Unités
C_{st}	concentration massique de la solution de réserve	µg cm^{-3}
C_0	concentration massique initiale de la solution en contact avec le sol	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	concentration massique de la substance dans la phase aqueuse au temps t_i, lorsque l'analyse est effectuée	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	concentration de la substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption	µg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption	µg cm^{-3}
V_0	volume initial de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai d'adsorption	cm^3
v_a^A	volume de l'aliquote dans laquelle la substance est mesurée	cm^3
K_d	coefficient de répartition de l'adsorption	cm^{-3} g^{-1}
K_{oc}	coefficient d'adsorption normalisé basé sur la teneur en carbone organique	cm^3 g^{-1}
K_{om}	coefficient de la répartition normalisé basé sur la teneur en matière organique	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	coefficient d'adsorption de Freundlich	$\mu g^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n} g^{-1}$
1/n	exposant de Freundlich	
D_{t_i}	pourcentage de désorption à l'instant t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	pourcentage de désorption durant l'intervalle de temps Δt_i	%
K_{des}	coefficient de désorption apparente	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	coefficient de désorption de Freundlich	$\mu g^{-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}$ g^1
$m_{aq}^{des}(t_i)$	masse de substance désorbée à partir du sol à l'instant t_j	µg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	masse de substance désorbée à partir du sol durant l'intervalle de temps Δt_i	µg
$m_m^{des}(eq)$	masse de substance déterminée par analyse dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	masse totale de substance désorbée à l'équilibre de désorption	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	masse de substance restant adsorbée sur le sol après l'intervalle de temps Δt_i	µg
m_{aq}^A	masse de substance résiduelle après atteinte de l'équilibre d'adsorption due à un volume de remplacement insuffisant	µg
$C_s^{des}(eq)$	concentration de la substance restant adsorbée dans le sol à l'équilibre de désorption	µg g^{-1}

▼B

Symbole	Définition	Unités
$C_{aq}^{des}(eq)$	concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption	µg cm^{-3}
V_T	volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle	cm^3
V_R	volume de surnageant extrait du tube après obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par un volume identique d'une solution de 0,01 M de $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	volume de l'aliquote extrait du tube (i) pour analyse lors de l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle	cm^3
V_r^i	volume de solution extrait du tube (i) afin de mesurer la substance lors de l'essai de cinétique de désorption (méthode parallèle)	cm^3
V_r^F	volume de solution extrait du tube afin de mesurer la substance à l'équilibre de désorption	cm^3
MB	bilan matière	%
m_t	masse totale de substance extraite en deux étapes du sol et des parois du tube d'essai	µg
V_{rec}	volume de surnageant récupéré après l'équilibre d'adsorption	cm^3
P_{ow}	coefficient de partage octanol/eau	
pKa	constante de dissociation	
S_w	solubilité dans l'eau	g l^{-1}

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Des volumes connus de la substance, non marquée ou radiologiquement marquée, mélangée à des concentrations connues de $CaCl_2$ 0,01 M, sont ajoutés à des échantillons de sol d'un poids sec connu, préalablement équilibrés dans du $CaCl_2$ 0,01 M. Le mélange est agité pendant le temps requis. Les particules du sol en suspension sont séparées par centrifugation et, le cas échéant, par filtration, puis la phase aqueuse est analysée. La quantité de substance adsorbée sur le sol correspond à la différence entre la quantité de substance initialement présente dans la solution et la quantité restant à la fin de l'expérience (méthode indirecte).

La quantité de substance adsorbée peut également être directement calculée par l'analyse du sol (méthode directe). Cette méthode, qui consiste à extraire progressivement le sol au moyen d'un solvant approprié, est recommandée lorsque l'on ne peut pas déterminer avec précision les écarts de concentration de la substance dans la solution, par exemple dans les cas suivants: adsorption de la substance sur la surface des tubes d'essai, instabilité de la substance au cours de l'expérience, faible adsorption modifiant peu la concentration de la substance dans la solution, forte adsorption entraînant une faible concentration ne pouvant être mesurée avec précision. L'utilisation d'une substance radioactivement marquée permet d'éviter d'extraire le sol. On analyse dans ce cas la phase du sol par combustion et comptage à scintillation liquide. Cette dernière méthode, non spécifique, ne permet cependant pas de distinguer les produits primaires des produits de transformation. Elle ne devrait donc être utilisée que si la substance à tester reste stable pendant toute la durée de l'étude.

▼B

1.5. INFORMATION SUR LA SUBSTANCE

Les réactifs chimiques doivent être purs. On recommande l'emploi de substances non marquées de composition connue et présentant de préférence un degré de pureté d'au moins 95 % ou de substances radioactivement marquées de composition connue et radioactivement pures. Il faut appliquer des corrections pour tenir compte de la désintégration lorsque l'on emploie des traceurs à demi-vie courte.

Les paramètres suivants doivent être connus avant de réaliser un essai d'adsorption/désorption:

a) solubilité dans l'eau (A.6);

b) pression de vapeur (A.4) et/ou constante de la loi de Henry;

c) dégradation non biologique: hydrolyse en fonction du pH (C.7);

d) coefficient de partage (A.8);

e) biodégradabilité facile (C.4) ou transformation aérobie et anaérobie dans le sol;

f) pKa des substances ionisables;

g) photolyse directe dans l'eau (c'est-à-dire spectre d'absorption UV-Vis dans l'eau, rendement quantique, par exemple) et photodégradation sur le sol.

1.6. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

L'essai est applicable aux substances chimiques pour lesquelles on dispose d'une méthode analytique suffisamment précise. La stabilité de la substance durant l'essai est un paramètre important qui peut influencer la fiabilité des résultats, notamment avec la méthode indirecte. Il faut donc vérifier la stabilité par une étude préliminaire. Si l'on observe une transformation durant l'essai, il est recommandé d'analyser le sol et les phases aqueuses lors de l'étude principale.

Des difficultés peuvent survenir avec des substances faiblement solubles dans l'eau ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}) ou avec des substances fortement chargées du fait que la concentration de la phase aqueuse ne peut pas être mesurée avec suffisamment de précision avec la méthode analytique. Il faut prendre d'autres mesures dans ces cas. Les moyens d'aborder ces problèmes sont traités dans les points correspondants.

Il faut veiller à éviter les pertes si l'on analyse des substances volatiles.

1.7. MODE OPÉRATOIRE

1.7.1. **Appareillage, réactifs chimiques**

Le laboratoire doit être équipé de l'équipement standard suivant:

a) tubes ou récipients d'essai. Il est important qu'ils soient:

— adaptés à la centrifugeuse afin de diminuer les erreurs de manipulation et de transfert,

— constitués d'un matériau inerte qui diminue l'adsorption de la substance sur les parois:

▼B

b) agitateur: agitateur vertical ou équipement équivalent: le sol doit être maintenu en suspension pendant l'agitation;

c) centrifugeuse: elle doit être de préférence à vitesse de rotation élevée (forces de centrifugation > 3 000 g, par exemple), à température contrôlée et capable d'éliminer de la solution aqueuse les particules d'un diamètre supérieur à 0,2 μm. Les récipients doivent être fermés durant l'agitation et la centrifugation afin d'éviter les pertes par volatilité et les pertes en eau; il est recommandé d'utiliser des couvercles désactivés (couvercles filetés recouverts de téflon, par exemple) afin de diminuer l'adsorption sur leur surface;

d) équipement facultatif; filtres stériles jetables d'une porosité de 0,2 μm. Le matériau filtrant doit être choisi avec soin afin d'éviter l'adsorption de la substance à sa surface; les filtres organiques sont déconseillés pour les substances peu solubles;

e) instrumentation analytique permettant de mesurer la concentration de la substance;

f) four de laboratoire permettant de maintenir une température de 103 à 110 °C.

1.7.2. **Caractérisation et sélection des sols**

Les sols doivent être caractérisés par les trois paramètres principalement responsables de la capacité d'adsorption: le carbone organique, la teneur en argile et la texture, le pH. Comme nous l'avons dit plus haut (voir le point «Objet de la méthode»), d'autres caractéristiques physico-chimiques peuvent influer sur l'adsorption/désorption d'une substance et elles doivent donc être prises en compte.

Les méthodes de caractérisation des sols revêtent une extrême importance car elles peuvent influencer les résultats de manière significative. Il est donc recommandé de mesurer le pH du sol dans une solution de $CaCl_2$, 0,01 M (la solution utilisée lors de l'essai d'adsorption/désorption) selon la méthode ISO correspondante (ISO 10390-1). Il est également conseillé de déterminer certaines autres propriétés du sol selon les méthodes standard (par exemple, manuel ISO de l'analyse des sols, «Handbook of Soil Analysis»). On peut ainsi faire reposer l'analyse des données relatives à la sorption sur des paramètres de sol harmonisés. La bibliographie donne quelques références de méthodes harmonisées d'analyse et de caractérisation des sols (50-52). L'utilisation de sols de référence est recommandée pour calibrer les méthodes d'essai des sols.

Le tableau 1 indique comment choisir les sols pour les essais d'adsorption/désorption. Les sept types de sols choisis se rencontrent dans des zones géographiques tempérées. Pour les substances ionisables, les sols sélectionnés doivent couvrir un large spectre de pH pour permettre d'évaluer l'adsorption de la substance sous sa forme ionisée et non ionisée. Le point 1.9 («Réalisation de l'essai») indique combien de sols différents doivent être utilisés durant les diverses phases de l'essai.

Si d'autres types de sols sont choisis, il faut les caractériser au moyen des mêmes paramètres et ils doivent présenter des propriétés aussi diverses que celles décrites dans le tableau 1, même s'ils ne remplissent pas tout à fait les critères.

▼B

Tableau 1

Aide à la sélection des échantillons de sol pour les essais d'adsorption/désorption

Type de sol	pH (dans le $CaCl_2$ 0,01 M)	Teneur en carbone organique (%)	Teneur en argile (%)	Texture du sol (1)
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65-80	argile
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20-40	limon argileux
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15-25	limons fins
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15-30	limon
5	< 4,0 - 6,0 (2)	< 0,5 - 1,5 (2) (3)	< 10-15 (2)	sable limoneux
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 (2) (3)	40-65	limon argileux/ argile
7	< 4,5	> 10	< 10	sable/sable glaiseux

(1) Selon la FAO et le système américain (85).
(2) Les valeurs des variables doivent être comprises de préférence dans les limites du spectre indiqué. En cas de difficulté à trouver un sol approprié, des valeurs inférieures au minimum indiqué sont acceptées.
(3) Les sols contenant moins de 0,3 % de carbone organique risquent de perturber la corrélation entre la teneur en carbone organique et l'adsorption. Il est donc recommandé d'utiliser des sols présentant une teneur supérieure à 0,3 %.

1.7.3. **Collecte et stockage des échantillons de sols**

1.7.3.1. *Collecte*

Aucune technique ou instrument d'échantillonnage particulier n'est recommandée; la technique d'échantillonnage dépend des objectifs de l'étude (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Il convient de considérer les aspects suivants:

a) il faut disposer d'informations détaillées sur le site d'essai: localisation, couverture végétale, traitement aux pesticides et/ou aux engrais, adjuvants biologiques ou contamination accidentelle. Le site doit être décrit selon les recommandations de la norme ISO sur l'échantillonnage des sols (ISO 10381-6);

b) le site d'échantillonnage doit être défini par l'UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) ou par des coordonnées géographiques, de manière à pouvoir reconnaître ultérieure ment un sol particulier ou à définir un sol en fonction des divers systèmes de classification utilisés dans les différents pays. Il est également recommandé de prélever dans l'horizon A jusqu'à une profondeur maximale de 20 cm. Si un horizon O_h est présent dans le sol n° 7 en particulier, il doit être inclus dans l'échantillon.

Les échantillons sont transportés dans des conteneurs et dans des conditions thermiques propres à préserver au mieux les propriétés initiales du sol.

▼B

1.7.3.2. *Stockage*

Il est préférable d'utiliser des sols fraîchement prélevés. Si cela n'est pas possible, le sol peut être stocke à la température ambiante et maintenu au sec. Aucun temps de stockage maximal n'est recommandé, mais au-delà de trois ans, les sols doivent être à nouveau analyses avant l'emploi afin de vérifier leur teneur en carbone-organique, leur pH et leur CEC.

1.7.3.3. *Manipulation et préparation des échantillons d'essai*

Les sols sont séchés à l'air à la température ambiante (de préférence entre 20 et 25 ºC). Ils sont désagrégés en appliquant des forces minimes de manière à modifier aussi peu que possible la texture originale, puis tamises pour ne conserver que les particules ≤ 2 mm. Le tamisage doit respecter les recommandations de la norme ISO sur l'échantillonnage des sols (ISO 10381-6). Une bonne homogénéisation est recommandée car elle améliore la reproductibilité des résultats. La teneur en eau de chaque sol est déterminée à partir de trois aliquotes par un réchauffement à 105 ºC jusqu'à stabilisation du poids (environ 12 heures). Pour tous les calculs, la masse du sol se réfère à la masse sèche à l'étuve, c'est-à-dire au poids de sol diminué de la teneur en eau.

1.7.4. **Préparation de la substance d'essai devant être appliquée sur le sol**

La substance d'essai est dissoute dans une solution de $CaCl_2$ 0,01 M dans de l'eau distillée ou désionisée; la solution de $CaCl_2$ est utilisée comme solvant aqueux pour améliorer la centrifugation et diminuer les échanges de cations. La concentration de la solution mère doit être supérieure de 3 ordres de grandeur à la limite de détection de la méthode d'analyse utilisée. Ce seuil permet de faire des mesures précises avec la méthodologie employée lors de l'essai. Enfin, la concentration de la solution de réserve doit être inférieure à la solubilité dans l'eau de la substance.

Il est conseillé de préparer la solution de réserve immédiatement avant de l'appliquer sur le sol et de la conserver dans un récipient hermétique à l'abri de la lumière à une température de 4 ºC. La durée de stockage dépend de la stabilité de la substance et de sa concentration dans la solution.

Un agent solubilisant peut être utilisé pour les substances peu solubles ($S_w < 10^{4}$ g l^{-1}) qui se dissolvent difficilement. Il doit être miscible avec l'eau, comme le méthanol ou l'acétonitrile: sa concentration ne doit pas dépasser 1 % du volume total de la solution de réserve et elle doit être inférieure à celle de la substance dans la solution qui entrera en contact avec le sol (de préférence moins de 0,1 %); il ne doit pas être un surfactant ou subir des réactions solvolytiques avec la substance d'essai. Le procès-verbal d'essai doit indiquer qu'un tel agent a été employé et en donner les raisons.

Un autre moyen de traiter les substances peu solubles consiste à introduire la substance d'essai dans le système d'essai à l'aide d'un solvant auxiliaire: la substance est dissoute dans un solvant organique, dont une fraction est ajoutée au système constitué par le sol et par une solution 0,01 M de $CaCl_2$ dans de l'eau distillée ou désionisée. La concentration du solvant organique dans la phase aqueuse devrait être aussi faible que possible et ne pas excéder en principe 0,1 %. L'expérimentateur devra toutefois tenir compte du fait que l'introduction de la substance à l'aide d'une solution organique est susceptible de nuire à la reproductibilité des volumes. La concentration de la substance d'essai et du solvant auxiliaire risquent donc de varier légèrement entre les essais et d'introduire une erreur supplémentaire.

▼B

1.8. CONDITIONS PRÉALABLES À LA RÉALISATION DE L'ESSAI D'ADSORPTION/DÉSORPTION

1.8.1. **Méthode analytique**

Un certain nombre de paramètres peuvent influencer la précision des mesures: la précision de la méthode d'analyse de la solution et des phases adsorbées, la stabilité et la pureté de la substance, le temps pour atteindre l'équilibre de sorption, l'étendue des variations de concentration de la solution, le rapport sol/solution et les modifications de la structure du sol au cours du processus d'équilibrage (35) (59-62). L'appendice 2 donne quelques exemples à ce propos.

La fiabilité de la méthode d'analyse doit être vérifiée selon la gamme de concentration susceptible d'être celle rencontrée durant l'essai. L'expérimentateur est libre d'élaborer une méthode appropriée présentant toutes les qualités requises en matière de précision, d'exactitude, de reproductibilité, de limites de détection et de récupération. L'expérience ci-dessous montre comment effectuer un tel essai.

Un volume approprié de $CaCl_2$, 0,01 M (100 cm^3, par exemple), est agité pendant 4 heures avec un certain poids de sol (20 g, par exemple) hautement adsorbant, c'est-à-dire riche en carbone organique et en argile. Le poids et le volume varient selon les besoins de l'analyse mais un rapport sol/solution de 1:5 constitue un bon point de départ. Le mélange est centrifugé et la phase aqueuse filtrée. Une partie de la solution de réserve de la substance est ajoutée à cette dernière afin d'obtenir une concentration nominale comprise dans la gamme de concentration correspondant à celle de l'essai. Ce volume ne doit pas excéder 10 % du volume final de la phase aqueuse afin de modifier aussi peu que possible la nature de la solution de prééquilibrage. La solution est ensuite analysée.

Un témoin constitué du système du sol et de la solution de $CaCl_2$ (sans substance d'essai) doit être ajouté afin de vérifier les artéfacts de la méthode d'analyse et les effets de matrice induits par le sol.

La chromatographie gaz-liquide (CGL), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la spectrométrie (CG/spectrométrie de masse, HPLC/spectrométrie de masse) et le comptage à scintillation liquide (pour les substances radiologiquement marquées) figurent parmi les méthodes de mesure de la sorption. Un taux de récupération de 90 à 110 % de la valeur nominale est jugé satisfaisant quelle que soit la méthode d'analyse utilisée. La limite de détection de la méthode d'analyse doit être d'au moins de deux ordres de grandeur inférieure à la concentration nominale afin de permettre la détection et l'évaluation une fois que le partage est effectué.

Les caractéristiques et la limite de détection de la méthode utilisée pour effectuer les études d'adsorption déterminent les conditions d'essai et les résultats expérimentaux. La méthode présentée ici suit un protocole expérimental général et propose des solutions de rechange lorsque la méthode analytique ou les équipements de laboratoire imposent des limites.

▼B

1.8.2. **Choix de rapports sol/solution optimaux**

Les rapports sol/solution appropriés à l'étude de la sorption sont choisis en fonction du coefficient de répartition K_d et du degré relatif d'adsorption souhaité. Le changement de la concentration de la substance dans la solution détermine la précision statistique de la mesure, fondée sur la forme de l'équation d'adsorption et sur la limite de la méthode d'analyse, ainsi que l'exactitude avec laquelle elle permettra de détecter la substance contenue dans la solution. Il est donc utile de déterminer plusieurs rapports fixes présentant un pourcentage adsorbé supérieur à 20 % ou, de préférence, à 50 % (62), tout en veillant a ce que la concentration de la substance dans la phase aqueuse reste suffisamment élevée pour pouvoir être mesurée avec précision, notamment lorsque les pourcentages d'adsorption sont importants.

Une solution pratique consiste à choisir les rapports sol/solution en estimant la valeur du coefficient de répartition K_d lors d'études préliminaires ou par des techniques d'estimation bien établies (voir l'appendice 3). On peut ensuite porter sur un graphique le rapport sol/solution en fonction du coefficient de distribution pour différents pourcentages fixes d'adsorption (figure 1). Dans le graphique ci-dessous, on estime que l'équation d'adsorption est linéaire ([1]). La relation est obtenue en réécrivant l'équation 4 du K_d sous la forme suivante 1:

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

ou sous sa forme logarithmique, en supposant que $R = m_{soil}/V_0$ et $A_{eq}\ \%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)}\right] \qquad (2)$$

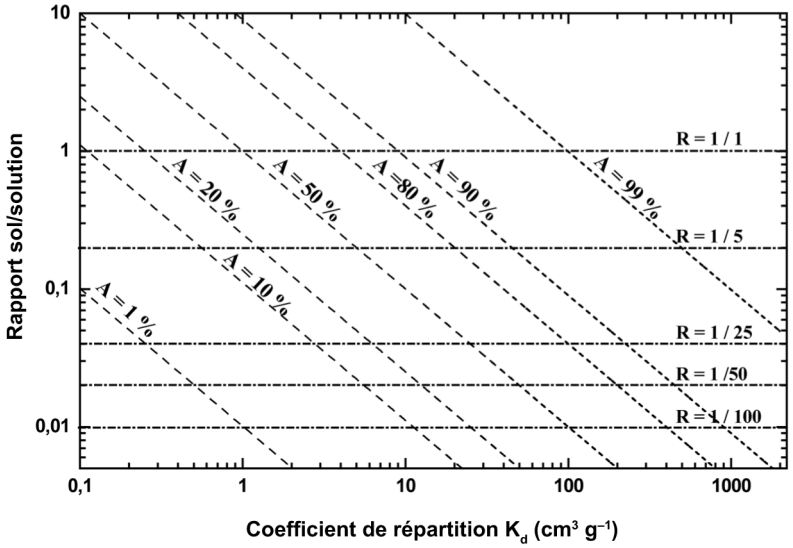


Figure 1. Relation entre les rapports sol/solution et K_d pour différents pourcentages d'adsorption de la substance

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$

▼B

La figure 1 montre le rapport sol/solution requis en fonction de K_d pour divers niveaux d'adsorption. Par exemple, avec un rapport sol/solution de 1:5 et un K_d de 20, l'adsorption serait de 80 % environ. Pour obtenir un pourcentage d'adsorption de 50 % avec le même K_d, il faudrait un rapport de 1:25. Cette méthode souple permet de choisir les rapports sol/solution en fonction des besoins de l'expérience.

Les zones où la substance est très fortement ou très légèrement adsorbée sont plus difficiles à maîtriser. En cas de faible absorption, un rapport sol/solution de 1:1 est recommandé, mais des ratios plus faibles peuvent être nécessaires avec certains types de sols très organiques afin d'obtenir une boue. Avec la méthode analytique, il faut veiller à mesurer les légères variations de concentration de la substance, faute de quoi la mesure d'adsorption sera inexacte. Avec un coefficient de distribution K_d très élevé, on peut aller jusqu'à un rapport de 1:100 de manière à conserver une quantité importante de substance en solution. Il faut cependant bien mélanger et donner au système le temps de s'équilibrer. On peut aussi prédire la valeur Kj au moyen de techniques d'estimation fondées par exemple sur la valeur P_{ow} (voir l'appendice 3). Cette méthode peut être utile pour les substances chimiques polaires ou faiblement adsorbées ayant un $P_{ow} < 20$ et pour les substances lipophiles ou fortement sorbantes dotées d'un $P_{ow} > 10^4$.

1.9. RÉALISATION DE L'ESSAI

1.9.1. **Conditions de l'essai**

Les essais sont réalisés à température ambiante et, si possible, à une température constante comprise entre 20 et 25 °C.

La centrifugation doit permettre d'éliminer de la solution les particules supérieures à 0,2 µm. Cette valeur correspond à la plus petite particule considérée comme une particule solide et constitue la limite entre les particules solides et les colloïdes. L'appendice 4 explique comment déterminer les paramètres de la centrifugation.

Si l'équipement de centrifugation ne permet pas d'éliminer à coup sûr les particules supérieures à 0,2 µm, on peut combiner la centrifugation et la filtration avec des filtres de 0,2 µm. Ces filtres doivent être fabriqués en matériau inerte afin d'éviter les pertes de substance. Il faut dans tous les cas apporter la preuve qu'il n'y a aucune perte de substance au cours de la filtration.

1.9.2. **Phase 1 — Étude préliminaire**

Le but de l'étude préliminaire a déjà été expliqué dans le point «Objet de la méthode». La réalisation de l'essai est exposée ci-après.

1.9.2.1. *Sélection de rapports sol/solution optimaux*

On utilise deux types de sols et trois rapports sol/solution (six essais). Un sol a une teneur en carbone organique élevée et une faible teneur en argile, l'autre une faible teneur en carbone organique et une teneur élevée en argile. Les rapports suivants sont proposés:

— 50 g de sol et 50 cm^3 de solution aqueuse de la substance d'essai (rapport 1:1),

▼B

— 10 g de sol et 50 cm^3 de solution aqueuse de la substance d'essai (rapport 1:5),

— 2 g de sol et 50 cm^3 de solution aqueuse de la substance d'essai (rapport 1:25).

La quantité minimale de sol qui va servir à l'expérience dépend de l'équipement de laboratoire dont on dispose et des performances des méthodes analytiques utilisées. Il est cependant recommandé d'utiliser au moins 1 g, de préférence 2 g, afin d'obtenir des résultats d'essai fiables.

Un échantillon de contrôle contenant uniquement la substance d'essai dans une solution de $CaCl_2$ 0,01 M (sans sol) est soumise exactement aux mêmes opérations que le système d'essai afin de vérifier la stabilité de la substance dans une solution de $CaCl_2$ et son adsorption éventuelle à la surface des récipients d'essai.

Un témoin par sol contenant la même quantité de sol dans un volume total de 50 cm^3 de solution de $CaCl_2$ 0,01 M (sans substance) est soumis à la même procédure d'essai. Il permet de détecter les substances étrangères ou les sols contaminés.

Tous les essais, contrôles et témoins sont réalisés au moins en double. Le nombre total d'échantillons devant être préparés pour l'étude est calculé selon la méthode suivie.

L'étude préliminaire et l'étude principale reposent sur les mêmes méthodes, sauf indication contraire.

Les échantillons de sols séchés à l'air sont mélangés à un volume minimal de 45 cm^3 de $CaCl_2$ 0,01 M et agités pendant 12 heures la nuit précédant l'expérience. On y ajoute par la suite de la solution de réserve de la substance d'essai afin d'obtenir un volume final de 50 cm^3. Ce volume ajouté ne doit pas excéder 10 % du volume final de la phase aqueuse (50 cm^3) afin de modifier aussi peu que possible la nature de la solution de prééquilibrage. Par ailleurs, la concentration initiale de la substance d'essai en contact avec le sol (C_0) doit être supérieure d'au moins deux ordres de grandeur à la limite de détection de la méthode analytique. Ce seuil permet d'obtenir des mesures fiables, même en cas d'adsorption élevée (> 90 %) et de déterminer ultérieurement les isothermes d'adsorption. La concentration (C_0) de la substance initiale ne devrait pas non plus excéder la moitié de sa limite de solubilité.

Voici comment calculer la concentration de la solution de réserve (C_M). Si la limite de détection est de 0,01 $\mu g\ cm^{-3}$ et l'adsorption de 90 %, la concentration initiale de la substance en contact avec le sol sera de préférence de 1 $\mu g\ cm^{-3}$ (soit de deux ordres de grandeur plus élevée que celle de la limite de détection). En supposant que l'on ajoute le volume maximal recommandé de la solution de réserve, soit 5 cm^3, aux 45 cm^3 de la solution d'équilibrage de $CaCl_2$ 0,01 M (c'est-à-dire 10 % de la solution de réserve au volume total de la phase aqueuse), la concentration de la solution de réserve sera de 10 $\mu g\ cm^{-3}$, ce qui est de trois ordres de grandeur supérieur à la limite de détection de la méthode analytique.

Il faut mesurer le pH de la phase aqueuse avant et après le contact avec le sol, compte tenu de son rôle dans le processus d'adsorption, notamment dans le cas des substances ionisables.

▼B

Le mélange est agité jusqu'à ce que le point d'équilibre soit atteint. Le temps d'équilibre dans les sols est très variable. Il dépend du produit chimique et du sol. Une période de 24 heures est généralement suffisante (77). Lors de l'étude préliminaire, des échantillons peuvent être prélevés de manière séquentielle pendant une période de mélange de 48 heures (à la 4e, 8e, 24e et 48e heure, par exemple). Les temps d'analyse ne sont pas rigides et doivent être considérés en fonction du programme de travail du laboratoire.

La substance dans la solution aqueuse peut être mesurée par la méthode parallèle ou par la méthode séquentielle. La méthode parallèle est plus difficile à réaliser sur le plan expérimental mais le traitement mathématique des résultats est plus simple (voir l'appendice 5). Le choix de la méthode est laissée à l'appréciation de l'expérimentateur, qui décide en fonction des équipements de laboratoire et des ressources disponibles.

a) Méthode parallèle: on prépare des échantillons avec un rapport sol/solution identique, leur nombre étant égal aux intervalles de temps auxquels on souhaite étudier la cinétique d'adsorption. Après centrifugation et, le cas échéant, filtration, la phase aqueuse du premier tube est récupérée aussi complètement que possible et mesurée au bout de 4 heures, par exemple, celle du deuxième tube au bout de 8 heures, celle du troisième au bout de 24 heures, etc.

b) Méthode séquentielle: on prépare uniquement un double échantillon pour chaque rapport sol/solution. Le mélange est centrifugé à des intervalles de temps définis afin de séparer les phases. Une petite aliquote de la phase aqueuse est immédiatement analysée afin de rechercher la substance, puis l'expérience se poursuit avec le mélange original. S'il y a filtration après centrifugation, le laboratoire doit disposer d'équipements permettant de filtrer de petites aliquotes en phase aqueuse. Le volume total des aliquotes ne devrait pas dépasser 1 % du volume total de la solution afin de ne pas modifier de manière significative le rapport sol/ solution et de diminuer la masse de soluté susceptible d'être adsorbée durant l'essai.

Le pourcentage d'adsorption A_{t_i} est calculé à chaque instant (t_j) sur la base de la concentration initiale nominale et de la concentration mesurée au temps d'échantillonnage (t_i), corrigé de la valeur du témoin. Des graphes A_{t_i} représentant en fonction du temps (figure 1, appendice 5) sont tracés afin de savoir à quel moment le plateau d'équilibre est atteint ([1]). On calcule également la valeur K_d à l'équilibre. On choisit à partir de cette valeur le rapport sol/solution approprié de la figure 1, de manière que le pourcentage d'adsorption dépasse 20 % et, de préférence, 50 % (61). Les équations et les principes relatifs au tracé sont exposés au point «Présentation des données» ainsi qu'à l'appendice 5.

1.9.2.2. *Détermination du temps d'adsorption et de la quantité de substance adsorbée à l'équilibre*

Comme nous l'avons déjà dit, le graphe représentant A_{t_i} ou C_{aq}^{ads} en fonction du temps permet d'estimer l'adsorption et la quantité de substance adsorbée à l'équilibre (voir les figures 1 et 2 de l'appendice 5). Le temps d'équilibre correspond au temps que le système met pour atteindre un plateau.

([1]) On peut également utiliser des graphiques de concentration de la substance en phase aqueuse (C_{aq}^{ads}) en fonction du temps pour estimer l'obtention du plateau d'équilibre (voir la figure 2 de l'appendice 5).

▼B

L'absence de plateau ou l'accroissement progressif de la courbe peut être dû à des facteurs complexes tels que b. biodégradation ou une diffusion lente. La biodégradation peut être mise en évidence en répétant l'expérience avec un échantillon de sol stérile. Si aucun plateau n'est atteint même dans ce cas, l'expérimentateur doit chercher d'autres causes inhérentes à l'étude. Il peut par exemple modifier les conditions de l'essai (température, temps d'agitation, rapport sol/solution). Lui seul décide de poursuivre la procédure d'essai, même s'il court le risque de ne pas atteindre un équilibre.

1.9.2.3. *Adsorption sur les parois du récipient et stabilité de la substance*

L'analyse des échantillons de contrôle peut fournir quelques informations sur l'adsorption de la substance sur les parois des récipients d'essai ainsi que sur sa stabilité. Une déplétion supérieure à l'écart type de la méthode analytique peut être due à une dégradation abiotique et/ou à l'adsorption sur les parois du récipient. On peut individualiser l'un ou l'autre de ces phénomènes en lavant soigneusement les parois du récipient avec un volume connu de solvant, puis en recherchant la substance dans la solution de lavage. L'absence d'adsorption sur les parois du récipient prouve l'instabilité abiotique de la substance. En cas d'adsorption, en revanche, il convient de modifier le matériau du récipient d'essai. Ces données sur l'adsorption sur les parois des récipients d'essai ne peuvent cependant pas être directement extrapolées à l'essai sol/solution, dans la mesure où la présence de sol modifie l'adsorption.

On peut obtenir des informations supplémentaires sur la stabilité de la substance d'essai en déterminant le bilan matière dans le temps. La substance est recherchée dans la phase aqueuse, dans les extraits de sol et sur les parois des récipients d'essai. La différence entre la masse de la substance ajoutée et la somme des masses de substance présentes dans la phase aqueuse, les extraits de sol et sur les parois des récipients correspond à la masse dégradée, volatilisée et/ou non extraite. Pour effectuer un bilan matière, l'équilibre d'adsorption doit être atteint durant l'essai.

Le bilan matière est effectué sur les deux sols et avec un rapport sol/solution par sol générant une déplétion à l'équilibre supérieure à 20 % et, de préférence, à 50 %. Une fois que l'essai consistant à trouver le rapport sol/solution est terminé (analyse du dernier échantillon de phase aqueuse au bout de 48 heures), les phases sont séparées par centrifugation et, le cas échéant, par filtration. Le maximum de phase aqueuse est récupérée puis un solvant d'extraction approprié (c'est-à-dire doté d'un coefficient d'extraction d'au moins 95 %) est ajouté au sol afin d'extraire la substance. Deux extractions successives au moins sont recommandées. On détermine ensuite la quantité de substance présente dans les extraits de sol et dans le récipient afin de calculer le bilan matière (équation 10 du chapitre «Présentation des données»). S'il est inférieur à 90 %, la substance est jugée instable durant la durée de l'essai. Les études peuvent être cependant poursuivies en tenant compte de cette instabilité. Il est conseillé dans ce cas d'analyser les deux phases lors de l'étude principale.

▼B

1.9.2.4 *Phase 2 — Cinétique d'adsorption avec une concentration unique de substance*

Cinq sols choisis dans le tableau 1 sont utilisés à cet effet. On a intérêt à y inclure tout ou partie des sols utilisés dans l'étude préliminaire. Dans ce cas, ils ne sont pas soumis aux essais de la phase 2.

Le temps d'équilibrage, le rapport sol/solution, le poids de l'échantillon de sol, le volume de la phase aqueuse en contact avec le sol et la concentration de la substance d'essai dans la solution sont choisis en fonction des résultats de l'étude préliminaire. L'analyse doit être effectuée de préférence après un temps de contact de 2, 4, 6, 8 (éventuellement 10) et 24 heures. Le temps d'agitation peut être étendu à 48 heures maximum lorsque les résultats sur le rapport sol/solution font ressortir un temps d'équilibrage plus long. Les temps d'analyse doivent être considérés avec une certaine souplesse.

Chaque expérience (un sol et une solution) est effectuée au moins en double afin d'évaluer la variance des résultats. Un témoin est préparé pour chacune d'elle avec du sol et de la solution de $CaCl_2$ 0,01 M, sans substance d'essai, d'un poids et d'un volume identiques aux échantillons d'essai. Un échantillon de contrôle préparé uniquement à partir de la substance d'essai contenue dans une solution de $CaCl_2$ 0,01 M (sans sol) est soumis à la même procédure d'essai afin de se prémunir contre l'imprévu.

Le pourcentage d'adsorption est calculé à chaque instant A_{t_i} et/ou intervalle de temps $A_{\Delta t_i}$ (selon les besoins). Il est porté sur un graphe en fonction du temps. Le coefficient de distribution K_d à l'équilibre ainsi que le coefficient d'adsorption normalisé basé sur la teneur en carbone organique K_{oc} (pour les substances chimiques non polaires) sont également calculés.

Résultats de l'essai de cinétique d'adsorption

La valeur linéaire K_d, qui exprime la mobilité inhérente des substances chimiques dans le sol, est généralement suffisamment précise pour décrire le comportement de sorption du sol (35)(78). Les substances chimiques dont K_d est ≤ 1 cm^3 g^{-1} sont en général considérées comme étant mobiles. Mac Gall et coll. ont élaboré un système de classification de la mobilité fondé sur les valeurs K_{oc} (16). Il existe également des systèmes de classification de la lixiviation fondés sur la relation entre K_{oc} et DT-50 ([1]) (32) (79).

Selon les études d'analyse d'erreurs (61), les valeurs K_d inférieures à 0,3 cm^3 g^{-1} ne peuvent pas être estimées avec précision à partir d'une diminution de la concentration dans la phase aqueuse, même si l'on applique le rapport sol/solution le plus favorable (sur le plan de la précision), c'est-à-dire 1:1. Dans ce cas, l'analyse des deux phases (sol et solution) est recommandée.

([1]) DT-50: temps de dégradation de 50 % de la substance d'essai.

▼B

En ce qui concerne les remarques précédentes, il est conseillé de poursuivre l'étude du comportement de sorption d'un produit chimique dans le sol et de sa mobilité potentielle en déterminant les isothermes d'adsorption de Freundlich des systèmes dont on peut déterminer précisément K_d grâce au protocole expérimental suivi dans la présente méthode. Il suffit pour cela que la valeur obtenue en multipliant K_d avec le rapport sol/solution soit > 0,3 — lorsque les mesures reposent sur la baisse de concentration de la phase aqueuse (méthode indirecte) — ou > 0,1 lorsque les deux phases sont analysées (méthode directe) (61).

1.9.2.5 *Phase 3 — Isothermes d'adsorption, cinétique de désorption et isothermes de désorption*

1.9.2.5.1 Isothermes d'adsorption

On utilise cinq concentrations de substances d'essai couvrant de préférence deux ordres de grandeur. La solubilité dans l'eau et les concentrations à l'équilibre de la phase aqueuse qui en résultent sont prises en compte lors du choix de ces concentrations. Il convient de garder le même rapport sol/solution par sol tout au long de l'étude. L'essai d'adsorption est effectué selon la description ci-dessus, à la différence près que la phase aqueuse est analysée une seule fois, au moment où le point d'équilibre déterminé au cours de la phase 2 est atteint. Les concentrations à l'équilibre dans la solution sont déterminées et la quantité adsorbée est calculée à partir de la déplétion de la substance dans la solution ou avec la méthode directe. La masse adsorbée par unité de masse de sol est portée sur un graphe en fonction de la concentration à l'équilibre de la substance (voir le chapitre «Présentation des données»).

Résultats de l'essai relatif aux isothermes d'adsorption

De tous les modèles mathématiques d'adsorption proposés jusqu'à présent, l'isotherme de Freundlich est le plus fréquemment utilisé pour décrire les processus d'adsorption. On peut trouver de plus amples informations sur l'interprétation et l'importance des modèles d'adsorption dans la bibliographie (41) (45) (80) (81) (82).

Remarque: il est bon de mentionner qu'une comparaison des valeurs K_F (coefficient d'adsorption de Freundlich) de différentes substances n'est possible que si ces valeurs sont exprimées en unités identiques (83).

1.9.2.5.2 Cinétique de désorption

Cet essai vise à évaluer le caractère réversible ou irréversible de l'adsorption d'une substance sur un sol. C'est une information importante dans la mesure où le processus de désorption joue un rôle non négligeable dans le comportement d'une substance chimique dans un sol. Ces données sur la désorption peuvent également servir à élaborer des modèles informatisés de simulation du lessivage et de l'écoulement des substances dissoutes. Si l'on souhaite effectuer une étude de désorption, il est conseillé d'effectuer l'étude ci-après pour tous les systèmes dont on aura pu déterminer Kd au cours de l'essai sur la cinétique d'adsorption précédent.

Comme pour l'étude sur la cinétique d'adsorption, l'essai sur la cinétique de désorption peut se faire selon la méthode parallèle ou la méthode séquentielle. Le choix de la méthode est laissé à l'appréciation de l'expérimentateur, qui devra considérer les disponibilités en équipements de laboratoire et en ressources.

▼B

a) méthode parallèle: on prépare, pour chaque sol inclus dans l'étude de désorption, des échantillons ayant un rapport sol/solution identique, leur nombre étant égal aux intervalles de temps auxquels on souhaite étudier la cinétique de désorption. Il est préférable d'utiliser les mêmes intervalles de temps que pour l'étude sur la cinétique d'adsorption. Le temps total peut cependant être étendu de manière que le système parvienne à l'équilibre de désorption. On prépare un témoin pour chaque expérience (un sol, une solution) à partir de sol et d'une solution de $CaCl_2$ 0,01 M (sans substance d'essai), d'un poids et d'un volume identiques à ceux de l'expérience. La substance d'essai dans une solution de $CaCl_2$ 0,01 M (sans sol) est soumise à la même procédure d'essai en tant qu'échantillon de contrôle. Tous les mélanges sol/solution sont agités jusqu'à l'équilibre d'adsorption (tel qu'il a été déterminé dans la phase 2). Les phases sont ensuite séparées par centrifugation et les phases aqueuses sont extraites le plus complètement possible. Le volume de solution extrait est remplacé par un volume égal de $CaCl_2$ 0,01 M ne contenant pas de substance d'essai et ces mélanges sont à nouveau agités. La phase aqueuse du premier tube est récupérée le plus complètement possible puis mesurée après 2 h, par exemple, celle du deuxième tube après 4 h, celle du troisième après 6 h, etc., jusqu'à ce que l'équilibre de désorption soit atteint.

b) méthode séquentielle: après l'essai de cinétique d'adsorption, le mélange est centrifugé et la phase aqueuse est extraite le plus complètement possible. Le volume de solution extrait est remplacé par un volume égal de $CaCl_2$ 0,01 M sans substance d'essai. Ce mélange est agité jusqu'à ce que l'équilibre de désorption soit atteint. Pendant ce temps, le mélange est centrifugé à des intervalles de temps définis afin de séparer les phases. Une petite aliquote de la phase aqueuse est immédiatement analysée afin de rechercher la substance d'essai, puis on poursuit l'expérience avec le mélange original. Le volume de chaque aliquote ne devrait pas dépasser 1 % du volume total. La même quantité de solution fraîche de $CaCl_2$ 0,01 M est ajoutée au mélange afin de maintenir le rapport sol/solution, puis celui-ci est agité jusqu'au prochain intervalle de temps.

Le pourcentage de désorption est calculé à chaque temps ((D_{t_i})) et/ou intervalle de temps ($(D_{\Delta t_i})$) (selon les besoins de l'étude), puis il est porté sur un graphique en fonction du temps. Le coefficient de désorption K_{des} à l'équilibre est également calculé. Toutes les équations applicables sont données dans le chapitre «Présentation des données» de l'annexe 5.

Résultats de l'essai de cinétique de désorption

L'inscription sur un même graphe du pourcentage de désorption D_{t_i} et d'adsorption A_{t_i} en fonction du temps permet d'estimer la réversibilité du processus d'adsorption. L'adsorption est jugée réversible si l'équilibre de désorption est atteint avant le double de temps nécessaire à l'équilibre d'adsorption et si la désorption totale est supérieure à 75 % de la quantité adsorbée.

1.9.2.5.3 Isothermes de désorption

Les isothermes de désorption de Freundlich sont déterminés sur les sols utilisés lors de l'expérience relative aux isothermes d'adsorption. L'essai de désorption est réalisé selon les modalités décrites dans le chapitre «Cinétique de désorption», à la différence près que la phase aqueuse n'est analysée qu'une fois, à l'équilibre de désorption. On calcule ensuite la quantité de substance désorbée. La quantité de substance restant adsorbée sur le sol à l'équilibre de désorption est portée sur un graphe en fonction de la concentration d'équilibre de la substance d'essai en solution (voir le chapitre «Présentation des données» et l'annexe 5).

▼B

2. **PRÉSENTATION DES DONNÉES**

Les données analytiques sont présentées sous forme de tableaux (voir l'annexe 6) dans lesquels figurent les mesures et les moyennes calculées. Les isothermes d'adsorption sont représentés sous forme de graphiques. Les calculs sont effectués selon les modalités présentées ci-après.

Pour les besoins de l'essai, on estime que le poids de 1 cm^3 de solution aqueuse est de 1 g. Le rapport sol/solution peut être exprimé en M/M ou M/vol.

2.1 ADSORPTION

L'adsorption (A_{t_i}) est définie comme le pourcentage de substance adsorbée sur le sol en fonction de la quantité présente au début de l'essai, dans les conditions de l'essai. Si la substance est stable et qu'elle n'adsorbe pas de manière significative sur la paroi du récipient, A_{t_i} est calculé à chaque instant t_i selon l'équation suivante:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (3)$$

où:

A_{t_i} = est le pourcentage d'adsorption à l'instant t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = est la masse de substance d'essai adsorbée sur le sol durant le temps t_i (µg);

m_0 = est la masse de substance dans le tube au début de l'essai (µg).

L'annexe 5 donne des informations détaillées sur le mode de calcul du pourcentage d'adsorption A_{t_i} avec les méthodes parallèles et séquentielles.

Le coefficient de répartition K_d est le rapport entre le contenu de la substance dans le sol et sa concentration massique dans la solution aqueuse, dans les conditions d'essai, lorsque l'équilibre d'adsorption est atteint.

Soit:

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \ (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (4)$$

où:

$C_s^{ads}(eq)$ = est la concentration de la substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption (µg g^{-1});

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = est la concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption (µg cm^{-3}). Elle est déterminée par analyse en tenant compte des valeurs données par les témoins.

$m_s^{ads}(eq)$ = est la masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption (µg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = est la masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption (µg);

m_{soil} = est la quantité de phase de sol exprimée en masse sèche de sol (g);

V_0 = est le volume initial de la phase aqueuse en contact avec le sol (cm^3).

La relation entre A_{eq} et K_d est donnée par l'équation suivante:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

où:

A_{eq} = est le pourcentage d'adsorption à l'équilibre d'adsorption (%).

Le coefficient normalisé basé sur la teneur en carbone organique K_{oc} lie le coefficient de répartition K_d à la teneur en carbone organique de l'échantillon de sol:

soit:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

où:

%OC = est le pourcentage de carbone organique dans l'échantillon de sol (g g^{-1}).

Le coefficient K_{oc} représente une valeur unique qui caractérise principalement le partage de substances chimiques non polaires entre le carbone organique dans le sol ou sédiment et eau. L'adsorption de ces substances est liée à la teneur organique du solide adsorbant (7); les valeurs K_{oc} dépendent donc des caractéristiques spécifiques des fractions humiques dont la capacité de sorption varie considérablement selon l'origine, la genèse, etc.

2.1.1 **Isothermes d'adsorption**

L'équation des isothermes d'adsorption de Freundlich lie la quantité de substance adsorbée à la concentration de substance en solution à l'équilibre (équation 8).

Les données sont traitées comme dans le chapitre «Adsorption». On calcule pour chaque tube d'essai la quantité de la substance adsorbée sur le sol après l'essai d'adsorption ($C_s^{ads}(eq)$, noté ailleurs x/m). On suppose que l'équilibre a été atteint et que $C_s^{ads}(eq)$représente la valeur d'équilibre:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right].V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

L'adsorption de Freundlich est donnée par l'équation suivante (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

ou, sous sa forme linéaire, par:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

où:

K_F^{ads} = est le coefficient d'adsorption de Freundlich; il se mesure en $cm^3\ g^{-1}$ uniquement si 1/n = 1; dans tous les autres cas, la pente l/n s'écrit K_F^{ads} ($\mu g^{1-1/n}(cm^3)^{1/n}g^{-1}$);

n = est la constante de régression; l/n est généralement compris entre 0,7 et 1,0, ce qui indique que la donnée de sorption est fréquemment légèrement non linéaire.

Les équations (8) et (9) sont portées sur un graphique et les valeurs K_F^{ads} et l/n sont calculées au moyen d'une analyse de régression utilisant l'équation 9. Le coefficient de corrélation r^2 de l'équation logarithmique est également calculé. La figure 2 donne des exemples de graphes.

▼B

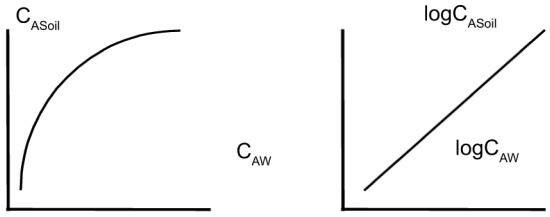


Fig. 2. Graphique d'adsorption de Freundlich, normalisé et linéarisé

2.1.2 **Bilan matière**

Le bilan matière (MB) correspond au pourcentage de substance récupéré par analyse après un essai d'adsorption par rapport à la quantité nominale de substance présente au début de l'essai.

Le traitement des données est différent si le solvant est complètement miscible avec l'eau. On peut dans ce cas appliquer le traitement des données visé au chapitre «Désorption» pour déterminer la quantité de substance extraite par solvant. Si celui-ci est moins miscible avec l'eau, il convient de déterminer la quantité récupérée.

Le bilan matière de l'adsorption est calculé de la manière suivante: on suppose que le terme (m_E) correspond à la somme des masses de substance extraites du sol et de la surface du récipient d'essai au moyen d'un solvant organique.

soit:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \ (\%) \qquad (10)$$

où:

MB = est le bilan matière (%);

m_E = est la masse totale de substance extraite en deux étapes du sol et des parois du récipient (µg);

C_o = est la concentration massique initiale de la solution en contact avec le sol (µg cm^{-3});

V_{rec} = est le volume de surnageant récupéré à l'équilibre d'adsorption (cm^{-3}).

2.2 DÉSORPTION

La désorption (D) est définie comme le pourcentage de substance désorbée, rapporté à la quantité de substance préalablement adsorbée, dans les conditions d'essai:

soit:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

où:

D_{t_i} = est le pourcentage de désorption à l'instant t_i (%);

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = est la masse de substance désorbée à partir du sol à l'instant t_i, (µg);

$m_s^{ads}(eq)$ = est la masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption, (µg).

L'annexe 5 donne des informations détaillées sur la manière de calculer le pourcentage de désorption D_{t_i} par la méthode parallèle et séquentielle.

Le coefficient de désorption apparente (K_{des}) correspond, dans les conditions d'essai, au rapport entre le contenu de la substance restant dans la phase du sol et la concentration massique de la substance désorbée dans la solution aqueuse, lorsque l'équilibre de désorption est atteint:

soit:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

où:

K_{des} = est le coefficient de désorption ($cm^3\ g^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = est la masse totale de substance désorbée à partir du sol à l'équilibre de désorption (µg);

V_T = est le volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai de cinétique de désorption (cm^3).

Le chapitre «Désorption» de l'annexe 5 explique comment calculer $m_{aq}^{des}(eq)$.

Remarque

Si l'essai d'adsorption a été réalisé avec la méthode parallèle, le volume V_T de l'équation (12) est estimé égal à V_0.

2.2.1 **Isothermes de désorption**

L'équation des isothermes de désorption de Freundlich relie la quantité de la substance restant adsorbée sur le sol à la concentration de substance en solution à l'équilibre de désorption (équation 16).

La quantité de substance restant adsorbée sur le sol à l'équilibre de désorption est calculé pour chaque tube de la manière suivante:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ est défini comme:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A(\mu g) \quad (14)$$

$C_s^{des}(eq)$ = est la quantité de la substance restant adsorbée sur le sol à l'équilibre de désorption (µg g^{-1});

$m_m^{des}(eq)$ = est la masse de substance déterminée par analyse dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption (µg);

▼B

m_{aq}^{A} = est la masse de substance restant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un remplacement volumique incomplet µg);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = est la masse de substance en solution à l'équilibre d'adsorption (µg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = est le volume de solution prélevé du tube afin de mesurer la substance, à l'équilibre de désorption (cm^3)

V_R = est le volume de surnageant extrait du tube après obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par le même volume de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3);

L'équation de la désorption de Freundlich s'écrit (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \ (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

ou, sous une forme linéaire:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

où:

K_F^{des} = est le coefficient de désorption de Freundlich;

n = est la constante de régression;

$C_{aq}^{des}(eq)$ = est la concentration massique de substance dans la phase aqueuse à l'équilibre de désorption (µg cm^{-3}).

Les équations (16) et (17) peuvent être portées sur un graphique et les valeurs K_F^{des}et 1/n sont calculées au moyen d'une analyse de régression en utilisant l'équation 17.

Remarque:

Si l'exposant d'adsorption ou de désorption de Freundlich 1/n est égal à 1, les constantes d'adsorption ou de désorption de Freundlich (K_F^{ads} et K_F^{des}) sont identiques aux constantes d'adsorption ou de désorption à l'équilibre (K_d et K_{des}) et les graphiques de C_s en fonction de C_{aq} seront linéaires. Si les exposants ne sont pas égaux à 1, les graphiques de C_s en fonction de C_{aq} seront non linéaires et les constantes d'adsorption et de désorption varieront selon les isothermes.

2.2.2 **Procès-verbal d'essai**

Le procès-verbal doit comprendre les informations suivantes:

— Identification complète des échantillons de sol utilisés, à savoir:

— références géographiques du site (latitude, longitude);

— date de l'échantillonnage;

▼B

— origine (sol agricole, forêt, etc.);

— profondeur de l'échantillonnage;

— contenu en sable/limon/argile;

— valeurs du pH (dans $CaCl_2$ 0,01M);

— teneur en carbone organique;

— teneur en matière organique;

— teneur en azote;

— rapport C/N;

— capacité d'échange cationique (mmol/kg);

— toutes les informations sur la collecte et le stockage des échantillons de sol;

— le cas échéant, toutes les informations utiles à l'interprétation de l'adsorption et de la désorption de la substance testée;

— la référence aux méthodes utilisées pour déterminer chaque paramètre;

— le cas échéant, des informations sur la substance à tester;

— la température des essais;

— les conditions de centrifugation;

— le procédé utilisé pour analyser la substance;

— les raisons motivant l'emploi d'un agent solubilisant pour préparer la solution de substance de réserve;

— les raisons expliquant les corrections de calcul, le cas échéant;

— les données relatives au formulaire (annexe 6) et à la présentation graphique;

— toutes les informations et observations utiles pour interpréter les résultats des essais.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

1. Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

2. Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.

3. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

4. OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

5. US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

6. US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, 0PPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

7. ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

9. Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

10. Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

11. BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

12. Calvet R., (1989), «Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils», in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

13. Calvet R., (1980) «Adsorption-Desorption Phenomena» in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.

14. Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), «The sorption of nonpolar organics by soils and sediments» in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 31-44.

15. van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), «An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media». Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), 29-35.

16. McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), «Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis», in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

17. Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), «Movement and sorption of chemicals applied to the soil». Weeds, 13, 185-190.

18. Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) «Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils». J.Agric.Food Chem., 18, 524-528.

19. Russell M.H., (1995), «Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil», in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

20. Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), «Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides», IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, 901-932.

▼B

21. Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), «Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils». Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.

22. Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), «Persistence of herbicides in soil». J. Sci. Fd Agric, 18, 269-273.

23. Burkhard N., and Guth J.A., (1981), «Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption». Pestic. Sci. 12, 45-52.

24. Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). «Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides». Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, 961-971.

25. Osgerby J.M., (1973), «Process affecting herbicide action in soil». Pestic. Sci., 4, 247-258.

26. Guth J.A., (1972), «Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden». Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 143-154.

27. Hamaker J.W., (1975), «The interpretation of soil leaching experiments», in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.

28. Helling C.S., (1971), «Pesticide mobility in soils». Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, 732-210.

29. Hamaker J.W., (1972), «Diffusion and volatilization» in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49-143.

30. Burkhard N. and Guth J.A., (1981), «Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system». Pestic. Sci. 12, 37-44.

31. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

32. Gustafson D.I., (1989), «Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide teachability». J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), 339-357.

33. Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). «Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils». J. of Soil Sci., 28, 340-350.

34. Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), «Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils». Pest. Sci., 11, 389-395.

35. Green R.E., and Karickoff S.W., (1990), «Sorption estimates for modeling», in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80- 101,

36. Lambert S.M., (1967), «Functional relationship between sorption in soil and chemical structure». J. Agri. Food Chem., 15, 572-576.

▼B

37. Hance R.J., (1969), «An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils». J. Agri. Food Chem., 17, 667-668.

38. Briggs G.G. (1969), «Molecular structure of herbicides and their sorption by soils». Nature, 223, 1288.

39. Briggs G.G. (1981). «Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor». J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.

40. Sabljic A., (1984), «Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology». J. Agric. Food Chem., 32, 243-246.

41. Bailey G.W., and White J.L., (1970), «Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil». Residue Rev., 32, 29-92.

42. Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), «Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate». Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32:222-234.

43. Karickhoff S.W., (1981) «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere 10, 833-846.

44. Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), «Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners». Environ. Toxicol. Safety 21, 1-17.

45. Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). «Adsorption in organic chemicals» in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I, and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.

46. Deli J., and Warren G.F., 1971, «Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils». Weed Sci. 19:67-69.

47. Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), «Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils». Weed Science, Vol. 23, 454-457.

48. Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) «Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations» in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p. 75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

49. Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), «Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase», CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

50. ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

51. Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 1 1th edition.

52. Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. «Methods of Soil Analysis», Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

53. ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

54. ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

55. ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

56. ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

57. ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

58. ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

59. Green R.E., and Yamane V.K., (1970) «Precision in pesticide adsorption measurements». Soil Sci. Am. Proa, 34, 353-354.

60. Grover R., and Hance RJ. (1970), «Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine». Soil Sci., 109-138.

61. Boesten, J J.T.I, «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system». Pest. Sci. 1990, 30, 31-41.

62. Boesten, J J.T.I. «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106» Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

63. Bastide J., Cantier J.M., et Coste C, (1980), «Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique». Weed Res. 21, 227-231.

64. Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), «Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments». J. Environ.QuaL, 10(3), 382-386.

65. Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), «Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water». Environ. Sci. Technol., 17(4), 227-231.

66. Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), «Sorption of organic substances by soils and sediments». J. Environm. Sci. Health, B19 (3), 297-312.

67. Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), «Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons». Chemosphere, 16(1), 109-116.

68. Lyman WJ., Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

69. Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). «Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota» in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp. 78- 115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

70. Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), «A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds». Science, Vol. 206, 831-832.

71. Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), «Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption». Soil Sci. Soc. Am. J. 45, 38-42.

72. Karickhoff S.W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere, Vol. 10(8), 833-846.

73. Moreale A., van Bladel R., (1981), "Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité - reactivité. Revue de l'Agric, 34 (4), 319-322.

74. Millier M., Kôrdel W. (1996), «Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil». Chemosphere, 32(12), 2493-2504.

75. Kôrdel W., Kotthoff G., Millier M. (1995), «HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test». Chemosphere 30 (7), 1373-1384.

76. Kôrdel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), "HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases. Chemosphere 27 (12), 2341-2352.

77. Hance, R.J., (1967), «The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides». Weed Research, Vol. 7, pp. 29-36.

78. Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), «The retention processes: mechanisms» in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

79. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

80. Giles C.H., (1970), «Interpretation and use of sorption isotherms» in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, 14-32.

81. Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), «Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils». J. Chem. Soc, 3973-93.

82. Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), «Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption». Ann. Agron. 31: 239-251.

83. Bedbur E., (1996), «Anomalies in the Freundlich equation», Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.

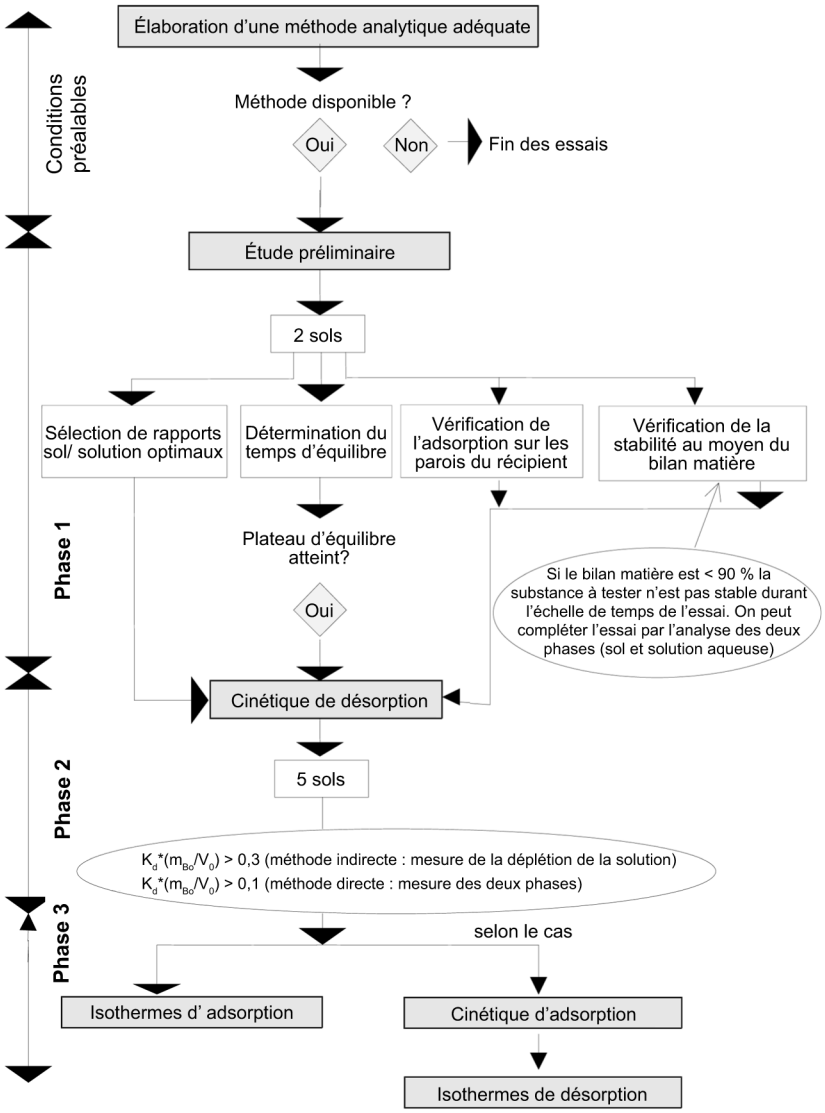
84. Guth, J.A., (1985), «Adsorption/desorption», in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

85. Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. 26:305 (1962).

▼B

Annexe 1

Organigramme d'essai



▼B

Appendice 2

LES EFFETS DE LA PRÉCISION DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE ET DES VARIATIONS DE CONCENTRATION SUR LA PRÉCISION DES RÉSULTATS DE L'ADSORPTION

II ressort clairement du tableau suivant (84) que si la différence entre la masse initiale (m_0 = 110 µg) et la masse ($m_{aq}^{ads}(eq)$ = 100 µg) de la substance dans la solution à l'équilibre est très faible, une erreur de 5 % dans la mesure de la concentration à l'équilibre fausse de 50 % le calcul de la quantité de la substance adsorbée sur le sol ($m_s^{ads}(eq)$) et de 52,4 % le calcul de K_d.

Quantité de sol m_{sol} = 10g

Volume de solution V_0 = 100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg cm^{-3})	R	$m_s^{ads}(eq)$* (µg)	$C_s^{ads}(eq)$* (µg g^{-1})	R‡	K_d (*)	R‡
	POUR A = 9 %							
m_0 = 110 µg ou C_0 = 1,100 µg/cm^3	100	1,000	valeur réelle	10	1,00	valeur réelle	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	POUR A = 55 %							
m_0 = 110 µg ou C_0 = 1,100 µg/cm^3	50,0	0,500	valeur réelle	60,0	6,00	valeur réelle	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	POUR A = 99 %							
m_0 = 110 µg ou C_0 = 1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	valeur réelle	108,9	10,89	valeur réelle	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

(*) $m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right]V_0}{m_{soil}}$. $Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)}\frac{V_0}{m_{soil}}$

où:

$m_s^{ads}(eq)$ = est la masse de substance dans la phase de sol a l'équilibre (µg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = est la masse de substance dans la phase aqueuse à l'équilibre (µg);

$C_s^{ads}(eq)$ = est la concentration de substance dans la phase de sol à l'équilibre (µg g^{-1});

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = est la concentration massique de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre (µg cm^{-3});

R = est l'erreur analytique lors du calcul de $m_{aq}^{ads}(eq)$;

R‡ = est l'erreur calculée due à l'erreur analytique R.

▼B

Appendice 3

TECHNIQUES D'ESTIMATION DE K_d

1. Les techniques d'estimation permettent de prédire K_d en se fondant sur des corrélations avec des valeurs P_{ow} (12) (39) (63-68), avec des données sur l'hydrosolubilité (12) (19) (21) (39) (68-73) ou avec des données sur la polarité obtenues par HPLC en phase inversée (74-76). Comme le montrent les tableaux 1 et 2, on calcule K_{oc} ou K_{om} à partir de ces équations puis on obtient, indirectement, K_d à partir des équations suivantes:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1})$$

2. Ces corrélations se fondent sur deux hypothèses: 1) c'est la matière organique du sol qui influence principalement l'adsorption d'une substance: 2) les interactions en jeu sont essentiellement non polaires. Il en résulte que ces corrélations: 1) ne sont pas applicables aux substances polaires, ou uniquement de manière limitée et: 2) qu'elles ne s'appliquent pas lorsque la teneur en matière organique du sol est très faible (12). Par ailleurs, si l'on a trouvé des corrélations satisfaisantes entre P_{ow} et l'adsorption (19), on ne peut pas en dire autant des relations entre l'hydrosolubilité et l'étendue de l'adsorption (19) (21); les études sont par conséquent très contradictoires.

3. Les tableaux 1 et 2 donnent quelques exemples de corrélations entre le coefficient d'adsorption et, respectivement, le coefficient de partage octanol-eau et l'hydrosolubilité.

Tableau 1

Exemples de corrélations entre le coefficient de distribution de l'adsorption et le coefficient de partage octanol-eau: pour d'autres exemples voir (12) (68)

Substances	Corrélations	Auteurs
Urée substituée	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Substances aromatiques chlorées	$\log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou et al. (1983) (65)
Divers pesticides	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl et Mingelgrin (1984) (66)
Hydrocarbures aromatiques	$\log K_{oc} = - 2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles et Mantoura (1987) (67)

Tableau 2

Exemples de corrélations entre le coefficient de distribution de l'adsorption et l'hydrosolubilité; pour d'autres exemples voir (68) (69)

Composés	Corrélations	Auteurs
Divers pesticides	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl et Mingelgrin (1984) (66)
Substances aliphatiques aromatiques chlorées	$^{lo}g\ K_{om} = (4,040 +/- 0,038) – (0,557 +/- 0,012) \log S_w$	Chiou et al. (1979) (70)
α-naphtol	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Substances cycliques aliphatiques chlorées	$\log K_{oc} = - 1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Divers composés	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

Appendice 4

CALCUL DES CONDITIONS DE CENTRIFUGATION

1. Le temps de centrifugation est donné par la formule suivante (on suppose que les particules sont sphériques):

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right]\ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

Par commodité, tous les paramètres sont indiqués en unités n'appartenant pas au SI (g, cm)

où:

ω = vitesse de rotation (= 2 π rpm/60), rad s^{-1}

rpm = tours par minute;

η = viscosité de la solution, g s^{-1} cm^{-1}

r_p = rayon des particules, cm

p_s = densité du sol, g cm^{-3}

p_{aq} = densité de la solution, g cm^{-3}

R_t = distance entre le centre du rotor de la centrifugeuse et le haut de la solution dans le tube de la centrifugeuse, cm

R_b = distance entre le centre du rotor de la centrifugeuse et la base du tube de la centrifugeuse, cm

R_b-R_t = longueur du mélange sol/solution dans le tube de la centrifugeuse, cm

Dans la pratique, le double du temps calculé est nécessaire pour obtenir une séparation complète.

2. On peut simplifier l'équation (1) si l'on considère que la viscosité (η) et la densité (p_{aq}) de la solution sont égales à la viscosité et à la densité de l'eau à 25 °C; dans ce cas, η = 8,95 x 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} et p_{aq} = 1,0 g cm^3.

Le temps de centrifugation est donné par l'équation 2:

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 .\ p^2(\rho_s - 1)}\ln\frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. L'équation 2 montre l'importance des paramètres du temps (t) et de la vitesse (rpm} pour définir les conditions de centrifugation permettant de séparer des particules d'une taille définie (c'est-à-dire d'un rayon de 0,1 μm dans notre cas): 1) la densité du sol et 2) la longueur du mélange dans le tube de la centrifugeuse (R_b-R_t), déterminent la distance qu'une particule de sol doit parcourir entre le haut de la solution et la base du tube; il apparaît que, pour un volume fixe, la longueur du mélange dans le tube dépend du carré du rayon du tube.

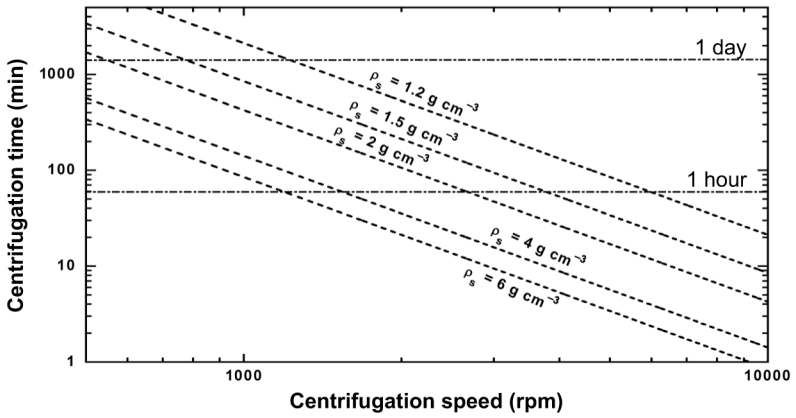
4. La figure 1 présente les différents temps de centrifugation (t) en fonction de la vitesse de centrifugation (rpm) pour différentes densités du sol (p_s) (figure la) et pour différentes longueurs du mélange dans les tubes de la centrifugeuse (figure 2a). La figure la montre nettement l'influence de la densité du sol. Pour une centrifugation classique de 3 000 rpm, le temps de centrifugation est d'environ 240 min pour une densité du sol de 1,2 g cm^1, alors qu'il n'est que de 50 min pour 2,0 g cm^3. La figure lb montre d'une manière similaire que, pour une centrifugation classique de 3 000 rpm, le temps de centrifugation est d'environ 50 min pour un mélange de 10 cm de long et de seulement 7 min pour une longueur de 1 cm. Il convient cependant de trouver un compromis optimal entre un mode de centrifugation exigeant le moins de longueur possible et la séparation commode des phases après la centrifugation.

▼B

5. De plus, lorsque l'on définit les conditions expérimentales de la séparation sol/solution, il importe de considérer l'existence d'une troisième «pseudo-phase», les colloïdes. Ces particules, d'une taille inférieure à 0,2 μm, peuvent influencer de manière significative le mécanisme d'adsorption d'une substance dans une suspension de sol. Après la centrifugation, réalisée comme cela est décrit ci-dessus, les colloïdes restent dans la phase aqueuse et sont analysés en même temps que celle-ci. On perd donc les informations sur leur impact.

   Si le laboratoire dispose d'équipements d'ultracentrifugation ou d'ultrafiltration, il peut étudier plus en détail l'adsorption/désorption d'une substance dans le sol et obtenir des informations sur l'adsorption de la substance sur les colloïdes. Il faut effectuer dans ce cas une ultracentrifugation à 60 000 rpm/min ou une ultrafiltration avec des filtres d'une porosité de 100 000 dalton pour séparer les trois phases, sol, colloïdes, solution. Le protocole d'essai doit être modifié en conséquence afin que les trois phases soient analysées.

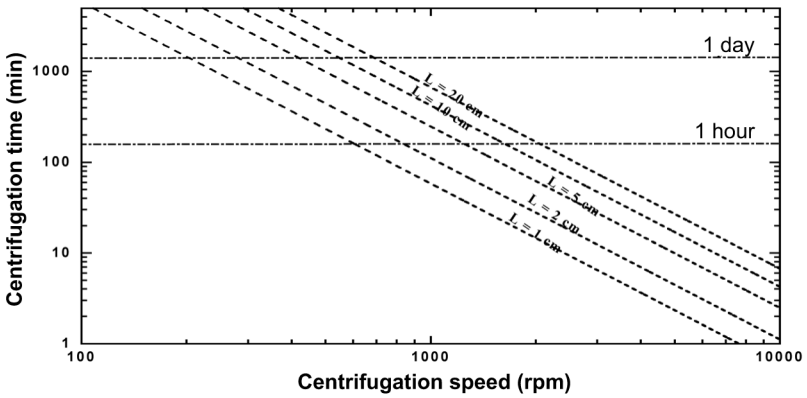
Fig. la.



Variation du temps de centrifugation (t) en fonction de la vitesse de centrifugation (rpm) et de la densité du sol.

(p_s). R_t = 10 cm, R_b-R_t = 10 cm, η = 8,95 x 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} et p_{aq} = 1,0 g cm^{-3} à 25 °C.

Fig. lb.



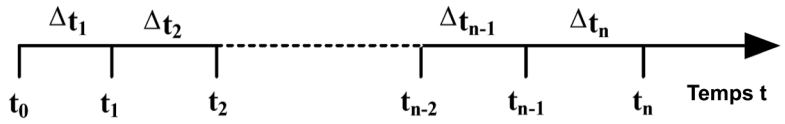
Variation du temps de centrifugation (t) en fonction de la vitesse de centrifugation (rpm) et de la longueur du mélange dans le tube de la centrifugeuse (R_b-R_t) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 x 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1}, p_{aq} = 1,0 g cm^{-3} à 25 °C et p_s = 2,0 g cm^3.

▼B

Appendice 5

CALCUL DE L'ADSORPTION A (%) ET DE LA DÉSORPTION D (%)

Organisation de l'essai dans le temps:



On suppose pour tous les calculs que la substance d'essai est stable et qu'elle n'adsorbe pas de manière significative sur les parois du récipient.

ADSORPTION A (A %)

a) *Méthode parallèle*

Le pourcentage d'adsorption est calculé pour chaque tube d'essai (i) au temps (t_i) selon l'équation suivante:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i)\cdot 100}{m_0}\% \qquad (1)\ (^1)$$

On peut calculer ainsi les termes de l'équation:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0\ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i)\cdot V_0\ (\mu g) \qquad (3)$$

où

A_{t_i} = pourcentage d'adsorption (%) au temps t_i

$m_s^{ads}(t_i)$ = masse de substance d'essai sur le sol au moment t_i où l'analyse est effectuée (μg)

m_0 = masse de la substance d'essai dans le tube au début de l'essai (μg)

C_o = concentration massique initiale de la solution en contact avec le sol (μg cm^{-3})

(1) Équation applicable à la méthode directe et indirecte. Toutes les autres équations s'appliquent uniquement à la méthode indirecte.

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = concentration massique de la substance dans la phase aqueuse au temps t_i où l'analyse est effectuée (µg cm $^{-3}$); cette concentration est déterminée par analyse en tenant compte des valeurs données par les témoins

V_O = volume initial de la solution en contact avec le sol (cm^3).

Les valeurs du pourcentage d'adsorption A_{t_i} ou $C_{aq}^{ads}(t_i)$ sont portées sur un graphe en fonction du temps, puis on détermine le temps mis pour atteindre l'équilibre de sorption (voir les figures 1 et 2).

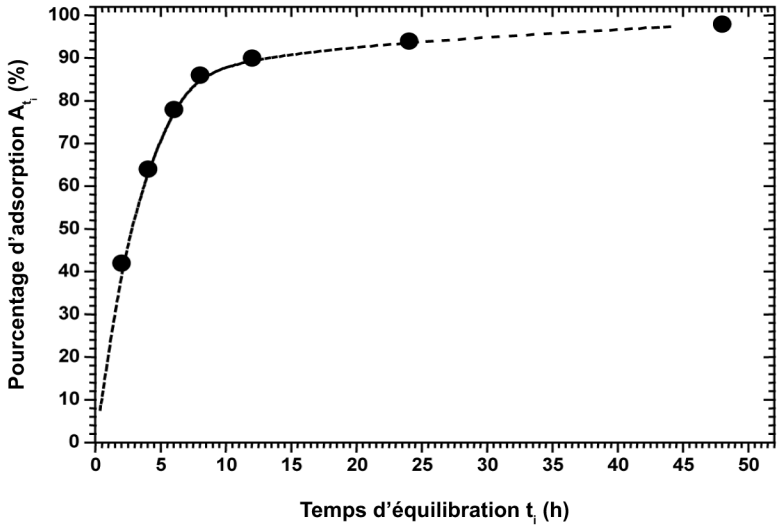


Figure 1.

Courbe de l'équilibre d'adsorption

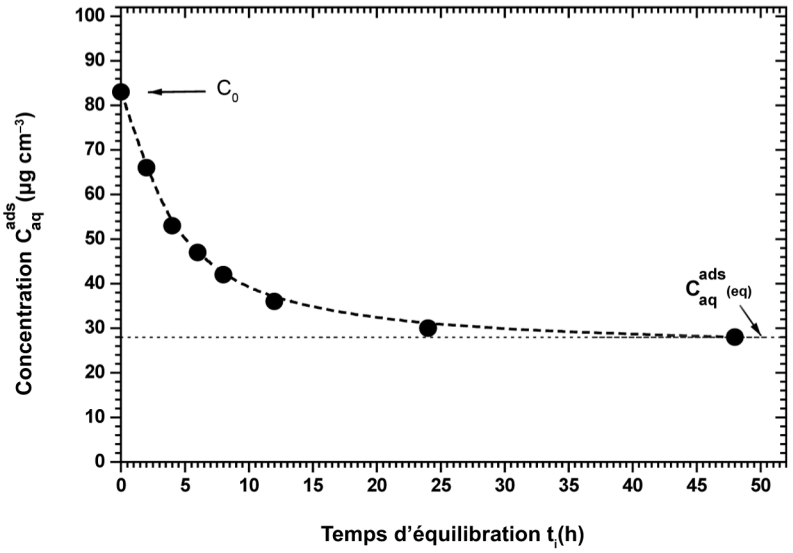


Figure 2.

Concentration massique de la substance d'essai dans la phase aqueuse (C_{aq}) en fonction du temps

▼B

b) *Méthode séquentielle*

Les équations suivantes tiennent compte du fait que le procédé d'adsorption s'opère en mesurant la substance d'essai dans de petites aliquotes de la phase aqueuse à des intervalles de temps précis.

— Durant chaque intervalle de temps, la quantité de substance adsorbée sur le sol est calculée comme suit:

— pour le premier intervalle de temps $\Delta t_i = t_i - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

— pour le deuxième intervalle de temps $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

— pour le troisième intervalle de temps $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

— pour le $n^{ième}$ intervalle de temps $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{\left(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A \right)}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

— le pourcentage d'adsorption à chaque intervalle de temps $A_{\Delta t_i}$ est calculée selon l'équation suivante:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)\ (1)$$

tandis que le pourcentage d'adsorption (A_{t_i}) au temps t_i est donné par l'équation:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)\ (1)$$

Les valeurs de l'adsorption A_{t_i} or $A_{\Delta t_i}$ (selon les besoins de l'étude) sont portées sur un graphe en fonction du temps, puis on détermine le temps mis pour atteindre l'équilibre de sorption.

— Au temps d'équilibre t_{eq}:

— la masse de substance adsorbée sur le sol est égale à:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)\ (1)$$

(1) Équations applicables à la méthode directe et indirecte. Toutes les autres équations s'appliquent uniquement à la méthode indirecte.

▼B

— la masse de substance dans la soulution est égale à:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)\ (^1)$$

— et le pourcentage d'adsorption à l'équilibre est égal à:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12)\ (^1)$$

Les paramètres ci-dessus sont définis de la manière suivante:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), ..., m_s^{ads}(\Delta t_n)$	= masse de substance adsorbée sur le sol durant les intervalles de temps Δt_1. Δt_2,..., Δt_n (µg)
$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), ..., m_n^{ads}(t_n)$	= masse de substance mesurée dans une aliquote V_a^A au temps t_1, t_2, ..., t_n (µg)
$m_s^{ads}(eq)$	= masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption (µg)
$m_{aq}^{ads}(eq)$	= masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption (µg)
V_a^A	= volume de l'aliquote dans laquelle la substance est mesurée (cm^3)
$A_{\Delta t_i}$	= pourcentage d'adsorption correspondant à l'intervalle de temps Δt_i (%)
A_{eq}	= pourcentage d'adsorption à l'équilibre d'adsorption (%).

DÉSORPTION D (%)

Le temps t_0 qui marque le début de l'essai de cinétique de désorption correspond au moment où le volume maximal de substance récupérée (une fois que l'équilibre d'adsorption a été atteint) est remplacé par un volume égal de solution de $CaCl_2$ 0,01 M.

a) *Méthode parallèle*

Au temps t_i, on mesure la concentration massique de la substance dans la phase aqueuse prélevée dans le tube i (V_r^i) et la masse désorbée est calculée selon l'équation suivante:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i} \right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

À l'équilibre de désorption t_i — t_{eq} de sorte que $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

La masse de substance désorbée durant l'intervalle de temps (Δt_i) est donnée par l'équation suivante:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Le pourcentage de désorption est calculé comme suit:

au temps t_i avec l'équation:

(1) Équations applicables à la méthode directe et indirecte. Toutes les autres équations s'appliquent uniquement à la méthode indirecte.

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

durant l'intervalle de temps (Δt_i) avec l'équation:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

où:

D_{t_i} = pourcentage de désorption au temps t_i (%)

$D_{\Delta t_i}$ = pourcentage de désorption à l'intervalle de temps Δt_i (%)

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = masse de substance désorbée au temps t_i, (µg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = masse de substance désorbée durant l'intervalle de temps Δt_i (µg)

$m_m^{des}(t_i)$ = masse de substance mesurée par analyse au temps t_i dans un volume de solution V_r^i prélevé pour l'analyse (µg);

m_{aq}^{A} = masse de substance subsistant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un volume de remplacement insuffisant (µg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masse de substance dans la solution à l'équilibre d'adsorption (µg)

V_R = volume de surnageant prélevé du tube après obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par un volume égal de solution de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3)

V_r^i = volume de solution prélevé du tube (i) afin de mesurer la substance lors de l'essai de cinétique de désorption (cm^3).

Les valeurs de désorption D_{t_i} ou $D_{\Delta t_i}$ (selon les besoins de l'étude) sont portées sur un graphe en fonction du temps, puis on calcule le temps mis pour atteindre l'équilibre de désorption.

b) *Méthode séquentielle*

Les équations ci-après tiennent compte du fait que le procédé d'adsorption a été réalisé en mesurant la substance d'assai dans de petites aliquotes ((v_a^A)) de la phase aqueuse (voir le chapitre sur la méthode séquentielle au point 1.9 «Réalisation de l'essai»). On suppose a) que le volume de surnageant prélevé du tube après l'essai de cinétique d'adsorption a été remplacé par un volume égal de solution de $CaCl_2$ 0,01 M (V_R) et b) que le volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol (V_T) durant l'essai de cinétique de désorption reste constant et égal à l'équation suivante:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \quad (18)$$

▼B

Au temps t_i:

— La masse de substance est mesurée dans une petite aliquote (v_a^D) et la masse désorbée est calculée selon l'équation suivante:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— À l'équilibre de désorption $t_i = t_{eq}$ de sorte que $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— Le pourcentage de désorption D_{t_i} est calculé selon l'équation suivante:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

À l'intervalle de temps (Δt_i):

La quantité de substance désorbée durant chaque intervalle de temps est calculée de la manière suivante:

— pour le premier intervalle de temps $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— pour le deuxième intervalle de temps $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right)$$

et

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \quad (22)$$

— pour le nième intervalle de temps $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D\right)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \text{ et} \quad (23)$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Enfin, le pourcentage de désorption à chaque intervalle de temps $D_{\Delta t_i}$ est calculé au moyen de l'équation suivante:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (24)$$

tandis que le pourcentage de désorption D_{t_i} à un moment t_i est donné par l'équation ci-dessous:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (25)$$

▼B

Les paramètres ci-dessus sont définis de la manière suivante:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = masse de substance restant adsorbée sur le sol après les intervalles de temps Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n (µg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = masse de substance désorbée durant les intervalles de temps Δt_1, $\Delta\ t_2$, …, Δt_n (µg)

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = masse de substance mesurée dans une aliquote (v_a^D) au temps t_1, t_2, …, t_n, (µg);

V_T = volume total de la phase aqueuse en contact avec le sol durant l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle (cm^3)

m_{aq}^A = masse de substance subsistant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un volume de remplacement insuffisant (µg);

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \quad (26)$$

où:

V_R = volume de surnageant extrait du tube après l'obtention de l'équilibre d'adsorption et remplacé par un volume égale de solution de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3)

v_a^D = volume d'aliquote extrait du tube (i) pour analyse durant l'essai de cinétique de désorption réalisé avec la méthode séquentielle (cm^3)

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \quad (27)$$

▼B

Appendice 6

ADSORPTION-DÉSORPTION DANS LES SOLS: PRÉSENTATION DES DONNÉES (FORMULAIRES)

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): ..... %

Température: ..... °C

Adéquation de la méthode analytique

Poids du sol	g	
Sol: matière sèche	g	
Volume de la solution de $CaCl_2$	cm^3	
Concentration nominale de la solution finale	$\mu g\ cm^{-3}$	
Concentration d'analyse de la solution finale	$\mu g\ cm^{-3}$	

Méthode analytique utilisée:

Calibration de la méthode analytique:

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): ..... %

Température: ..... °C

Méthode analytique utilisée: Indirecte ☐ Parallèle ☐ Séquentielle ☐

Directe ☐

Essai d'adsorption: échantillons d'essai

	Symbole	Unités	Temps d'équilibrage		Temps d'équilibrage		Temps d'équilibrage		Temps d'équilibrage	
Tube n°										
Poids du sol	—	g								
Sol: matière sèche	m_{sol}	g								
Volume d'eau dans le sol pesé (calculé)	V_{ws}	cm^3								
Volume de $CaCl_2$ 0,01 M pour équilibrer le sol		cm^3								
Volume de solution de réserve		cm^3								
Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol	V_0	cm^3								
Concentration initiale de la solution à tester	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Masse de substance au début de l'essai	m_0	µg								

▼B

	Symbole	Unités	Temps d'équilibrage		Temps d'équilibrage		Temps d'équilibrage		Temps d'équilibrage	
Après agitation et centrifugation										
MÉTHODE INDIRECTE										
Méthode parallèle										
Concentration de la substance dans la phase aqueuse, correction témoins incluse	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Méthode séquentielle										
Masse de substance mesurée dans l'aliquote V_a [A]	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
MÉTHODE DIRECTE										
Masse de substance adsorbée sur le sol	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Calcul de l'adsorption										
Adsorption	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Moyennes										
Coefficient d'adsorption	K_d	cm^3 g^{-1}								
Moyennes										
Coefficient d'adsorption	K_{oc}	cm^3 g^{-1}								
Moyennes										

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): ..... %

Température: ..... °C

Essai d'adsorption: témoins et contrôles

	Symbole	Unités	Témoin		Témoin		Contrôle	
Tube n°								
Poids du sol		g					0	0
Volume d'eau dans le sol pesé (calculé)		cm^3					—	—
Volume de solution de $CaCl_2$ 0,01 M ajouté		cm^3						
Volume ajouté de solution de réserve de la substance		cm^3	0	0				
Volume total de la phase aqueuse (calculé)		cm^3					—	—

▼B

	Symbole	Unités	Témoin		Témoin		Contrôle	
Concentration initiale de la substance dans la phase aqueuse		µg cm^{-3}						
Après agitation et centrifugation								
Concentration dans la phase aqueuse		µg cm^{-3}						

Remarque: ajouter des colonnes si nécessaire.

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): ..... %

Température: ..... °C

Bilan matière

	Symbole	Unités				
Tube n°						
Poids du sol	—	g				
Sol: matière sèche	m_{sol}	g				
Volume d'eau dans le sol pesé (calculé)	V_{ws}	ml				
Volume de $CaCl_2$ 0,01 M pour équilibrer le sol		ml				
Volume de solution de réserve		cm^3				
Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol	V_0	cm^3				
Concentration initiale de la solution à tester	C_0	µg cm^{-3}				
Temps d'équilibrage	—	h				
Après agitation et centrifugation						
Concentration de la substance dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption, correction témoin incluse	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
Temps d'équilibrage	t_{eq}	h				
1re dilution au solvant						
Volume extrait de phase aqueuse	V_{rec}	cm^3				
Volume ajouté de solvant	ΔV	cm^3				
1re extraction au solvant						
Signal analysé dans le solvant	S_{E1}	var.				
Concentration de substance dans le solvant	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼B

	Symbole	Unités				
Masse de substance extraite du sol et des parois du récipient	m_{E1}	µg				
2e dilution au solvant						
Volume de solvant extrait	ΔV_S	cm^3				
Volume de solvant ajouté	$\Delta V'$	cm^3				
2e extraction au solvant						
Signal analysé dans le solvant	S_{E2}	var.				
Concentration de substance dans le solvant	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Masse de substance extraite du sol et des parois lu récipient	m_{E2}	µg				
Masse totale de substance: extraction en deux tapes	m_E	µg				
Bilan matière	MB	%				

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C, 12 h): … %

Température: … °C

Isothermes d'adsorption

	Symbole	Unités								
Tube n°										
Poids du sol	—	g								
Sol: matière sèche	E	g								
Volume d'eau dans le sol pesé (calculé)	V_{WS}	cm^3								
Volume de $CaCl_2$ 0,01 M pour équilibrer le sol		cm^3								
Volume de solution de réserve ajouté		cm^3								
Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol (calculé)	V_0	cm^3								
Concentration de la solution	C_0	µg cm^{-3}								
Temps d'équilibrage	—	h								

▼B

	Symbole	Unités								
Après agitation et centrifugation										
Concentration de la substance dans la phase aqueuse, correction témoin incluse	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Température		°C								
Masse adsorbée par unité de sol	$C_s^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Analyse de régression:

valeur de K_F^{ads}:

valeur de l/n:

coefficient de régression r^2:

Substance testée:

Sol testé:

Teneur du sol en matière sèche (105 °C 12 h): … %

Température: … °C

Méthode analytique utilisée: Indirecte ☐ Parallèle ☐ Séquentielle ☐

Essai de désorption

		Symbole	Unités	Intervalle de temps	Intervalle de temps	Intervalle de temps	Intervalle de temps
Tube nº provenant de l'essai d'adsorption							
Masse de substance adsorbée sur le sol à l'équilibre d'adsorption		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Volume extrait de phase aqueuse remplacé par $CaCl_2$ 0,01 M		V_R	cm^3				
Volume total de phase aqueuse en contact avec le sol	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Masse de substance restant après l'équilibre d'adsorption en raison d'un volume de remplacement insuffisant		m_{aq}^A	µg				

Cinétique de désorption

Masse mesurée de substance désorbée du sol au temps t_i		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Volume de solution extrait du tube (i) afin	PM	V_f^i	cm^3				
	SM	V_a^D	cm^3				
Masse de substance désorbée du sol du sol au temps t_i (calculé)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Masse de substance désorbée du sol durant l'intervalle de temps Δt_i (calculé)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Symbole	Unités	Intervalle de temps	Intervalle de temps	Intervalle de temps	Intervalle de temps
Pourcentage de désorption						
Désorption au temps t_i	D_{ti}	%				
Désorption à l'intervalle de temps Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Coefficient de désorption apparente	K_{des}					

PM: Méthode parallèle.

SM: Méthode séquentielle.

▼B

C.19. ESTIMATION DU COEFFICIENT D'ADSORPTION (K_{OC}) SUR LE SOL ET LES BOUES D'ÉPURATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

1. MÉTHODE

La méthode décrite reprend la ligne directrice nº 121 de l'OCDE (2001).

1.1. INTRODUCTION

On peut décrire le comportement de sorption des substances dans les sols ou les boues d'épuration à l'aide de paramètres déterminés expérimentalement selon la méthode d'essai C18. Un des paramètres essentiels est le coefficient d'adsorption, défini comme le rapport entre la concentration d'une substance dans le sol ou les boues et sa concentration dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption. Le coefficient d'adsorption normalisé basé sur la teneur en carbone organique du sol (K_{oc}) est un bon indicateur de la capacité de liaison d'une substance chimique à la matière organique du sol ou des boues d'épuration, et permet de comparer les substances chimiques entre elles. On peut estimer ce paramètre à partir de corrélations entre la solubilité dans l'eau et le coefficient de partage n-octanol/eau (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

La méthode expérimentale décrite dans cet essai utilise la HPLC pour estimer le coefficient d'adsorption K_{oc} dans le sol ou les boues d'épuration (8). Elle donne des résultats beaucoup plus fiables que ceux obtenus par les calculs de la méthode QSAR (9). En tant que méthode d'estimation, elle ne peut pas être totalement substituée aux essais par agitation conduits dans le cadre de la méthode d'essai C.18. Toutefois, le K_{oc} estimé peut servir à sélectionner des paramètres d'essai pertinents pour l'étude des processus d'adsorption/désorption suivant la méthode précitée, grâce au calcul du coefficient de distribution (K_d) ou du coefficient d'adsorption de Freundlich (K_f) selon l'équation 3 (voir paragraphe 1.2).

1.2. DÉFINITIONS

K_d est le coefficient de distribution défini comme le rapport des concentrations à l'équilibre (C) d'une substance d'essai dissoute dans un système à deux phases dont une sorbante (sol ou boues d'épuration) et l'autre aqueuse. Il est sans unité lorsque les concentrations dans les deux phases sont exprimées en termes de poids par poids. Si la concentration dans la phase aqueuse est exprimée en poids par volume, les unités sont alors en ml· g^{-1}. K_d est susceptible de varier en fonction des propriétés du sorbant et peut dépendre de la concentration.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} or \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \quad (1)$$

où:

C_{soil} = est la concentration de la substance d'essai dans le sol à l'équilibre d'adsorption (µg· g^{-1});

C_{slud} = est la concentration de la substance d'essai dans les boues à l'équilibre d'adsorption (µg· g^{-1});

C_{aq} = est la concentration de la substance d'essai dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption (µg· g^{-1}, µg· ml^{-1}).

▼B

K_f est le coefficient d'adsorption de Freundlich, défini comme la concentration de la substance d'essai dans le sol ou les boues d'épuration (x/m) lorsque la concentration à l'équilibre (C_{aq}) dans la phase aqueuse est égale à un. Il est exprimé en $\mu g.g^{-1}$ de sorbant. Il se calcule selon l'équation suivante.

$$\log\frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n}\cdot\log C_{aq} \quad (2)$$

où:

x/m = est la quantité de sorbant;

1/n = est la pente de l'isotherme d'adsorption de Freundlich;

C_{aq} = est la concentration de la substance d'essai dans la phase aqueuse à l'équilibre d'adsorption (µg . ml- [1]).

Lorsque $C_{aq} = 1; \log K_f = \log\frac{x}{m}$

K_{oc} est le coefficient de distribution (K_d) ou le coefficient d'adsorption de Freundlich (K_f) normalisé basé sur la teneur en carbone organique (f_{oc}) du sorbant. Plus particulièrement dans le cas des substances non ionisées, il donne une approximation du degré d'adsorption d'une substance sur le sorbant et permet de faire des comparaisons entre différents produits chimiques. Dépendant de K_d et de K_f, il peut être sans unité ou s'exprimer en ml . g^{-1} ou en µg . g^{-1} de matière organique.

$$\text{Koc} = \frac{\text{Kd}}{\text{foc}}(\text{sans unité ou en ml}\cdot g^{-1}) \text{ ou } \frac{\text{Kf}}{\text{foc}}(\mu g\cdot g^{-1}) \quad (3)$$

Comme la relation entre K_{oc} et K_d n'est pas toujours linéaire, les valeurs de K_{oc} peuvent donc varier d'un sol à l'autre, mais leur variabilité est très réduite par rapport aux valeurs de K_d ou de K_f.

Le coefficient d'adsorption (K_{oc}) se déduit du facteur de capacité (k') à partir de la courbe d'étalonnage de log k' en fonction de log K_{oc}, tracée pour les composés de référence sélectionnés. L'équation est la suivante:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

où:

t_R = est le temps de rétention de la substance d'essai et de la substance de référence dans la colonne de HPLC (en minutes)

t_0 = est le temps mort dans la colonne de HPLC (en minutes) (voir point 1.8.2).

P_{ow} est le coefficient de partage octanol/eau. défini comme le rapport des concentrations d'une substance dissoute dans l'eau et le n-octanol. Il est sans dimension.

$$\text{Pow} = \frac{\text{Coctanol}}{\text{Caq}}(= \text{Kow}) \quad (5)$$

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Avant d'utiliser cette méthode, il convient de connaître la formule développée, la pureté et, le cas échéant, la constante de dissociation des substances de référence. Il est également utile d'être renseigné sur leur solubilité dans l'eau et les solvants organiques, leur coefficient de partage octanol/eau ainsi que sur leurs caractéristiques d'hydrolyse.

▼B

Pour établir la corrélation entre les résultats expérimentaux de rétention en HPLC d'une substance d'essai et son coefficient d'adsorption K_{oc}, on doit tracer la courbe d'étalonnage de log K_{oc} en fonction de log k'. Il faudrait utiliser au minimum six points dont au moins un supérieur et un inférieur à la valeur supposée de la substance d'essai. La précision de la méthode sera d'autant plus grande que les substances de référence employées présenteront une structure chimique analogue à celle de la substance d'essai. S'il n'est pas possible d'avoir ces données, l'utilisateur est libre de sélectionner les substances d'étalonnage les mieux adaptées. Il devrait alors opter pour une série plus générale de substances présentant une hétérogénéité de structure. Les substances et les valeurs de K_{oc} recommandées à l'usage sont indiquées en annexe, au tableau 1 pour les boues d'épuration et au tableau 3 pour les sols. Il y aura donc lieu de justifier le choix de toute autre substance d'étalonnage.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

La HPLC est réalisée sur des colonnes d'analyse dont la phase solide est composée de résines commerciales cyanopropyliques contenant des radicaux lipophiles et polaires. On utilise une phase stationnaire modérément polaire basée sur une matrice de silice:

– O – Si	– CH_2 — CH_2 — CH_2	– CN
silice	espaceur apolaire	radical polaire

Le principe de cette méthode d'essai est analogue à celui de la méthode d'essai A.8 (coefficient de partage, méthode par HPLC). La substance d'essai, en migrant dans la colonne contenant la phase mobile, interagit avec la phase stationnaire. La répartition de la substance entre la phase mobile et la phase stationnaire contribue à en ralentir la progression. La composition de la phase stationnaire qui comporte à la fois des sites polaires et apolaires fait qu'une interaction est possible entre groupements polaires et radicaux apolaires d'une molécule — à l'instar de la matière organique dans des matrices de sol ou de boues d'épuration. On peut ainsi établir une relation entre le temps de rétention sur la colonne et le coefficient d'adsorption sur la matière organique.

Le pH exerce une influence significative, en particulier, sur le comportement de sorption des substances polaires. En règle générale, le pH varie entre 5,5 et 7,5 dans les sols agricoles et les bassins des stations de traitement des eaux usées. Les substances ionisables devraient être testées deux fois dans des solutions tampons appropriées, à savoir sous leur forme ionisée et non ionisée, mais seulement si la dissociation du composé chimique atteint au moins 10 %, à des valeurs de pH comprises entre 5,5 et 7,5.

Comme l'évaluation se fonde exclusivement sur la relation entre la rétention sur la colonne de HPLC et le coefficient d'adsorption, il est inutile de faire appel à une méthode d'analyse quantitative, car seule la détermination du temps de rétention est nécessaire. À condition de disposer d'une série de substances de référence appropriées et d'appliquer des conditions expérimentales normalisées, cette méthode constitue un moyen rapide et efficace d'estimer le coefficient d'adsorption K_{oc}.

1.5. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

La méthode par HPLC convient aux substances chimiques (marquées ou non) pour lesquelles il existe un système de détection approprié (spectrophotomètre ou détecteur de radioactivité, par exemple) et qui restent suffisamment stables tout au long de l'essai. Elle peut s'avérer particulièrement utile pour les substances difficiles à étudier dans d'autres systèmes expérimentaux (à savoir, les substances volatiles, les substances insolubles dans l'eau à une concentration mesurable par analyse et les substances présentant une très grande affinité avec la surface des récipients d'incubation). On peut également l'appliquer à des mélanges qui donnent des bandes d'élution non résolues. Dans ce cas, il faut déterminer les valeurs limites supérieures et inférieures du log K_{oc} des composants du mélange d'essai.

▼B

Les impuretés risquent parfois de compliquer l'interprétation des résultats de la HPLC, mais leur importance restera négligeable si la substance d'essai peut être clairement identifiée et séparée des impuretés par une méthode analytique.

Après avoir été validée pour les substances énumérées au tableau 1 de l'appendice, cette méthode a été appliquée à toute une série d'autres composés chimiques répertoriés dans les classes chimiques suivantes:

— amines aromatiques (exemples: trifluraline, 4-chloroaniline, 3,5-dinitro-aniline, 4-méthylaniline, N-méthvl- aniline, 1-naphthylamine),

— esters d'acides carboxyliques aromatiques (exemples: ester méthylique de l'acide benzoïque, 3,5-dinitroben- zoate d'éthyle),

— hydrocarbures aromatiques (exemples: toluène, xylène, éthylbenzène, nitrobenzène),

— esters de l'acide aryloxyphénoxypropionique (exemples: didofop-méthyle, fénoxaprop-éthyle, fénoxaprop- P-éthyle).

— fongicides à base de benzimidazole ou d'imidazole (exemples: carbendazime, fubéridazole, triazoxyde),

— amides de l'acide carboxilique (exemples: 2-chlorobenzamide, N,N-diméthylbenzamide, 3,5-dinitrobenzamide, N-méthylbenzamide, 2-nitrobenzamide, 3-nitrobenzamide),

— hydrocarbures chlorés (exemples: endosulfan, DDT, hexachlorobenzène, quintozène, 1,2,3-trichlorobenzène),

— insecticides organo-phosphorés (exemples: azinphos-méthyle, disulfoton, phénamiphos, isophenphos, pyrazophos, sulprophos, triazophos),

— phénols (exemples: phénol, 2-nitrophénol, 4-nitrophénol, pentachlorophénol, trichloro-2,4,6-phénol, 1-naphtol),

— dérivés de la phénylurée (exemples: isoproturon, monolinuron, pencycuron),

— colorants pigmentaires (exemples: Acid yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81),

— hydrocarbures aromatiques polycycliques (exemples: acénaphthène, naphthalène),

— herbicides à base de triazine-1,3,5 (exemples: prométryne, propazine, simazine, terbutryne),

— dérivés de triazole (exemples: tébuconazole, triadiméfon, tradiménol, triapenthénol).

Cette méthode ne convient pas aux substances réagissant avec l'éluant ou la phase stationnaire. Par ailleurs, elle n'est pas applicable aux substances qui interagissent de manière spécifique avec des constituants inorganiques (formation de complexes en grappe avec les minéraux argileux, par exemple). Elle risque d'être inopérante pour les produits tensio-actifs, les substances inorganiques ainsi que les acides et bases modérés à forts. Elle permet de déterminer des valeurs de log K_{oc} comprises entre 1,5 et 5,0. Les substances ionisantes doivent être mesurées dans une phase mobile tamponnée, en prenant toutes les précautions nécessaires pour éviter la précipitation des composants du tampon ou de la substance d'essai.

▼B

1.6. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.6.1. **Précision**

En règle générale, le coefficient d'adsorption d'une substance d'essai peut être estimé à ± 0,5 unité logarithmiques de la valeur déterminée d'après la méthode par agitation (voir au tableau 1 de l'appendice). Il est possible d'atteindre une plus grande précision si les substances de référence utilisées présentent une structure chimique analogue à celle de la substance d'essai.

1.6.2. **Répétabilité**

Toutes les analyses doivent être répétées au moins deux fois. Les valeurs du log K_{oc} calculées à partir de résultats expérimentaux doivent être comprises dans un intervalle de 0,25 unité log.

1.6.3. **Reproductibilité**

L'expérience acquise jusqu'à présent en appliquant la méthode d'essai par HPLC vient en corroborer la validité. À l'issue d'une étude expérimentant 48 substances (en majorité des pesticides) pour lesquelles existaient des données fiables concernant le K_{oc} sur des sols, on a obtenu un coefficient de corrélation: R = 0,95 (10) (11).

Un essai comparatif interlaboratoires conduit par 11 laboratoires a permis d'améliorer et de valider la méthode (12). Tous les résultats sont reproduits au tableau 2 de l'appendice.

1.7. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.7.1. **Estimation préliminaire du coefficient d'adsorption**

Le coefficient de partage octanol/eau P_{ow} (= K_{ow}) et, dans une certaine mesure, l'hydrosolubilité peuvent servir d'indicateurs du degré d'adsorption, en particulier, pour les substances non ionisées. Ils permettent donc une première approximation des ordres de grandeur. Une série de corrélations utiles ont été publiées concernant plusieurs classes de produits chimiques (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Appareillage**

L'appareillage doit nécessairement comprendre un chromatographe en phase liquide équipé d'une pompe sans pulsations et d'un système de détection adapté. Il est recommandé d'utiliser une boucle d'injection munie d'une valve d'injection. Il faut employer des résines commerciales cyanopropyliques liées chimiquement sur une base de silice (Hypersil ou Zorbax CN, par exemple). Une colonne de garde du même matériau peut être insérée entre le système d'injection et la colonne d'analyse. La puissance de séparation des colonnes d'analyse est susceptible de varier énormément d'un fournisseur à l'autre. À titre indicatif, il faudrait atteindre les facteurs de capacité (k') suivants: log k' > 0,0 pour log K_{oc} = 3,0 et log k' > — 0,4 pour log K_{oc} = 2,0, en utilisant une phase mobile méthanol/eau 55/45 %.

1.7.3. **Phases mobiles**

Après avoir testé différentes phases mobiles, on recommande les deux suivantes:

— méthanol/eau (55/45 % v/v),

— méthanol/solution tampon de citrate 0,01 M à pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

Le solvant d'élution est préparé à partir de méthanol de qualité HPLC et d'eau distillée ou d'un tampon citrate. Le mélange est dégazé avant emploi. Il est préférable d'effectuer une élution isocratique. Si les mélanges méthanol/eau sont contre-indiqués, on peut essayer d'autres mélanges de solvant organique/eau, à savoir éthanol/eau ou acétonitrile/eau. Dans le cas de composés ionisants, il est recommandé d'utiliser une solution tampon afin de stabiliser le pH. Il faut veiller à éviter que les sels ne précipitent ou que la colonne ne se détériore, ce qui risque de se produire avec certains mélanges de phase organique/tampon.

On s'abstiendra d'utiliser des additifs tels que des réactifs à paires d'ions, car ils risquent d'affecter les propriétés sorbantes de la phase stationnaire. Vu que des modifications de cette nature dans la phase stationnaire risquent d'être irréversibles, il est impératif d'effectuer les analyses comportant ce type d'additifs sur des colonnes séparées.

1.7.4. **Solutés**

Les substances de référence et d'essai doivent être dissoutes dans la phase mobile.

1.8. RÉALISATION DE L'ESSAI

1.8.1. **Conditions expérimentales**

On doit enregistrer la température pendant les mesures. Il est fortement recommandé d'utiliser une colonne placée dans une enceinte thermorégulée afin de garantir des conditions de température constantes pendant les différents cycles d'étalonnage et d'évaluation et la mesure de la substance d'essai.

1.8.2. **Détermination du temps mort t_o**

On peut utiliser deux méthodes pour déterminer le temps mort t_o (voir également point 1.2).

1.8.2.1. *Détermination du temps mon t_o au moyen d'une série homologue*

Cette procédure a montré qu'il est possible d'obtenir des valeurs de t_o harmonisées et fiables. Pour sa description, il faut se reporter à la méthode d'essai A.8 «Coefficient de partage n-octanol/eau et méthode d'analyse par HPLC».

1.8.2.2. *Détermination du temps mort t_o par des substances inertes non retenues sur la colonne*

Cette technique met en jeu l'injection de solutions de formamide, d'urée ou de nitrate de sodium. Il convient de répéter les mesures au moins deux fois.

1.8.3. **Détermination des temps de rétention t_R**

Les substances de référence doivent être sélectionnées selon les indications du point 1.3. Pour déterminer leur temps de rétention, on peut les injecter sous la forme d'un étalon composite, à condition d'avoir vérifié au préalable que le temps de rétention de chaque étalon n'est pas influencé par la présence des autres étalons de référence. Il faudrait procéder à un étalonnage à intervalles réguliers, au moins deux fois par jour, pour tenir compte de toute variation imprévue dans le fonctionnement de la colonne. Pour la bonne règle, il est préférable d'injecter les étalons avant et après la substance d'essai pour s'assurer que les temps de rétention n'ont pas évolué. On injecte chaque substance d'essai séparément dans des proportions aussi faibles que possible (ce qui évite de surcharger la colonne}, puis on détermine son temps de rétention.

▼B

Afin d'accroître la fiabilité des mesures, toutes les déterminations doivent être effectuées au moins en double. Les valeurs de log K_{oc} déduites des résultats expérimentaux doivent être comprises dans un intervalle de 0,25 unité log.

1.8.4. **Évaluation**

Les facteurs de capacité k' sont calculés à partir du temps mort t_o et des temps de rétention t_R des substances de référence selon l'équation 4 (voir point 1.2). Les valeurs de log k' des substances de référence sont ensuite portées sur une courbe graphique en fonction des valeurs de leur log K_{oc} extraites des essais par agitation dont les résultats figurent aux tableaux 1 et 3 de l'appendice. À l'aide de cette courbe, la valeur du log K_{oc} d'une substance d'essai est calculée à partir de son log k'. Si les résultats expérimentaux montrent que le log K_{oc} de la substance sort de l'intervalle des valeurs d'étalonnage, il convient de recommencer l'essai en employant d'autres substances de référence plus appropriées.

2. **PRÉSENTATION DES DONNÉES**

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

— identité, degré de pureté et. le cas échéant, valeurs de pK_d des substances d'essai et de référence.

— description des matériels utilisés et des conditions expérimentales, en indiquant le type et les dimensions de la colonne d'analyse (et de la colonne de garde), du dispositif de détection, de la phase mobile (rapport des composants et pH), de la plage des températures pendant les mesures,

— temps mort et méthode appliquée pour l'évaluer,

— quantités de substances de référence et d'essai injectées dans la colonne,

— temps de rétention des composés de référence employés pour l'étalonnage,

— détails de la courbe de régression ajustée (log k' en fonction de log K_{oc}) et représentation graphique de cette courbe,

— valeurs moyennes de rétention et valeur estimée du log K_{oc} de la substance d'essai,

— chromatogrammes.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.

(3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 833-846.

(8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35-(1/2), pp. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 28 5-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

Appendice

Tableau 1

Comparaison entre les valeurs de K_{oc} sur les sols et les boues d'épuration et les valeurs calculées suivant la méthode de sélection par HPLC (1) (2)

Type de substance	Nº CAS	Log K_{oc} pour boues d'épuration	Lo Log K_{oc} par HPLC	Δ	Log Log K_{oc} pour sols	Lo Log K_{oc} par HPLC	Δ
Atrazine	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Phénanthrène	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoate de phényle	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamide	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamide	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acétanilide	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Aniline	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dichloroaniline	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

(1) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), pp. 121-128.
(2) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), pp. 107-119.

Tableau 2

Résultats des essais comparatifs inter-laboratoires (11 laboratoires participants) en vue d'améliorer et de valider la méthode par HPLC (1)

Type de substance	Nº CAS	Log K_{oc}		Log K_{oc}
		(OCDE 106)	[Méthode par HPLC|	
Atrazine	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthénol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

(1) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30 (7), pp. 1373-1384.

▼B

Tableau 3

Substances de référence recommandées pour des essais de sélection par HPLC d'après des données relatives à l'adsorption sur les sols

Substance de référence	Nº CAS	Valeurs moyennes de log K_{oc} d'après la méthode par agitation	Nombre de résultats pour le K_{oc}	Écart type du log	Source
Acétanilide	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Phénol	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-Nitrobenzamide	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N.N-diméthylbenzamide	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-Méthylbenzamide	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Benzoate de méthyle	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrazine	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-Nitrobenzamidc	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Aniline	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-Dinitrobenzamide	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Carbendazime	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadiménol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazoxyde	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazophos	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naphtalène	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfane-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Méthiocarbe	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-Trichlorobenzène	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fenchion	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
Direct Red 8 1	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pyrazophos	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
α-Endosulfane	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Diclofop-méthyle	i 51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Phénanthrène	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(a)
DDT	50-29-3	5,63	1		(b)

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmug; des orptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01044 (1994).
(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, pp. 285-304.
(c) Données communiquées par les industriels.

▼B

C.20. DAPHNIA MAGNA, ESSAI DE REPRODUCTION

1. MÉTHODE

La méthode décrite pour cet essai de reproduction reprend la ligne directrice nº 211 de l'OCDE (1998).

1.1. INTRODUCTION

Le principal objectif de l'essai consiste à évaluer l'effet de produits chimiques sur la capacité reproductrice de *Daphnia magna.*

1.2. DÉFINITIONS ET UNITÉS

Animaux parents: *Daphnia* femelles présentes au début de l'essai et dont la capacité reproductrice représente l'objet de cette étude.

Descendants: jeunes *Daphnia* engendrées par les animaux parents au cours de l'essai.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration d'essai la plus basse à laquelle on a observé un effet statistiquement significatif de la substance sur la reproduction et la mortalité des animaux parents (à $p < 0,05$) par rapport au témoin, durant une période d'exposition définie. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à ta CMEO doivent exercer un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Si ces deux conditions ne peuvent être remplies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la CMEO (et donc de la CSEO).

Concentration (maximale) sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO qui, comparée au témoin, n'a pas d'effet statistiquement significatif (à $p < 0,05$), durant une période d'exposition définie.

CE_x: concentration de la substance d'essai dissoute dans l'eau qui entraîne une diminution de x % de la reproduction chez *Daphnia magna*, durant une période d'exposition définie.

Taux intrinsèque d'accroissement: mesure de l'accroissement de la population qui intègre la capacité reproductrice et la mortalité par tranche d'âge (20) (21) (22). Cette valeur est nulle dans les populations à l'état sta-tionnaire, positive dans les populations en croissance et négative dans les populations qui régressent. Cette dernière catégorie de population n'est évidemment pas durable et est vouée en fin de compte à l'extinction.

Limite de détection: la plus basse concentration susceptible d'être détectée, mais non chiffrée.

Limite de détermination: la plus basse concentration susceptible d'être mesurée quantitativement.

Mortalité: un animal est noté comme mort lorsqu'il est immobile, autrement dit lorsqu'il n'est pas capable de nager ou si aucun mouvement des appendices ou du postabdomen n'est observé dans les 15 secondes qui suivent l'agitation douce du récipient d'essai. (Si on utilise une autre définition, celle-ci doit être stipulée avec sa référence.)

▼B

1.3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

De jeunes femelles *Daphnia* (les animaux parents), âgées de moins de 24 heures au début de l'essai, sont expo-secs à la substance d'essai ajoutée à l'eau à différentes concentrations. L'essai dure 21 jours. À la fin de l'essai, le nombre total de descendants vivants produits par animal parent survivant à la fin de l'essai est évalué. La capacité reproductrice des animaux parents peut s'exprimer autrement (par exemple, par le nombre de descendants vivants produits par animal et par jour, à partir du premier jour où des descendants ont été observés), mais ces résultats doivent être fournis en plus du nombre total de juvéniles engendrés par parent survivant à la fin de l'essai. La capacité reproductrice des animaux exposés à la substance d'essai est comparée à celle des témoins afin de déterminer la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et, de là, la concentration (maximale) sans effet observé (CSEO). De plus, dans toute la mesure du possible, les résultats sont analysés à l'aide d'un modèle de régression, en vue d'estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x % de la capacité reproductrice, c'est-à-dire la CE_x (par exemple, CE_{50}, CE_{20} ou CE_{10}).

Il faut aussi indiquer le taux de survie des animaux parents et le moment de la première portée. D'autres effets liés à la substance sur des paramètres tels que la croissance (par exemple, la longueur) et éventuellement le taux intrinsèque d'accroissement de la population peuvent aussi être examinés.

1.4. INFORMATIONS CONCERNANT LA SUBSTANCE D'ESSAI

Les résultats d'un essai de toxicité aiguë (voir méthode C.2, partie I) réalisé sur *Daphnia magna* devraient être disponibles. Ces résultats peuvent être utiles pour sélectionner une plage de concentrations d'essai adaptée aux essais de reproduction. La solubilité dans l'eau et la pression de vapeur de la substance d'essai doivent être connues. Il faudrait pouvoir disposer d'une méthode d'analyse fiable, dont le rendement et la limite de détermination sont connus, pour doser la substance dans les solutions d'essai.

Des informations sur la substance d'essai qui peuvent être utiles pour établir les conditions de l'essai comprennent la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pKa, le coefficient de partage n-octanol/eau (P_{oe}) et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir méthode C.4).

1.5. VALIDITÉ DE L'ESSAI

Pour que l'essai soit valable, les témoins doivent remplir les critères de performance suivants:

— la mortalité des animaux parents (*Daphnia* femelles) ne dépasse pas 20 % à la fin de l'essai,

— le nombre moyen de descendants vivants produits par animal parent survivant à la fin de l'essai est ≥ 60.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Appareillage**

Les récipients d'essai et les autres dispositifs qui entreront en contact avec les solutions d'essai doivent être entièrement en verre ou constitués d'une autre matière chimiquement inerte. On utilisera en principe des béchers en verre.

En outre, il sera nécessaire d'employer une partie ou la totalité du matériel suivant:

— un appareil pour mesurer la concentration de l'oxygène (à l'aide d'une microélectrode ou d'un autre dispositif destiné à mesurer l'oxygène dissous dans des échantillons de faible volume),

▼B

— un thermostat adéquat,

— un pH-mètre,

— un appareil pour mesurer la dureté de l'eau,

— un appareil pour déterminer la concentration de carbone organique total (COT) dans l'eau ou la demande chimique en oxygène (DCO),

— un dispositif approprié pour régler le régime d'éclairage et mesurer l'intensité lumineuse.

1.6.2. **Organisme d'essai**

L'espèce à utiliser dans cet essai est *Daphnia magna* Straus. D'autres espèces de *Daphnia* peuvent être utilisées à condition qu'elles remplissent les critères de validité pertinents (ceux qui concernent la capacité reproductrice des témoins doivent s'appliquer aux espèces de *Daphnia*). Si d'autres espèces de *Daphnia* sont utilisées, il y a lieu de les identifier clairement et de justifier leur utilisation.

Le clone devrait de préférence avoir été identifié d'après son génotype. La recherche (1) a montré que la capacité reproductrice du clone A (originaire de l'IRCHA, en France) (3) répond de façon stable au critère de validité qui stipule une moyenne de ≥ 60 descendants par animal parent survivant, lorsqu'il est élevé dans les conditions décrites dans la présente méthode. D'autres clones sont toutefois acceptables à condition de prouver que la culture de *Daphnia* remplit les critères de validité pour l'essai.

Au début de l'essai, les animaux doivent être âgés de moins de 24 heures et ne peuvent pas provenir d'une première génération de descendants. Ils doivent être issus d'un lot sain (c'est-à-dire qui ne présente pas de signes de stress, tels qu'une mortalité élevée, la présence de mâles et d'éphippies, un retard dans la production des premiers descendants, des animaux décolorés, etc.). Le lot d'animaux doit être maintenu dans des conditions de culture (lumière, température, milieu, alimentation et nombre d'animaux par unité de volume) semblables à celles qui seront appliquées au cours de l'essai. Si le milieu utilisé dans l'essai est différent de celui où sont normalement élevées les *Daphnia*, il convient de laisser aux *Daphnia* une période d'acclimatation, avant l'essai, qui dure habituellement quelque 3 semaines (c'est-à-dire une génération), afin d'éviter de stresser les animaux parents.

1.6.3. **Milieu d'essai**

Il est recommandé d'utiliser un milieu entièrement défini dans cet essai. Cela permet d'éviter le recours aux additifs (par exemple, algues, extraits de sol, etc.), qui sont difficiles à caractériser, et d'améliorer ainsi les possibilités de normalisation entre les laboratoires. Les milieux Elendt M4 (4) et M7 (voir appendice 1) se sont avérés pertinents à cette fin. D'autres milieux sont cependant acceptables [par exemple (5) et (6)], à condition que les *Daphnia* élevées dans ces milieux satisfassent aux critères de validité établis pour l'essai.

Si le milieu utilisé contient des additifs non définis, ceux-ci devraient être spécifiés clairement et le rapport d'essai devrait comporter des informations sur la composition, notamment la teneur en carbone, étant donné qu'elle peut contribuer au régime alimentaire fourni. On préconise de déterminer le carbone organique total (COT) et/ou la demande chimique en oxygène (DCO) de la solution mère de l'additif organique et d'estimer leur incidence sur le COT et la DCO du milieu d'essai. En outre, il est souhaitable que les concentrations de COT du milieu (c'est-à-dire avant l'ajout des algues) soient inférieures à 2 mg/l (7).

▼B

Lorsque l'on teste des substances contenant des métaux, il est important de savoir que les propriétés du milieu d'essai (par exemple, la dureté, le pouvoir de chélation) peuvent influer sur leur toxicité. C'est pourquoi il est souhaitable d'opérer dans un milieu entièrement défini. Néanmoins, dans l'état actuel des connaissances, les seuls milieux entièrement définis qui conviennent aux cultures à long terme de *Daphnia magna* sont Elendt M4 et M7. Ces deux milieux contiennent l'agent chélateur EDTA. Des travaux ont montré (2) que la «toxicité apparente» du cadmium est généralement inférieure lorsque l'essai de reproduction est effectué dans les milieux M4 et M7, que lorsqu'il est effectué dans des milieux ne contenant pas d'EDTA. M4 et M7 ne sont donc pas recommandés pour tester des substances contenant des métaux, de même que d'autres milieux contenant des agents chélateurs connus. Il est souhaitable d'utiliser un autre milieu pour les substances renfermant des métaux, par exemple l'eau douce calcaire reconstituée d'ASTM (7), qui ne contient pas d'EDTA, additionnée d'un extrait d'algues (8). La combinaison de l'eau douce calcaire reconstituée d'ASTM et de l'extrait d'algues convient également aux essais et aux cultures à long terme de *Daphnia magna* (2), bien qu'elle exerce encore une légère action chélatante à cause des matières organiques contenues dans l'extrait d'algues.

Au début de l'essai et durant celui-ci, la concentration d'oxygène dissous devrait être supérieure à 3 mg/l. Le pH devrait être compris entre 6 et 9, et ne devrait normalement pas varier de plus de 1,5 unité au cours d'un même essai. Une dureté supérieure à 140 mg/l (en $CaCO_3$) est recommandée. La capacité reproductrice des animaux dans les essais pratiqués à un niveau au moins égal à ce seuil s'est avérée conforme aux critères de validité (9) (10).

1.6.4. **Solutions d'essai**

Les solutions d'essai sont généralement amenées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. Les solutions mères devraient, de préférence, être préparées par dissolution de la substance dans le milieu d'essai.

Le recours à des dispersants ou solvants organiques peut quelquefois s'avérer nécessaire pour obtenir une solution mère à la concentration voulue, mais ces additifs doivent être évités dans toute la mesure du possible. Voici quelques exemples de solvants adéquats: acétone, éthanol, méthanol, diméthylformamide et triéthylè-neglycol. Parmi les dispersants recommandables, citons le Cremophor RH40, la méthylcellulose à 0,01 % et le HCO-40. En tout état de cause, la substance d'essai ne doit pas être testée au-delà de sa limite de solubilité dans le milieu d'essai.

Les solvants sont employés pour confectionner une solution mère qui peut être dosée avec précision dans l'eau. Les solvants énumérés ci-dessus, utilisés à la concentration recommandée dans le milieu d'essai final (≤ 0,1 ml/1), ne seront pas toxiques et n'augmenteront pas la solubilité de la substance dans l'eau.

Les dispersants peuvent faciliter le dosage précis et la dispersion. À la concentration recommandée dans le milieu d'essai final (≤ 0,1 ml/1), les dispersants mentionnés ci-dessus ne seront pas toxiques et n'augmenteront pas la solubilité de la substance dans l'eau.

▼B

1.7. CONCEPTION DE L'ESSAI

Les traitements sont répartis dans les récipients d'essai et toutes les manipulations ultérieures de ces récipients sont réalisées dans un ordre aléatoire, faute de quoi, les résultats pourraient présenter un biais qui risquerait d'être interprété comme un effet de la concentration. Notamment, si les unités expérimentales sont manipulées par ordre de traitement ou de concentration, certains effets liés au temps, comme la fatigue du manipulateur ou d'autres erreurs, pourraient avoir un impact plus prononcé aux concentrations supérieures. En outre, si les résultats de l'essai sont susceptibles d'être affectés par une condition initiale ou liée à l'environnement, comme la situation dans le laboratoire, il conviendra d'envisager un plan en blocs.

1.8. MODE OPÉRATOIRE

1.8.1. **Conditions d'exposition**

1.8.1.1. *Durée*

L'essai dure 21 jours.

1.8.1.2. *Charge*

Les animaux parents sont répartis individuellement dans les récipients d'essai contenant chacun 50-100 ml de milieu.

Il est parfois nécessaire d'avoir recours à des volumes plus importants afin de pouvoir appliquer la méthode d'analyse utilisée pour déterminer la concentration de la substance d'essai, bien qu'il soit aussi possible de mélanger les récipients de même concentration aux fins de l'analyse chimique. Si des volumes supérieurs à 100 ml sont employés, il faudra peut-être augmenter la ration distribuée aux *Daphnia*, afin que la nourriture disponible soit suffisante et que les critères de validité soient satisfaits. S'agissant des essais dynamiques, d'autres protocoles peuvent être envisagés pour des raisons techniques (par exemple, 4 groupes de 10 animaux dans des volumes expérimentaux plus élevés), mais toute modification du mode opératoire doit être signalée.

1.8.1.3. *Nombre d'animaux*

Pour les essais semi-statiques, on utilisera au moins 10 animaux répartis individuellement à chaque concentration d'essai et au moins 10 animaux répartis individuellement dans la série de témoins.

Pour les essais dynamiques, il s'avère approprié d'utiliser 40 animaux répartis en 4 groupes de 10 à chaque concentration d'essai (1). Un plus petit nombre d'animaux d'expérience peut être utilisé, mais on recommande d'employer au moins 20 animaux par concentration, répartis dans au moins 2 récipients contenant le même nombre d'animaux (par exemple, 4 récipients contenant 5 daphnies chacun). Notons que pour les essais où les animaux sont maintenus en groupe, il ne sera pas possible d'exprimer la capacité reproductrice en fonction du nombre total de descendants vivants produits par animal parent survivant à la fin de l'essai, si des animaux parents meurent. Auquel cas, il faudra exprimer la capacité reproductrice par «le nombre total de descendants vivants produits par parent présent au début de l'essai».

1.8.1.4. *Alimentation*

Dans les essais semi-statiques, on préconise d'administrer une ration quotidienne, ou au moins tri-hebdomadaire (ce qui correspond au renouvellement du milieu). Les écarts par rapport à cette fréquence (par exemple, dans les essais dynamiques) doivent être signalés.

▼B

Au cours de l'essai, le régime alimentaire des animaux parents devrait, de préférence, se composer d'algues unicellulaires vivantes appartenant à une ou plusieurs des espèces suivantes: *Chlorella* sp., *Selenastrum capricor-nutum* [renommée *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)] et *Scenedesmus subspicatus*. La nourriture devrait être dispensée en fonction de la teneur en carbone organique (C) fournie à chaque animal parent. La recherche (12) a montré que pour *Daphnia magna*, des teneurs comprises entre 0,1 et 0,2 mg de C/*Daphnia*/jour dans la ration alimentaire suffisaient pour produire le nombre de descendants requis selon les critères de validité. On peut fournir des rations à teneur constante tout au long de l'essai ou utiliser des teneurs plus faibles au début, que l'on augmentera afin de tenir compte de la croissance des animaux parents. Dans ce cas, la ration devrait toujours contenir entre 0,1 et 0,2 mg de C/*Daphnia*/jour, qui est la teneur recommandée.

Si des paramètres de remplacement, comme le nombre de cellules d'algues ou l'absorbance de la lumière, sont utilisés pour doser la teneur en carbone requise dans la ration alimentaire (pour des raisons pratiques, car la mesure de la teneur en carbone prend beaucoup de temps), chaque laboratoire est tenu de produire son propre nomogramme mettant en relation le paramètre de remplacement et la teneur en carbone de la culture d'algues (des conseils concernant l'établissement d'un nomogramme sont donnés à l'appendice 2). Les nomogrammes devraient être vérifiés au moins une fois par an, et plus souvent si les conditions de culture des algues ont changé. Il a été démontré que l'absorbance de la lumière donne une meilleure indication de la teneur en carbone que le nombre de cellules (13).

Il convient d'administrer une suspension d'algues concentrée aux *Daphnia*, afin de réduire au minimum le volume du milieu de culture des algues transféré dans les récipients d'essai. On peut concentrer les algues par centrifugation, puis remise en suspension dans de l'eau distillée, de l'eau désionisée ou le milieu de culture des *Daphnia*.

1.8.1.5. *Lumière*

16 heures de lumière à une intensité ne dépassant pas 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

1.8.1.6. *Température*

La température des milieux d'essai devrait être comprise entre 18 et 22 °C. Néanmoins, dans un même essai, la température ne devrait pas, si possible, varier de plus de 2 °C au sein de cet intervalle (par exemple, 18-20, 19-21 ou 20-22 °C). Il peut être utile d'utiliser un récipient d'essai supplémentaire pour surveiller la température.

1.8.1.7. *Aération*

Les récipients d'essai ne doivent pas être aérés durant l'essai.

1.8.2. **Concentrations d'essai**

Il faudrait normalement utiliser au moins 5 concentrations d'essai formant une série géométrique, de préférence espacées d'un facteur n'excédant pas 3,2. Il convient d'utiliser un nombre approprié de répliques pour chaque concentration d'essai (voir point 1.8.1.3). L'utilisation de moins de 5 concentrations doit être justifiée. Les substances ne devraient pas être testées au-delà de leur limite de solubilité dans le milieu d'essai.

▼B

Lors de la détermination de la plage de concentrations, il convient de tenir compte des éléments suivants:

i) si l'on cherche à déterminer la CMEO et la CSEO, la plus faible concentration testée doit être suffisamment basse pour que le taux de fécondité à cette concentration ne soit pas significativement plus bas que celui du groupe témoin. Dans le cas contraire, il faudra recommencer l'essai en abaissant la concentration la plus basse;

ii) si l'on cherche à déterminer la CMEO et la CSEO, la plus forte concentration testée devra être suffisamment élevée pour que le taux de fécondité à cette concentration soit significativement inférieur à celui du groupe témoin. Dans le cas contraire, il faudra recommencer l'essai en augmentant la concentration la plus forte;

iii) si l'on veut estimer la CE_x relative aux effets sur la reproduction, il est conseillé d'utiliser des concentrations suffisantes pour définir cette CE_x avec un niveau de confiance satisfaisant. Si l'on évalue la CE_{50} relative aux effets sur la reproduction, il est souhaitable que la concentration d'essai la plus forte soit supérieure à cette CE_{50}. Si tel n'est pas le cas, on pourra toujours estimer la CE_{50}, mais l'intervalle de confiance sera très large et on risque de ne pas être en mesure d'évaluer la pertinence du modèle;

iv) il vaut mieux éviter d'inclure dans la plage des concentrations d'essai celles qui ont un effet statistiquement significatif sur la survie des adultes parce que, ce faisant, on modifierait la nature de l'essai qui passerait d'un simple essai de reproduction à un essai combiné de reproduction et de mortalité, ce qui exige une analyse statistique bien plus complexe.

Une connaissance préalable de la toxicité de la substance d'essai (résultant d'une étude de toxicité aiguë et/ou d'études de détermination de l'ordre de grandeur) devrait faciliter la sélection de concentrations d'essai pertinentes.

Lorsqu'un solvant ou un dispersant est utilisé pour faciliter la préparation des solutions d'essai (voir point 1.6.4), sa concentration finale dans les récipients d'essai ne doit pas dépasser 0,1 ml/l et doit être identique dans tous les récipients d'essai.

1.8.3. **Témoins**

Il faudrait tester une série de témoins du milieu d'essai et, le cas échéant, une série de témoins contenant le solvant ou le dispersant, parallèlement aux séries traitées avec la substance d'essai. Le cas échéant, la concentration du solvant ou du dispersant doit être identique à celle utilisée dans les récipients contenant la substance d'essai. Il convient d'utiliser un nombre approprié de répliques (voir point 1.8.1.3).

Généralement, dans un essai correctement mené, le coefficient de variation autour du nombre moyen de descendants vivants produits par animal parent dans le ou les groupes témoins devrait être $\leq$ 25 %, et cette information doit être communiquée pour les essais où les animaux sont maintenus dans des récipients individuels.

1.8.4. **Renouvellement du milieu d'essai**

La fréquence de renouvellement du milieu dépend de la stabilité de la substance d'essai, mais devrait être au moins trihebdomadaire. Si les essais préliminaires de stabilité (voir point 1.4) montrent que la concentration de la substance d'essai n'est pas stable (c'est-à-dire en dehors de la fourchette de 80-120 % de la concentration nominale ou inférieure à 80 % de la concentration initiale mesurée) durant la période de renouvellement la plus longue (3 jours), il faut envisager de renouveler le milieu plus fréquemment ou de pratiquer un essai dynamique.

▼B

Lors du renouvellement du milieu dans les essais semi-statiques, on prépare une deuxième série de récipients d'essai en vue d'y transférer les animaux parents avec, par exemple, une pipette en verre d'un diamètre approprié. Le volume de milieu transféré avec les *Daphnia* doit être le plus petit possible.

1.8.5. **Observations**

Les résultats des observations effectuées durant l'essai doivent être consignés dans des fiches de données (voir exemples aux appendices 3 et 4). Si d'autres mesures s'imposent (voir points 1.3 et 1.8.8), des observations supplémentaires pourront être requises.

1.8.6. **Descendants**

Les descendants engendrés par chaque animal parent devraient de préférence être retirés et comptés quotidiennement, dès la première portée, pour ne pas qu'ils consomment la nourriture destinée aux adultes. Aux fins de la présente méthode, il ne faut compter que les descendants vivants, mais la présence d'œufs avortés ou de descendants morts doit être signalée.

1.8.7. **Mortalité**

La mortalité des animaux parents doit être notée, de préférence quotidiennement, et au moins à chaque comptage des descendants.

1.8.8. **Autres paramètres**

Bien que la présente méthode vise avant tout à évaluer les effets sur la reproduction, il se peut que d'autres effets soient suffisamment quantifiés pour se prêter à l'analyse statistique. La mesure de la croissance est très intéressante, puisqu'elle fournit des indications sur les éventuels effets sublétaux, ce qui peut se révéler plus utile que les seules données de reproduction. On préconise de mesurer la longueur des animaux parents (la longueur du corps sans l'épine anale) à la fin de l'essai. D'autres paramètres peuvent être mesurés ou calculés: le moment de la première portée (et des portées suivantes), le nombre et la taille des portées par animal, le nombre de portées avortées, la présence de mâles ou d'éphippies et, éventuellement, le taux intrinsèque d'accroissement de la population.

1.8.9. **Fréquence des analyses quantitatives et des mesures**

La concentration d'oxygène, la température, la dureté et le pH doivent être mesurés au moins une fois par semaine, avant et après le renouvellement des milieux, chez les témoins et dans les récipients qui renferment la concentration la plus élevée de la substance d'essai.

Au cours de l'essai, les concentrations de la substance à tester sont déterminées à intervalles réguliers.

Dans les essais semi-statiques, où l'on suppose que la concentration de la substance d'essai ne s'écartera pas de plus de 20 % de la concentration nominale (c'est-à-dire qu'elle restera comprise dans un intervalle de 80 à 120 % — voir points 1.4 et 1.8.4), on recommande, au minimum, d'analyser les concentrations d'essai la plus élevée et la plus basse juste après leur préparation et au moment de leur renouvellement au cours de la première semaine de l'essai (les analyses devraient être pratiquées sur des échantillons prélevés dans la même solution, juste après la préparation de la solution et au moment du renouvellement). Ces déterminations devraient ensuite être répétées selon une fréquence au moins hebdomadaire.

▼B

S'agissant des essais où la concentration n'est pas supposée demeurer dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale, il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations d'essai, juste après leur préparation et au moment du renouvellement. Cependant, pour les essais où la concentration initiale mesurée de la substance d'essai sort de l'intervalle de ± 20 % de la concentration nominale, mais pour lesquels on peut montrer de façon suffisamment convaincante que les concentrations initiales sont répétables et stables (c'est-à-dire comprises dans un intervalle de 80 à 120 % des concentrations initiales), les déterminations chimiques pourraient se limiter durant les deuxième et troisième semaines aux concentrations d'essai la plus élevée et la plus basse. En tout état de cause, la détermination de la concentration de la substance d'essai avant le renouvellement ne doit être effectuée que sur une seule réplique de chaque concentration d'essai.

Si on pratique un essai dynamique, il convient de recourir à un régime de prélèvements identique à celui décrit pour les essais semi-statiques (mais l'analyse des solutions «anciennes» ne s'applique pas ici). Toutefois, il peut être souhaitable d'augmenter le nombre de prélèvements durant la première semaine (par exemple, trois séries de mesures) afin de vérifier la stabilité des concentrations d'essai. Dans ces types d'essai, le débit du diluant et de la substance d'essai doivent être contrôlés chaque jour.

S'il s'avère que la concentration de la substance d'essai a pu être correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % de la concentration initiale mesurée ou nominale, les résultats peuvent être déduits des valeurs initiales mesurées ou nominales. Si l'écart par rapport à la concentration initiale mesurée ou nominale est supérieur à ± 20 %, les résultats devraient être exprimés par rapport à la moyenne pondérée en fonction du temps (voir appendice 5).

2. RÉSULTATS ET RAPPORT

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

L'objectif de cet essai est de déterminer l'effet de la substance à tester sur le nombre total de descendants vivants produits par animal parent survivant à la fin de l'essai. Le nombre total de descendants par animal parent doit être calculé pour chaque récipient d'essai (autrement dit, pour chaque récipient de même concentration). Si, dans un récipient, un animal parent meurt durant l'essai ou se révèle être un mâle, ce récipient est exclu de l'analyse. L'analyse reposera alors sur un nombre réduit de récipients de même concentration.

Pour l'estimation de la CMEO et, par conséquent, de la CSEO relatives aux effets du produit chimique sur la capacité reproductrice, il est nécessaire de calculer la moyenne de la capacité reproductrice à chaque concentration pour tous les récipients, ainsi que l'écart type résiduel groupé, et ce calcul peut être effectué à l'aide de l'analyse de la variance. La moyenne pour chaque concentration doit ensuite être comparée à la moyenne pour les témoins, par une méthode appropriée de comparaisons multiples. Les tests de Dunnett ou de Williams peuvent convenir (14) (15) (16) (17). 11 est nécessaire de vérifier l'hypothèse (de l'analyse de la variance) concernant l'homogénéité de la variance. On recommande d'effectuer cette vérification sur un graphique plutôt que par un test formel de signification (18); le test de Barlett convient également. Si cette hypothèse n'est pas vérifiée, il faut envisager de transformer les résultats afin d'homogénéiser les variances avant d'effectuer l'analyse de la variance ou de réaliser une analyse de la variance pondérée. La grandeur de l'effet détectable par l'analyse de la variance (c'est-à-dire la plus petite différence significative) devrait être calculée et figurer dans le rapport.

▼B

Four estimer la concentration qui provoquerait une réduction de 50 % de la capacité reproductrice (CE_{50}), une courbe adéquate, comme la courbe logistique, devrait être ajustée aux résultats au moyen d'une méthode statistique telle que les moindres carrés. La courbe pourrait être paramétrée de manière que la CE_{50} et son écart type puissent être estimés directement. Cela faciliterait considérablement le calcul des limites de confiance de la CE_{50}. À moins d'avoir de bonnes raisons de préférer d'autres niveaux de confiance, il convient d'opter pour des limites de confiance de 95 % de part et d'autre. La procédure d'ajustement devrait, de préférence, permettre d'évaluer la signification du manque d'ajustement. Cela peut se faire graphiquement ou en recherchant la part du manque d'ajustement et la part des erreurs proprement dites dans la somme des carrés des résidus et en pratiquant un test de signification pour le manque d'ajustement. Comme les traitements qui entraînent un taux de fécondité élevé sont susceptibles de donner lieu à une plus grande variance dans le nombre de juvéniles produits que les traitements diminuant le taux de fécondité, il faudrait envisager de pondérer les valeurs observées afin de refléter les diverses variances dans les différents groupes traités (voir référence 18).

Dans l'analyse des données obtenues à partir de l'essai tournant final (2), une courbe logistique a été ajustée à l'aide du modèle suivant, mais d'autres modèles conviennent également:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

où:

Y = est le nombre total de juvéniles par anima! paient survivant à la fin de l'essai (calculé pour chaque récipient)

x = est la concentration de la substance

c = est le nombre escompté de juvéniles lorsque x = 0

x_0 = est la CE_{50} dans la population

b = est le paramètre caractérisant la pente

Ce modèle devrait convenir dans un grand nombre de situations, mais pas dans toutes. Il faudrait vérifier la validité du modèle comme indiqué ci-dessus. Dans certains cas. il pourrait être approprié d'utiliser un modèle d'hormèse dans lequel les basses concentrations donnent des effets plus marqués (19).

D'autres effets liés à la concentration, comme la CE_{10} ou la CE_{20}, peuvent également être estimés, mais il faudra probablement paramétrer le modèle autrement que dans le cas de la CE_{50}.

2.2. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes:

2.2.1. **Substance d'essai**

— État physique et propriétés physico-chimiques pertinentes,

▼B

— données permettant l'identification chimique, y compris la pureté.

2.2.2. **Espèce d'expérience**

— Clone (préciser si son génotype a été déterminé), fournisseur ou source (quand elle est connue) et conditions de culture appliquées. Si l'on utilise une espèce autre que *Daphnia magna,* il faut le signaler et le justifier.

2.2.3. **Conditions d'essai**

— Mode opératoire utilisé (par exemple, semi-statique ou dynamique, volume, charge en nombre de *Daphnia* par litre),

— photopériode et intensité lumineuse,

— plan de l'essai (par exemple, nombre de récipients de même concentration, nombre de parents par récipient),

— détails du milieu de culture employé,

— le cas échéant, ajout de matière organique (préciser la composition, la source, la méthode de préparation, le COT et la DCO des solutions mères, une estimation du COT et de la DCO résultants dans le milieu d'essai,

— informations détaillées concernant l'alimentation, notamment quantité (en mg de C/*Daphnia*/jour) et programme (par exemple, type d'aliment(s), y compris, pour les algues, le nom de l'espèce et, si elles sont connues, la variété et les conditions de culture),

— méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (la nature et la concentration du solvant ou du dispersant doivent être indiquées, le cas échéant).

2.2.4. **Résultats**

— Résultats des éventuelles études préliminaires sur la stabilité de la substance d'essai,

— concentrations d'essai nominales et résultats de toutes les analyses permettant de déterminer la concentration de la substance d'essai dans les récipients d'essai (l'appendice 4 fournit des exemples de fiches de données); le rendement de la méthode et sa limite de détermination devraient aussi être mentionnés,

— qualité de l'eau dans les récipients d'essai (pH, température, concentration d'oxygène dissous, COT et/ou DCO et dureté, le cas échéant) (l'appendice 3 fournit un exemple de fiche de données),

— dénombrement complet des descendants vivants de chaque animal parent (voir exemple de fiche de données à l'appendice 3),

— nombre et dates des décès chez les animaux parents (voir exemple de fiche de données à l'appendice 3),

— coefficient de variation de la fécondité chez les témoins (en fonction du nombre total de descendants vivants par animal parent survivant à la fin de l'essai),

— graphique représentant le nombre total de descendants vivants par animal parent survivant (pour chaque récipient de même concentration) à la fin de l'essai, en fonction de la concentration de la substance d'essai,

— concentration minimale avec effet observé (CMEO) sur la reproduction, y compris une description des méthodes statistiques utilisées et une indication de la grandeur de l'effet qui a pu être détecté, et concentration (maximale) sans effet observé (CSEO) sur la reproduction; s'il y a lieu, mentionner également la CMEO et la CSEO sur la mortalité des animaux parents,

▼B

— s'il y a lieu, CE_x pour la reproduction et intervalles de confiance, ainsi qu'un graphique du modèle ajusté employé pour ces calculs, la pente de la courbe dose-effet et son écart type,

— autres effets biologiques observés ou mesurés: indiquer tout autre effet biologique observé ou mesuré (par exemple, croissance des animaux parents) avec justification appropriée, le cas échéant,

— justification de tout écart par rapport à la présente méthode d'essai.

3. **BIBLIOGRAPHIE**

(1) OECD Test Guideline Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.

(2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.

(3) Baird D. J., Barber J., Bradley M. C., Soares A. M. V. M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of Daphnia magna Strauss. Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, pp. 257-265.

(4) Elendt B. P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia *magna* Straus. Protoplasma, 154, pp. 25-33.

(5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth éd.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

(6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. Toxicol, 47, pp. 775-782.

(7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

(8) Baird D. J., Soares A. M. V. M., Girling A., Barber J., Bradley M. C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of Daphnia magna Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the lst European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H. Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.), pp. 144-148.

(9) Parkhurst B. R., Forte J. L. and Wright G. P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, pp. 1-8.

(10) Cowgill U. M. and Milazzo D. P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), pp. 185-196.

(11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

(12) Sims I. R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard Daphnia juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, pp. 2053-2058.

▼B

(13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, pp. 459-466.

(14) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096-1121.

(15) Dunnett C. W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(16) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp. 103-117.

(17) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, pp. 510-531.

(18) Draper N. R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, pp. 93-96.

(20) Wilson E. O. and Bossert, W. H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

(21) Poole R. W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. McGraw-Hill Series in Population Biology, New York, pp. 5 32.

(22) Meyer J. S., Ingersoll C. G., McDonald L. L. and Boyce M. S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, pp. 1156-1166.

▼B

Appendice 1

PRÉPARATION DE MILIEUX ELENDT M7 ET M4 ENTIÈREMENT DÉFINIS

Acclimatation aux milieux Elendt M7 et M4

Certains laboratoires ont éprouvé des difficultés à transférer directement les *Daphnia* dans les milieux M4 (1) et M7. Ils ont toutefois obtenu certains résultats en procédant à une acclimatation progressive, c'est-à-dire en transférant les animaux de leur milieu vers un milieu à 30 % d'Elendt, puis à 60 % d'Elendt et enfin à 100 % d'Elendt. La période d'acclimatation peut prendre jusqu'à un mois.

PRÉPARATION

Éléments en traces

Différentes solutions mères (1), contenant chacune une seule substance en traces, sont tout d'abord préparées avec une eau d'une pureté adéquate, par exemple de l'eau désionisée, distillée ou obtenue par osmose inverse. À partir de ces différentes solutions mères (1), on prépare une deuxième solution mère unique (II) renfermant toutes les substances en traces (solution combinée), à savoir:

Solutions mères I (substance unique)	Quantité ajoutée à l'eau (mg/l)	Concentration (par rapport au milieu M4) (fois)	Pour préparer la solution mère combinée II, ajouter la quantité suivante de solution mère I à l'eau (ml/l)	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2$ * 4 H_2O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2$ * 6 H_2O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na_2MoO_4 * 2 H_2O	1 260	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2$ * 2 H_2O	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2$ * 6 H_2O	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
Na_2EDTA * 2 H_2O	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4$ * 7 H_2O	1 991	2 000	—	—

Les solutions de Na_2EDTA et de $FeSO_4$ sont préparées séparément, puis mélangées et immédiatement autoclavées. Cela donne:

Solution 21 Fe-EDTA		1 000	20,0	5,0

▼B

Milieux M4 et M7

Les milieux M4 et M7 sont préparés à partir de la solution mère II, des macronutriments et des vitamines suivants:

	Quantité ajoutée à l'eau (mg/l)	Concentration (par rapport au milieu M4) (fois)	Quantité de solution mère ajoutée pour préparée le milieu (ml/l)	
			M 4	M 7
Solution mère II (combinaison de substances en traces)		20	50	50
Solutions mères contenant les macronutriments (une substance par solution)				
$CaCl_2$ * 2 H_2O	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4$ * 7 H_2O	246 600	2 000	0,5	0,5
KC1	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
Na_2SiO_3 * 9 H_2O	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1
Solution mère de vitamines combinées	—	10 000	0,1	0,1
La solution mère de vitamines combinées est préparée en additionnant 3 vitamines à 1 litre d'eau, comme indiqué ci-dessous:				
Chlorhydrate de thyamine	750	10 000	—	—
Cyanocobalamine (B_{12})	10	10 000	—	—
Biotine	7,5	10 000	—	—

La solution mère de vitamines combinées est congelée par petites parties aliquotes. Les vitamines sont ajoutées au milieu peu de temps avant son utilisation.

Notes: Afin d'éviter la précipitation des sels lors de la préparation du milieu complet, il faut ajouter les parties aliquotes de solution mère à quelque 500-800 ml d'eau désionisée et amener le volume à 1 litre.

La première publication relative au milieu M4 se trouve dans Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma. 154, pp. 25-33.

▼B

Appendice 2

ANALYSE DE LA TENEUR EN CARBONE ORGANIQUE TOTAL (COT) ET ÉTABLISSEMENT D'UN NOMOGRAMME POUR LA TENEUR EN COT DES ALIMENTS À BASE D'ALGUES

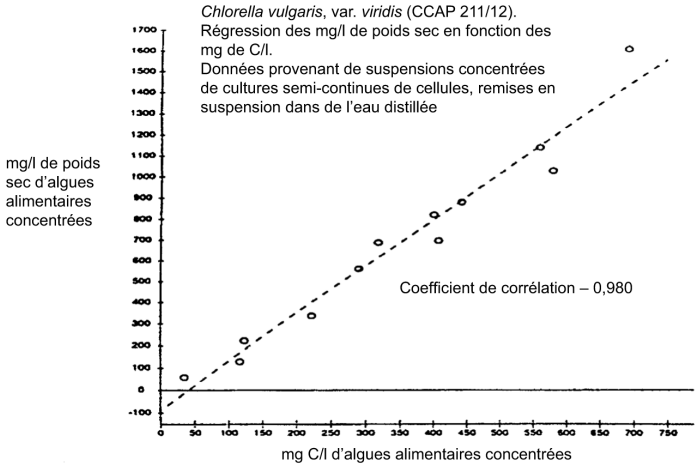
Il est admis que la teneur en carbone des algues alimentaires n'est généralement pas mesurée directement, mais déduite de corrélations (par nomogramme) avec des paramètres de remplacement comme le nombre de cellules d'algues ou l'absorbanec de la lumière.

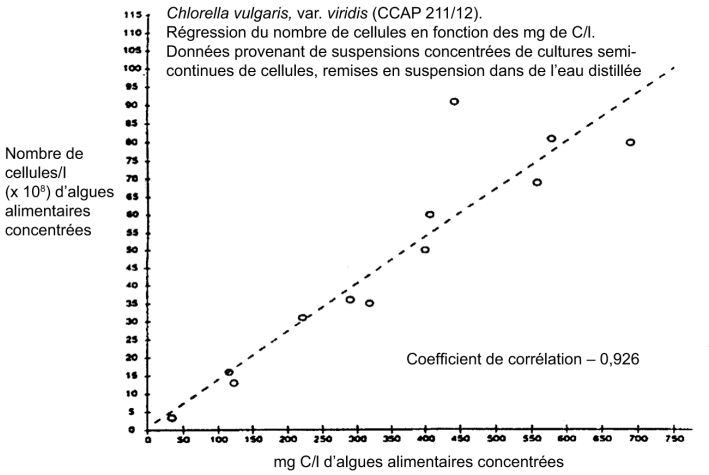
Il faudrait mesurer le COT par oxydation à haute température plutôt que par les méthodes aux UV ou au persulfate (voir: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WCIV 6HB).

Pour établir le nomogramme, il y a lieu d'isoler les algues du milieu de croissance par une centrifugation suivie d'une remise en suspension dans de l'eau distillée. On mesure le paramètre de remplacement et la teneur en COT dans chaque échantillon, produit en triple exemplaire. Les témoins contenant uniquement de l'eau distillée devraient être analysés et la teneur en COT déduite de celle de l'échantillon contenant les algues.

Les nomogrammes devraient être linéaires sur la plage prescrite des concentrations de carbone. Des exemples sont présentés ci-dessous.

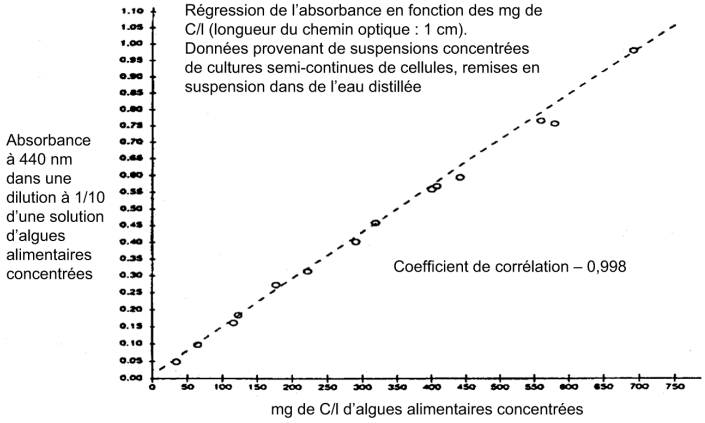
NB: Ne pas utiliser pour les conversions; il est essentiel que les laboratoires établissent leurs propres nomogrammes.





▼B

Chlorella vulgaris, var. *viridis* (CCAP 112/12).
Régression de l'absorbance en fonction des mg de C/l (longueur du chemin optique : 1 cm).
Données provenant de suspensions concentrées de cultures semi-continues de cellules, remises en suspension dans de l'eau distillée



▼B

Appendice 3

EXEMPLE DE FICHE POUR CONSIGNER LE RENOUVELLEMENT DU MILIEU, LES DONNÉES DE SURVEILLANCE PHYSICO-CHIMIQUES, L'ALIMENTATION, LA REPRODUCTION DES *DAPHNIA* ET LA MORTALITÉ DES ADULTES

Expérience n^0:	Date de départ:			Clone:			Milieu:				Type d'alimentation:			Substance d'essai:				Concentration nominale						
Jour	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Renouvellement du milieu (cocher)																								
PH ([1])																							Nouveau	
																							Ancien	
O_2 mg/l ([1])																							Nouveau	
																							Ancien	
Température (^oC) ([1])																							Nouveau	
																							Ancien	
Alimentation fournie (cocher)																								
Nombre de descendants vivants ([2])																								Total
Récipient 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

2008R0440 — FR — 22.03.2014 — 004.001 — 1124

▼B

Expérience n^0:	Date de départ:	Clone:	Milieu:	Type d'alimentation:	Substance d'essai:	Concentration nominale

Jour	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Total	
Mortalité cumulée des adultes ([3])																								

([1]) Indiquer quel récipient a été utilisé pour l'expérience.
([2]) Indiquer la mortalité de tout animal adulte par la lettre «M» dans la case appropriée.
([3]) Indiquer les portées avortées par les lettres «AB» dans la case appropriée.

▼B

Appendice 4

EXEMPLE DE FICHE DE DONNÉES POUR CONSIGNER LES RÉSULTATS DES ANALYSES CHIMIQUES

a) **Concentrations mesurées**

Concentration nominale	Échantillon prélevé durant la première semaine		Échantillon prélevé durant la deuxième semaine		Échantillon prélevé durant la troisième semaine	
	Après renouvellement	Avant renouvellement	Après renouvellement	Avant renouvellement	Après renouvellement	Avant renouvellement

b) **Concentrations mesurées en pourcentage de la concentration nominale**

Concentration nominale	Échantillon prélevé durant la première semaine		Échantillon prélevé durant la deuxième semaine		Échantillon prélevé durant la troisième semaine	
	Après renouvellement	Avant renouvellement	Après renouvellement	Avant renouvellement	Après renouvellement	Avant renouvellement

▼B

Appendice 5

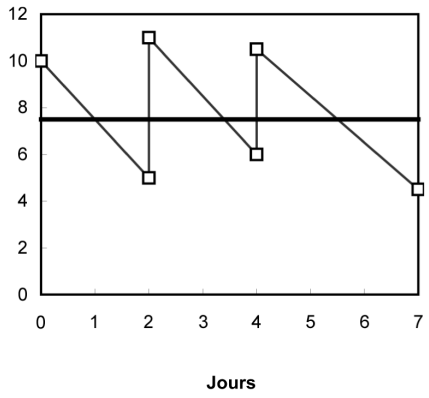
CALCUL D'UNE MOYENNE PONDÉRÉE DANS LE TEMPS

Moyenne pondérée dans le temps

Étant donné que la concentration de la substance d'essai peut diminuer au cours de la période comprise entre deux renouvellements du milieu, il est nécessaire de rechercher la concentration qui devrait être considérée comme représentative de la plage des concentrations appliquées aux *Daphnia* parents. Le choix devrait être guidé par des considérations tant biologiques que statistiques. Si on estime, par exemple, que les effets sur la reproduction sont surtout sensibles à la concentration maximale, il faut utiliser la concentration maximale. Si, par contre, on juge que c'est l'effet cumulé ou à long terme de la substance toxique qui est prépondérant, il est plus pertinent d'utiliser une concentration moyenne. Dans ce cas, la concentration moyenne pondérée dans le temps convient, puisqu'elle tient compte de la variation de la concentration instantanée en fonction du temps.

Figure 1

Exemple de moyenne pondérée dans le temps



La figure 1 représente un essai (simplifié), d'une durée de 7 jours, avec renouvellement du milieu aux jours 0, 2 et 4.

— La ligne fine en zigzag représente la concentration en fonction du temps. La concentration est censée diminuer sui vant un schéma de décroissance exponentielle.

— Les six points portés sur le graphique représentent les concentrations mesurées au début et à la fin de chaque période de renouvellement.

— La ligne épaisse représente la moyenne pondérée dans le temps.

La moyenne pondérée dans le temps est calculée de façon que l'aire sous la moyenne pondérée dans le temps soit égale à l'aire sous la courbe de concentration. Le calcul correspondant a l'exemple Ci-dessus est illustré dans le tableau 1.

▼B

Tableau 1

Calcul de la moyenne pondérée dans le temps

Renouvellement nº	Jours	Conc. 0	Conc. 1	Ln (Conc. 0)	Ln (Conc. 1)	Aire
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Nombre total de jours: 7					Aire totale	50,091
					Moyenne PT	7,156

«Jours» correspond au nombre de jours de la période de renouvellement.

«Conc. 0» est la concentration mesurée au début de chaque période de renouvellement.

«Conc. 1» est la concentration mesurée à la fin de chaque période de renouvellement,

«Ln (Conc. 0)» est le logarithme népérien de Conc. 0.

«Ln (Conc. 1)» est le logarithme népérien de Conc. 1.

«Aire» est l'aire sous la courbe exponentielle correspondant à chaque période de renouvellement. Elle se calcule par la formule suivante:

$$Aire = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0) - Ln(Conc1)} \times jours$$

La moyenne pondérée dans «moyenne PT» est l'«aire totale» divisée par le «nombre total de jours».

Bien entendu, dans le cas de l'essai de reproduction chez *Daphnia*, le tableau devrait être complété jusqu'à 21 jours.

Il est clair que lorsque les observations ne sont faites qu'au début et à la fin de chaque période de renouvellement, il n'est pas possible d'affirmer avec certitude que la baisse de concentration est effectivement exponentielle. Une courbe différente donnerait lieu à un calcul différent de l'aire. Cependant, une baisse de concentration exponentielle est plausible et constitue probablement la meilleure courbe à utiliser en l'absence d'autres informations.

Il convient toutefois d'être prudent si l'analyse chimique ne détecte aucune substance à la fin de la période de renouvellement. À moins de pouvoir estimer la vitesse à laquelle la substance a disparu de la solution, il est impossible d'obtenir une aire sous la courbe réaliste et, partant, une moyenne pondérée dans le temps qui soit raisonnable.

▼B

C.21. MICRO-ORGANISMES DU SOL: ESSAI DE TRANSFORMATION DE L'AZOTE

1. MÉTHODE

La présente méthode d'essai reprend l'essai TG 216 (2000) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode d'essai décrit une méthode de laboratoire conçue pour étudier les effets à long terme des substances chimiques, après une exposition unique, sur l'activité de transformation de l'azote par les micro-organismes du sol. L'essai s'appuie principalement sur les recommandations de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (1). Toutefois, d'autres lignes directrices, notamment celles du Biologische Bundesanstalt allemand (2), de l'agence de protection de l'environnement des États-Unis (3) de la SETAC (4) et de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) (5), ont également été prises en considération. Lors d'un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, qui s'est tenu à Belgirate, Italie, en 1995 (6), le nombre et le type de sols à utiliser dans le cadre de cet essai ont été définis. Les recommandations relatives au prélèvement, à la manipulation et au stockage des échantillons de sol s'appuient sur des lignes directrices de l'ISO (7) et sur les recommandations de l'atelier de Belgirate. Pour déterminer et évaluer les caractéristiques toxiques des substances d'essai, il peut être nécessaire de déterminer leurs effets sur l'activité microbienne du sol, par exemple lorsqu'il est nécessaire de disposer de données sur les effets secondaires potentiels des produits phytosanitaires sur la microflore du sol ou bien en cas de risque d'exposition des micro-organismes du sol à des substances chimiques autres que les produits phytosanitaires. L'essai de transformation de l'azote est effectué pour déterminer les effets de ces substances chimiques sur la microflore du sol. Si l'essai porte sur des produits agrochimiques (produits phytosanitaires, engrais, produits chimiques sylvicoles), deux essais sont effectués: l'essai de transformation de l'azote et l'essai de transformation du carbone. S'il s'agit d'autres substances que les produits agrochimiques, l'essai de transformation de l'azote suffit. Toutefois, si les valeurs CE_{50} de l'essai de transformation de l'azote relatives à ces substances chimiques correspondent à celles des inhibiteurs de la nitrification commerciaux (nitrapyrine), un essai de transformation du carbone peut être effectué afin d'obtenir des informations complémentaires.

Les sols sont formés de composés vivants et non vivants qui existent sous forme de mélanges complexes et hétérogènes. Les micro-organismes jouent un rôle important dans la décomposition et la transformation de la matière organique en sol fertile et un grand nombre d'espèces contribuent aux différents aspects de la fertilisation des sols. Toute interférence à long terme avec ces processus biochimiques risque de perturber le cycle des éléments nutritifs et par conséquent d'altérer la fertilité du sol. La transformation du carbone et de l'azote se produit dans tous les sols fertiles. Bien que les colonies microbiennes responsables de ces processus diffèrent d'un sol à un autre, les voies de transformation sont identiques pour l'essentiel.

La méthode d'essai décrite ici est conçue pour détecter les effets nocifs à long terme d'une substance sur le processus de transformation de l'azote à la surface aérobie des sols. La méthode d'essai permet également d'estimer les effets des substances sur la transformation du carbone par la microflore du sol. La formation de nitrate se produit par suite de la dégradation des liaisons carbone-azote. Par conséquent, si l'on trouve des taux identiques de production de nitrate dans des sols traités et dans les sols témoins, il est très probable que les voies de dégradation principales du carbone soient intactes et fonctionnelles. Le substrat choisi pour l'essai (farine de luzerne en poudre) présente un bon rapport carbone-azote (généralement entre 12/1 et 16/1). De ce fait, la carence en carbone est réduite pendant l'essai et si la population microbienne est endommagée par une substance chimique, elle peut se reconstituer dans un délai de 100 jours.

▼B

Les essais à partir desquels la présente méthode d'essai a été mise au point étaient conçus avant tout pour des substances dont il est possible d'estimer la quantité qui pénètre dans le sol. C'est le cas par exemple, des produits phytosanitaires dont la dose d'application dans le champ est connue. Pour les produits agrochimiques, il suffit de pratiquer un essai sur deux doses correspondant au taux d'application prévu ou estimé. Les produits agrochimiques peuvent être testés sous forme de principes actifs (p.a.) ou de produits formulés. Toutefois, l'essai n'est pas limité aux produits agrochimiques. En modifiant la quantité de substance-d'essai appliquée au sol, et le mode d'évaluation des données, on détermine les effets d'une série de concentrations sur la transformation de l'azote pour les substances chimiques autres que les produits agrochimiques L'essai peut également être utilisé pour les substances chimiques dont on ne connaît pas la quantité qui pénètre dans le sol.. Les résultats de ces essais sont utilisés pour préparer une courbe dose-réponse et calculer les valeurs CE_x, où x est défini comme le pourcentage d'effet.

1.2. DÉFINITIONS

Transformation de l'azote: dégradation par des micro-organismes de la matière organique contenant de l'azote, par le processus d'ammonification et de nitrification, en son produit final, le nitrate inorganique.

CE_x (concentration produisant x % d'effet): concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit x pour cent d'inhibition de la transformation de l'azote en nitrate.

CE_{50} (concentration produisant 50 % d'effet): concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit 50 pour cent (50 %) d'inhibition de la transformation de l'azote en nitrate.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le sol tamisé est amendé avec de la farine végétale en poudre puis traité avec la substance d'essai ou laissé non traité (témoin). Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, il est recommandé d'utiliser au moins deux concentrations d'essai et celles-ci doivent être choisies en fonction de la concentration maximale prévisible dans le champ. Au bout de 0, 7, 14 et 28 jours d'incubation, des échantillons de sol traité et des échantillons témoins sont extraits avec un solvant approprié, et les quantités de nitrate présentes dans les extraits sont déterminées. Le taux de formation de nitrate dans les échantillons traités est comparé au taux des échantillons témoins, et l'écart en pourcentage entre l'échantillon traité et l'échantillon témoin est calculé. Tous les essais durent au moins 28 jours. Si, au 28e jour, les différences entre les sols traités et les sols non traités sont égales ou supérieures à 25 %, les mesures sont poursuivies pendant une durée maximale de 100 jours. Lorsque l'essai porte sur des produits non agrochimiques, une série de concentrations de substance d'essai sont ajoutées aux échantillons de sol, et les quantités de nitrate formées dans les échantillons traités et les échantillons témoins sont mesurées au bout de 28 jours d'incubation. Les résultats des essais avec une série de concentrations sont analysés à l'aide d'un modèle de régression, et les valeurs CE_x sont calculées (CE_{50}, CE_{25} et/ou CE_{10}). Voir définitions.

1.5. VALIDITÉ DE L'ESSAI

L'évaluation des résultats des essais effectués avec des produits agrochimiques repose sur des différences relativement faibles (valeur moyenne ± 25 %) entre les concentrations en nitrate dans les échantillons témoins et les échantillons traités, de sorte qu'une variabilité importante des témoins peut entraîner des résultats erronés. C'est pourquoi la variation entre les témoins doit être inférieure à ± 15 %.

▼B

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Appareillage**

Des récipients d'essai en matériau chimiquement inerte sont utilisés. Ces récipients doivent avoir une contenance adaptée à la méthode d'incubation utilisée, c'est-à-dire: incubation en vrac ou avec une série d'échantillons individuels (voir le paragraphe 1.7.1.2). Il convient de veiller à la fois à minimiser l'évaporation et à permettre l'échangé gazeux pendant l'essai (les récipients d'essai peuvent par exemple être couverts d'une feuille de polyéthylène perforée). Lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, il convient d'utiliser des récipients hermétiques et étanches au gaz. La taille de ces récipients doit être telle qu'ils soient remplis environ au quart de leur contenance avec l'échantillon de sol.

Le matériel courant de laboratoire suivant est utilisé:

— agitateur: agitateur mécanique ou équivalent;

— centrifugeuse (3 000 g) ou appareil de filtration (avec du papier filtre sans nitrate);

— instrument de sensibilité et de reproductibilité adapté à l'analyse des nitrates.

1.6.2. **Sélection et nombre de sols**

Un seul sol est utilisé. Les caractéristiques recommandées sont les suivantes:

— teneur en sable: supérieure à 50 % et inférieure à 75 %,

— pH: 5,5 - 7,5,

— teneur en carbone organique: 0,5 — 1,5 %,

— la biomasse microbienne doit être mesurée (8) (9) et sa teneur en carbone doit être égale à 1 % au moins du carbone organique total du sol.

Dans la plupart des cas, un sol possédant ces caractéristiques représente les conditions les plus défavorables, puisque l'adsorption de la substance chimique de l'essai est minimale et que l'exposition de la microflore est maximale. Il est donc généralement inutile d'effectuer des essais avec d'autres sols. Toutefois, dans certains cas, par exemple lorsque l'utilisation principale prévue de la substance d'essai concerne des sols particuliers comme les sols forestiers acides, ou dans le cas de substances chimiques chargées électrostatiquement, il peut être nécessaire d'utiliser un sol différent.

▼B

1.6.3. **Prélèvement et stockage des échantillons de sol**

1.6.3.1. *Prélèvement*

Il est nécessaire de fournir des informations détaillées sur l'historique du site de prélèvement. Ces détails doivent comprendre la localisation exacte, le couvert végétal, les dates de traitement aux produits phytosanitaires, les traitements aux engrais organiques et inorganiques, les apports biologiques ou les contaminations accidentelles. Le site choisi pour le prélèvement de sol doit être de nature à permettre une utilisation de longue durée. Les pâturages permanents, les champs plantés de céréales annuelles (à l'exception du maïs) ou à ensemencement dense en engrais verts conviennent. Le site de prélèvement retenu ne doit pas avoir été traité avec des produits phytosanitaires pendant un an au moins avant le prélèvement des échantillons. De même, aucun engrais organique ne doit avoir été appliqué pendant au moins six mois. L'utilisation d'engrais minéraux est acceptable uniquement si elle satisfait aux exigences de la culture et aucun échantillon de sol ne doit être prélevé que trois mois au moins après l'application d'engrais. L'utilisation de sol traité avec des engrais ayant des effets biocides connus (comme le cyanamide calcique) doit être évitée.

Il convient d'éviter de prélever des échantillons pendant ou immédiatement après de longues périodes (plus de 30 jours) de sécheresse ou de saturation en eau. En ce qui concerne les sols labourés, les échantillons doivent être prélevés à une profondeur de 0 à 20 cm. En ce qui concerne les herbages (pâture) ou les sols qui ne sont pas labourés pendant de longues périodes (au moins une période végétative), la profondeur maximale du prélèvement peut être légèrement supérieure à 20 cm (25 cm par exemple).

Les échantillons de sol doivent être transportés dans des récipients et dans des conditions de température de nature à garantir que les propriétés initiales du sol ne soient pas altérées de manière significative.

1.6.3.2. *Stockage*

Il est préférable d'utiliser des sols qui viennent d'être extraits du site. S'il n'est pas possible d'éviter le stockage dans le laboratoire, les sols peuvent être entreposés dans le noir à 4 ± 2 °C pendant une durée maximale de trois mois. Pendant la durée de stockage des sols, des conditions aérobies doivent être assurées. Si les sols sont prélevés dans une zone où il gèle au moins trois mois par an, il peut être envisagé de stocker le sol pendant six mois entre moins 18 °C et moins 22 °C. La biomasse microbienne des sols stockés est mesurée avant chaque expérience et le carbone présent dans la biomasse doit être égal à 1 % au moins de la teneur totale en carbone organique du sol (voir le paragraphe 1.6.2).

1.6.4 **Manipulation et préparation du sol pour l'essai**

1.6.4.1 *Pré-incubation*

Si le sol a été stocké (voir le paragraphe 1.6.3.2), il est recommandé de procéder à une pré-incubation pendant 2 à 28 jours. La température et la teneur en eau du sol pendant la pré-incubation doivent être les mêmes que celles utilisées pendant l'essai (voir les paragraphes 1.6.4.2 et 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2 *Propriétés physico-chimiques*

Le sol est débarrassé manuellement des gros objets (pierres, débris végétaux, etc.) puis tamisé humide sans séchage excessif jusqu'à obtention d'une granulométrie inférieure ou égale à 2 mm. La teneur en eau de l'échantillon de sol doit être ajustée avec de l'eau distillée ou désionisée à une valeur située entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau.

1.6.4.3 *Amendement à l'aide d'un substrat organique*

Le sol doit être amendé à l'aide d'un substrat organique approprié, comme de la farine de luzerne verte en poudre (composant principal: *Medicago sativa*) avec un rapport C/N situé entre 12/1 et 16/1. Le rapport luzerne-sol recommandé est de 5 g de luzerne par kilogramme de sol (poids sec).

1.6.5 **Préparation de la substance d'essai à appliquer au sol**

La substance d'essai est généralement appliquée à l'aide d'un excipient. L'excipient peut être de l'eau (pour les substances solubles dans l'eau) ou un solide inerte comme du sable de quartz fin (granulométrie: 0,1 - 0,5mm). Il convient d'éviter les excipients liquides autres que l'eau (solvants organiques tels que l'acétone ou le chloroforme) car ils peuvent endommager la microflore. Si l'on utilise du sable comme excipient, celui-ci peut être traité par la substance d'essai dissoute ou en suspension dans un solvant approprié. Dans ce cas, le solvant doit être éliminé par évaporation avant de mélanger l'excipient avec le sol. Pour obtenir une répartition optimale de la substance d'essai dans le sol, un rapport de 10 g de sable par kilogramme de sol (poids sec) est recommandé. Les échantillons témoins sont traités avec une quantité équivalente d'eau et/ou de sable de quartz uniquement.

Lorsque l'on teste des substances chimiques volatiles, il convient d'éviter dans la mesure du possible les pertes pendant le traitement et il convient d'essayer de veiller à la répartition homogène dans l'échantillon de sol (la substance d'essai doit être injectée dans le sol en plusieurs endroits).

1.6.6 **Concentrations d'essai**

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, il convient d'utiliser au moins deux concentrations. La concentration la plus faible doit correspondre au moins à la quantité maximale susceptible de pénétrer dans le sol dans des conditions réelles alors que la concentration la plus élevée doit être un multiple de la concentration la plus faible. Les concentrations de substance d'essai ajoutées au sol sont calculées en supposant une incorporation uniforme à une profondeur de 5 cm et une densité apparente du sol de 1,5. Dans le cas des produits agrochimiques appliqués directement sur le sol, ou des substances chimiques dont on peut prévoir la quantité qui pénètre dans le sol, les concentrations d'essai recommandées sont égales à la concentration maximale prévisible dans l'environnement (CPE) et cinq fois cette concentration. Les substances qui doivent être appliquées sur le sol plusieurs fois au cours d'une même saison doivent être testées à des concentrations calculées en multipliant la CPE par le nombre maximal d'applications prévu. La concentration la plus élevée testée ne doit toutefois pas dépasser dix fois la dose maximale d'une application. Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, une série géométrique de cinq concentrations au moins est utilisée. Les concentrations testées doivent couvrir la gamme nécessaire pour déterminer les valeurs CE_x.

▼B

1.7. EXÉCUTION DE L'ESSAI

1.7.1. **Conditions expérimentales**

1.7.1.1. *Traitement et contrôle*

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, le sol est divisé en trois fractions de poids égal. Deux fractions sont mélangées à l'excipient contenant le produit, et la troisième avec l'excipient sans produit (témoin). Il est recommandé de préparer un minimum de trois réplicats de sol traité et non traité. Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, le sol est divisé en six fractions de poids égal. Cinq échantillons sont mélangés avec l'excipient contenant la substance d'essai, et le sixième est mélangé avec l'excipient sans la substance chimique. Il est recommandé de préparer trois réplicats de sol traité et de témoins. Il convient de veiller à la répartition homogène de la substance d'essai dans les échantillons de sol traité. Pendant le mélange, il convient d'éviter la compression ou le compactage de l'échantillon de sol.

1.7.1.2. *Incubation des échantillons de sol*

L'incubation des échantillons de sol peut être effectuée de deux façons: sous forme d'échantillons en vrac de sol traité et de sol non traité ou sous forme d'une série de sous-échantillons individuels et de taille identique de chaque sol traité et non traité. Toutefois, lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, l'essai doit être effectué uniquement avec une série de sous-échantillons individuels. Lorsque les sols sont incubés en vrac, de grandes quantités de chaque sol traité et non traité sont préparées et les sous-échantillons à analyser sont prélevés en fonction des besoins pendant l'essai. La quantité préparée initialement pour chaque traitement et pour le contrôle dépend de la taille des sous-échantillons, du nombre de réplicats utilisés pour l'analyse et du nombre maximal de temps de prélèvement. Les sols incubés en vrac doivent être soigneusement mélangés avant de procéder au sous-échantillonnage. Lorsque les sols sont incubés sous forme d'échantillons individuels, on divise chaque sol en vrac traité et non traité dans le nombre requis de sous-échantillons, et ceux-ci sont utilisés selon les besoins. Dans les expériences où l'on peut prévoir plus de deux temps de prélèvement, une quantité suffisante de sous-échantillons doit être préparée pour tenir compte de tous les réplicats et de tous les temps de prélèvement. Au moins trois exemplaires d'échantillons du sol d'essai doivent être incubés en milieu aérobie (voir le paragraphe 1.7.1.1). Pendant tous les essais, il convient d'utiliser des récipients appropriés comportant-un espace libre suffisant afin d'éviter le développement de conditions anaérobies. Lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, il doit être effectué uniquement avec une série de sous-échantillons individuels.

1.7.1.3. *Conditions et durée de l'essai*

L'essai est effectué dans le noir à température ambiante de 20 ± 2 °C. Pendant l'essai, la teneur en eau des échantillons de sol doit être maintenue entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau du sol (voir le paragraphe 1.6.4.2) avec une marge de ± 5 %. De l'eau distillée, désionisée peut être ajoutée si nécessaire.

La durée minimale de l'essai est de 28 jours. Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, on compare les taux de formation de nitrate dans les échantillons traités et dans les échantillons témoins. Si ceux-ci diffèrent de plus de 25 % au jour 28, on poursuit l'essai jusqu'à obtenir une différence égale ou inférieure à 25 %, ou pendant une durée maximale de 100 jours. En ce qui concerne les produits non agrochimiques, l'essai est arrêté au bout de 28 jours. Au jour 28, les quantités de nitrate dans les échantillons traités et les échantillons témoins sont déterminées et les valeurs CE_x sont calculées.

▼B

1.7.2. **Prélèvement et analyse des sols**

1.7.2.1. *Échelonnement des prélèvements*

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, les échantillons de sol font l'objet d'une analyse de mesure du nitrate aux jours 0, 7, 14 et 28. S'il est nécessaire de prolonger l'essai, de nouvelles mesures doivent être effectuées tous les 14 jours après le jour 28.

Lorsque l'essai porte sur des produits non agrochimiques, au moins cinq concentrations d'essai sont utilisées et les échantillons de sol sont analysés pour mesurer le nitrate au début (jour 0) et à la fin de la période d'exposition (28 jours). Une mesure intermédiaire, par exemple au jour 7, peut être ajoutée si nécessaire. Les données obtenues au jour 28 sont utilisées pour déterminer la valeur CE_x de la substance chimique. Si on le souhaite, on peut utiliser les données des témoins du jour 0 afin de mesurer la quantité initiale de nitrate dans le sol.

1.7.2.2. *Analyse des échantillons de sol*

La quantité de nitrate formé dans chaque échantillon traité et dans chaque témoin est déterminée à chaque temps de prélèvement. Le nitrate est extrait du sol en agitant les échantillons en présence d'un solvant d'extraction, par exemple, une solution de 0,1 M de chlorure de potassium. Un rapport de 5 ml de solution de KCl par gramme d'équivalent poids sec de sol est recommandé. Afin d'optimiser l'extraction, les récipients contenant le sol et la solution d'extraction ne doivent pas être remplis à plus de la moitié de leur contenance. Les mélanges sont agités à 150 tpm pendant 60 minutes. Les mélanges sont centrifugés ou filtrés et les phases liquides sont analysées pour mesurer le nitrate. Les extraits liquides débarrassés de particules peuvent être stockés à moins 20 ± 5 °C pendant une durée pouvant aller jusqu'à six mois avant d'être analysés.

2. **DONNÉES**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, la quantité de nitrate formé dans chaque échantillon de sol doit être enregistrée, et les valeurs moyennes de tous les réplicats doivent être présentées sous forme de tableau. Les taux de transformation de l'azote doivent être évalués à l'aide de méthodes statistiques appropriées et généralement reconnues (F-test, seuil de signification de 5 %). Les quantités de nitrate formé sont exprimées en mg nitrate/kg poids sec/jour. On compare le taux de formation de nitrate dans chaque échantillon traité avec le taux dans le témoin, et on calcule l'écart en pourcentage par rapport au témoin.

Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, la quantité de nitrate formé dans chaque réplicat est déterminée, et une courbe dose-réponse est établie pour déterminer les valeurs CE_x. Les quantités de nitrate (mg nitrate/kg poids sec de sol) trouvées dans les échantillons traités au bout de 28 jours sont comparées aux quantités observées dans les échantillons témoins. À partir de ces résultats, on calcule le pourcentage des valeurs d'inhibition pour chaque concentration d'essai. Une courbe de pourcentages en fonction de la concentration est établie, et on utilise ensuite une méthode statistique pour calculer les valeurs CE_x. Les seuils de confiance ($p = 0,95$) des CE_x calculées sont également déterminés à l'aide des méthodes standards (10) (11) (12).

Les substances d'essai qui contiennent d'importantes quantités d'azote peuvent être à l'origine des quantités de nitrate qui se forment pendant l'essai. Si ces substances sont testées à une concentration élevée (par exemple, dans le cas des substances chimiques destinées à être utilisées en applications répétées), des contrôles appropriés doivent être prévus dans l'essai (sol plus substance d'essai mais sans farine végétale). Les résultats de ces contrôles doivent être pris en compte dans le calcul des valeurs CE_x.

▼B

2.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Lorsqu'on évalue les résultats d'essais avec des produits agrochimiques, et que la différence de taux de formation de nitrate entre l'échantillon le moins traité (concentration maximale prévisible) et le témoin est égale ou inférieure à 25 % quel que soit le temps de prélèvement après le jour 28, le produit peut être considéré comme n'ayant aucune influence à long terme sur la transformation de l'azote dans le sol. Lorsqu'on évalue les résultats d'essais avec des substances chimiques autres que les produits agrochimiques, on utilise les valeurs CE_{50}, CE_{25} et/ou CE_{10}.

3. **RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

Identification complète du sol utilisé à savoir:

— coordonnées géographiques du site (latitude, longitude),

— information sur l'historique du site (couvert végétal, traitement aux produits phytosanitaires, traitement aux engrais, contamination accidentelle, etc.),

— type d'utilisation (sol agricole, forestier, etc.),

— profondeur du prélèvement (cm),

— teneur en sable/limon/argile (% poids sec),

— valeurs du pH (dans l'eau),

— teneur en carbone organique (% poids sec),

— teneur en azote (% poids sec),

— concentration initiale en nitrate (mg nitrate/kg poids sec),

— capacité d'échange cationique (mmol/kg),

— biomasse microbienne en pourcentage du carbone organique total,

— référence des méthodes utilisées pour la détermination de chaque paramètre,

— toutes les informations relatives au prélèvement et au stockage des échantillons de sol,

— détails de la pré-incubation du sol s'il y a lieu.

Substance d'essai:

— nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques,

— données d'identification des substances chimiques, s'il y a lieu, comprenant la formule structurale, la pureté (pour les produits phytosanitaires, le pourcentage de produit actif), la teneur en azote.

Substrat:

— source du substrat,

— composition (farine de luzerne, farine de luzerne verte),

— teneur en carbone, azote (% poids sec),

— taille du tamis (mm).

▼B

Conditions de l'essai:

— détails de la modification du sol avec un substrat organique,

— nombre de concentrations de la substance d'essai utilisée et, le cas échéant, justification des concentrations sélectionnées,

— procédure d'application de la substance d'essai au sol,

— température d'incubation,

— teneur en eau du sol au début et pendant le déroulement de l'essai,

— méthode d'incubation du sol utilisée (en vrac ou en série de sous-échantillons individuels),

— nombre de réplicats,

— temps de prélèvement,

— méthode utilisée pour l'extraction du nitrate du sol.

Résultats:

— procédure analytique et matériel utilisé pour analyser le nitrate,

— tableaux indiquant les valeurs individuelles et moyennes des mesures du nitrate,

— variation entre réplicats dans les échantillons traités et dans les échantillons témoins,

— explications des corrections apportées aux calculs, le cas échéant,

— la variation en pourcentage des taux de formation de nitrate à chaque temps de prélèvement ou, le cas échéant, la valeur CE_{50} avec une limite de confiance de 95 pour cent, les autres valeurs CE_x (CE_{25} ou CE_{10}) avec des intervalles de confiance, et un graphique de la courbe dose-réponse,

— traitement statistique des résultats,

— toutes informations et observations utiles pour l'interprétation des résultats.

4 **RÉFÉRENCES**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24, p. 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SET AC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality - Biological Methods*.

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italie, p. 18-20, January 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(10) Litchfield, J.T. and WUcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., 96, p. 99-113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. MICRO-ORGANISMES DU SOL: ESSAI DE TRANSFORMATION DU CARBONE

1. MÉTHODE

La présente méthode d'essai reprend l'essai TG 217 (2000) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode d'essai décrit une méthode de laboratoire conçue pour étudier les effets à long terme des substances chimiques, après une exposition unique, sur l'activité de transformation du carbone par les micro-organismes du sol. L'essai s'appuie principalement sur les recommandations de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (1). Toutefois, d'autres lignes directrices, notamment celles du Biologische Bundesanstalt allemand (2), de l'agence de protection de l'environnement des États-Unis (3) et de la SETAC (4), ont également été prises en considération. Lors d'un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, qui s'est tenu à Belgirate, Italie, en 1995 (5), le nombre et le type de sols à utiliser dans le cadre de cet essai ont été définis. Les recommandations relatives au prélèvement, à la manipulation et au stockage des échantillons de sol s'appuient sur des lignes directrices de l'ISO (6) et sur les recommandations de l'atelier de Belgirate.

Pour déterminer et évaluer les caractéristiques toxiques des substances d'essai, il peut être nécessaire de déterminer leurs effets sur l'activité microbienne du sol, par exemple lorsqu'il est nécessaire de disposer de données sur les effets secondaires potentiels des produits phytosanitaires sur la microflore du sol ou bien en cas de risque d'exposition des micro-organismes du sol à des substances chimiques autres que les produits phytosanitaires. L'essai de transformation du carbone est effectué pour déterminer les effets de ces substances chimiques sur la microflore du sol. Si l'essai porte sur des produits agrochimiques (produits phytosanitaires, engrais, produits chimiques sylvicoles), deux essais sont effectués: l'essai de transformation du carbone et l'essai de transformation de l'azote. S'il s'agit d'autres substances que les produits agrochimiques, l'essai de transformation de l'azote suffit. Toutefois, si les valeurs CE_{50} de l'essai de transformation de l'azote relatives à ces substances chimiques correspondent à celles des inhibiteurs de la nitrification (nitrapyrine) commerciaux, un essai de transformation du carbone peut être effectué afin d'obtenir des informations complémentaires.

Les sols sont formés de composés vivants et non vivants qui existent sous forme de mélanges complexes et hétérogènes. Les micro-organismes jouent un rôle important dans la décomposition et la transformation de la matière organique en sol fertile et un grand nombre d'espèces contribuent aux différents aspects de la fertilisation des sols. Toute interférence à long terme avec ces processus biochimiques risque de perturber le cycle des éléments nutritifs et par conséquent d'altérer la fertilité du sol. La transformation du carbone et de l'azote se produit dans tous les sols fertiles. Bien que les colonies microbiennes responsables de ces processus diffèrent d'un sol à un autre, les voies de transformation sont identiques pour l'essentiel.

▼B

La méthode d'essai décrite ici est conçue pour détecter les effets nocifs à long terme d'une substance sur le processus de transformation du carbone à la surface aérobie des sols. L'essai est sensible aux changements de taille et d'activité des colonies microbiennes responsables de la transformation du carbone puisqu'il soumet ces colonies à la fois au stress chimique et à la carence en carbone. Un sol sableux pauvre en matière organique est utilisé. Ce sol est traité avec la substance d'essai et il est incubé dans des conditions permettant un métabolisme microbien rapide. Dans ces conditions, les sources de carbone présentes dans le sol sont rapidement épuisées. Cela provoque la carence en carbone qui tue à la fois les cellules microbiennes et qui induit la dormance et/ou la sporulation. Si la durée de l'essai est supérieure à 28 jours, on peut mesurer la somme de ces réactions dans les témoins (sol non traité) en mesurant la perte progressive de biomasse microbienne active métaboliquement (7). Si la biomasse d'un sol carence en carbone, dans les conditions de l'essai, est affectée par la présence d'une substance chimique, celle-ci peut ne pas retrouver le même niveau que l'échantillon témoin. C'est pourquoi la perturbation provoquée par la substance d'essai à n'importe quel moment de l'essai perdurera souvent jusqu'à la fin de l'essai.

Les essais à partir desquels la présente méthode d'essai a été mise au point étaient conçus principalement pour des substances dont il est possible d'estimer la quantité qui pénètre dans le sol. C'est le cas par exemple des produits phytosanitaires dont la dose d'application dans le champ est connue. Pour les produits agrochimiques, il suffit de pratiquer un essai sur deux doses correspondant au taux d'application prévu ou estimé. Les produits agrochimiques peuvent être testés sous forme de principes actifs (p.a.) ou de produits formulés. Toutefois, l'essai n'est pas limité aux substances chimiques dont les concentrations dans l'environnement peuvent être estimées. En modifiant à la fois la quantité de substance d'essai appliquée au sol, et le mode d'évaluation des données, on peut également utiliser l'essai pour les substances chimiques dont on ne connaît pas la quantité susceptible d'atteindre le sol. C'est pourquoi, dans le cas des produits non agrochimiques, les effets d'une série de concentrations sur la transformation du carbone sont déterminés. Les résultats de ces essais sont utilisés pour préparer une courbe dose-réponse et calculer les valeurs CE_X, où x est défini comme le pourcentage d'effet.

1.2. DÉFINITIONS

Transformation du carbone: dégradation par des micro-organismes de la matière organique en son produit final, le dioxyde de carbone inorganique.

CE_X (concentration produisant x % d'effet): concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit x % d'inhibition de la transformation du carbone en dioxyde de carbone.

CE_{50} (concentration produisant 50 % d'effet): concentration de la substance d'essai dans le sol qui produit 50 % d'inhibition de la transformation du carbone en dioxyde de carbone.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Aucune.

▼B

1.4. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le sol tamisé est traité avec la substance d'essai ou laissé non traité (témoin). Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, il est recommandé d'utiliser au moins deux concentrations d'essai et celles-ci doivent être choisies en fonction de la concentration maximale prévisible dans le champ. Au bout de 0, 7, 14 et 28 jours d'incubation, les échantillons de sol traité et les échantillons témoins sont mélangés avec du glucose, et les taux de respiration induits par le glucose sont mesurés pendant 12 heures consécutives. Les taux de respiration sont exprimés en dioxyde de carbone dégagé (mg dioxyde de carbone/kg sol sec/h) ou oxygène consommé (mg oxygène/kg sol/h). On compare le taux moyen de respiration dans les échantillons de sol traité avec celui des échantillons témoins et on calcule l'écart en pourcentage entre l'échantillon traité et l'échantillon témoin. Tous les essais ont une durée de 28 jours au moins. Si, au 28^{e} jour, les différences entre les sols traités et les sols non traités sont égales ou supérieures à 25 %, les mesures se poursuivent à intervalles de 14 jours pendant une durée maximale de 100 jours. Si l'essai porte sur des substances chimiques autres que les produits agrochimiques, une série de concentrations de la substance d'essai est ajoutée aux échantillons de sol, et les taux de respiration induits par le glucose (moyenne des quantités de dioxyde de carbone formé ou l'oxygène consommé) sont mesurés au bout de 28 jours. Les résultats des essais effectués avec une série de concentrations sont analysés à l'aide d'un modèle de régression, et les valeurs CE_x sont calculées (CE_{50}, CE_{25} et/ou CE_{10}). Voir définitions.

1.5. VALIDITÉ DE L'ESSAI

L'évaluation des résultats des essais effectués avec des produits agrochimiques repose sur des différences relativement faibles (valeur moyenne ± 25 %) entre le dioxyde de carbone dégagé ou l'oxygène consommé dans (ou par) les échantillons témoins et les échantillons de sol traité, de sorte qu'une variabilité importante des témoins peut entraîner des résultats erronés. C'est pourquoi la variation entre les témoins doit être inférieure à ± 15 %.

1.6. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.6.1. **Appareillage**

Des récipients d'essai en matériau chimiquement inerte sont utilisés. Ces récipients doivent avoir une contenance adaptée à la méthode d'incubation utilisée, c'est-à-dire incubation en vrac ou avec une série d'échantillons individuels (voir le point 1.7.1.2). Il convient de veiller à la fois à minimiser l'évaporation et à permettre l'échange gazeux pendant l'essai (les récipients d'essai peuvent par exemple être couverts d'une feuille de polyéthylène perforée). Lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, il convient d'utiliser des récipients hermétiques et étanches. La taille de ces récipients doit être telle qu'ils soient remplis environ au quart de leur contenance avec l'échantillon de sol.

Pour déterminer la respiration induite par le glucose, des systèmes d'incubation et des instruments de mesure de la production de dioxyde de carbone ou de la consommation d'oxygène sont nécessaires. On trouve des exemples de ces systèmes et de ces instruments dans la littérature (8) (9) (10) (11).

1.6.2. **Sélection et nombre de sols**

Un seul sol est utilisé. Les caractéristiques recommandées sont les suivantes:

— teneur en sable: supérieure à 50 % et inférieure à 75 %,

▼B

— pH: 5,5-7,5,

— teneur en carbone organique: 0,5-1,5 %,

— la biomasse microbienne doit être mesurée (12) (13) et sa teneur en carbone doit être égale à 1 % au moins du carbone organique total du sol.

Dans la plupart des cas, un sol possédant ces caractéristiques correspond aux conditions les plus défavorables, puisque l'adsorption de la substance chimique de l'essai est minimale et que l'exposition de la microflore est maximale. Il est donc généralement inutile d'effectuer des essais avec d'autres sols. Toutefois, dans certains cas, par exemple lorsque l'utilisation principale prévue de la substance d'essai concerne des sols particuliers comme les sols forestiers acides, ou dans le cas de substances chimiques chargées électrostatiquement, il peut être nécessaire d'utiliser un sol différent.

1.6.3. **Prélèvement et stockage des échantillons de sol**

1.6.3.1. *Prélèvement*

Il est nécessaire de fournir des informations détaillées sur l'historique du site de prélèvement. Ces détails doivent comprendre la localisation exacte, le couvert végétal, les dates de traitement avec des produits phytosanitaires, les traitements aux engrais organiques et inorganiques, les apports biologiques ou les contaminations accidentelles. Le site choisi pour le prélèvement de sol doit être de nature à permettre une utilisation de longue durée. Les pâturages permanents, les champs plantés de céréales annuelles (à l'exception du maïs) ou à ensemencement dense en engrais verts conviennent. Le site de prélèvement retenu ne doit pas avoir été traité avec des produits phytosanitaires pendant un an au moins avant les prélèvements. De même, aucun engrais organique ne doit avoir été appliqué pendant au moins six mois. L'utilisation d'engrais minéraux est acceptable uniquement si elle satisfait aux exigences de la culture, et les échantillons de sol ne doivent être prélevés qu'au moins trois mois après l'application d'engrais. L'utilisation de sol traité avec des engrais aux effets biologiques connus (cyanamide calcique) doit être évitée.

Il convient d'éviter de prélever des échantillons pendant ou immédiatement après de longues périodes (plus de 30 jours) de sécheresse ou de saturation en eau. En ce qui concerne les sols labourés, les échantillons doivent être prélevés à une profondeur de 0 à 20 cm. En ce qui concerne les herbages (pâture) ou les sols qui ne sont pas labourés pendant de longues périodes (au moins une période végétative), la profondeur maximale du prélèvement peut être légèrement supérieure à 20 cm (25 cm par exemple). Les échantillons de sol doivent être transportés dans des récipients et dans des conditions de température de nature à garantir que les propriétés initiales du sol ne soient pas altérées de manière significative.

1.6.3.2. *Stockage*

Il est préférable d'utiliser des sols qui viennent d'être extraits du site. S'il n'est pas possible d'éviter le stockage dans le laboratoire, les sols peuvent être entreposés dans le noir à 4 ± 2 ºC pendant une durée maximale de trois mois. Pendant la durée de stockage des sols, des conditions aérobies doivent être assurées. Si les sols sont prélevés dans une zone où il gèle au moins trois mois par an, il peut être envisagé de stocker le sol pendant six mois à — 18 ºC. La biomasse microbienne des sols stockés est mesurée avant chaque expérience et le carbone présent dans la biomasse doit être égal à 1 % au moins de la teneur totale en carbone organique du sol (voir le point 1.6.2).

▼B

1.6.4. **Manipulation et traitement du sol pour l'essai**

1.6.4.1. *Préincubation*

Si le sol a été stocké (voir les points 1.6.4.2 et 1.7.1.3), il est recommandé de procéder à une préincubation pendant 2 à 28 jours. La température et la teneur en eau du sol pendant la préincubation doivent être les mêmes que celles utilisées pendant l'essai (voir les points 1.6.4.2 et 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Propriétés physico-chimiques*

Le sol est débarrassé manuellement des gros objets (pierres, débris végétaux, etc.) puis tamisé humide sans séchage excessif jusqu'à obtention d'une granulométrie inférieure ou égale à 2 mm. La teneur en eau de l'échantillon doit être ajustée avec de l'eau distillée ou désionisée à une valeur située entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau.

1.6.5. **Préparation de la substance d'essai à appliquer au sol**

La substance d'essai est généralement appliquée à l'aide d'un excipient. L'excipient peut être de l'eau (pour les substances solubles dans l'eau) ou un solide inerte comme du sable de quartz fin (granulométrie: 0,1-0,5 mm). Il convient d'éviter les excipients liquides autres que l'eau (solvants organiques tels que l'acétone ou le chloroforme), car ils peuvent endommager la microflore. Si l'on utilise du sable comme excipient, celui-ci peut être traité par la substance d'essai dissoute ou en suspension dans un solvant approprié. Dans ce cas, le solvant doit être éliminé par évaporation avant de mélanger l'excipient avec le sol. Pour obtenir une répartition optimale de la substance d'essai dans le sol, un rapport de 10 g de sable par kilogramme de sol (poids sec) est recommandé. Les échantillons témoins sont traités avec une quantité équivalente d'eau et/ou de sable de quartz uniquement.

Lorsque l'on teste des substances chimiques volatiles, il convient d'éviter dans la mesure du possible les pertes pendant le traitement et il convient d'essayer de veiller à la répartition homogène dans l'échantillon de sol (la substance d'essai doit être injectée dans le sol en plusieurs endroits).

1.6.6. **Concentrations d'essai**

Si l'essai porte sur des produits phytosanitaires ou sur d'autres substances chimiques dont les concentrations dans l'environnement peuvent être estimées, il convient d'utiliser au moins deux concentrations. La concentration la plus faible doit correspondre au moins à la quantité maximale susceptible de pénétrer dans le sol dans des conditions réelles alors que la concentration la plus élevée doit être un multiple de la concentration la plus faible. Les concentrations de substance d'essai ajoutées au sol sont calculées en supposant une incorporation uniforme à une profondeur de 5 cm et une densité apparente du sol de 1,5. Dans le cas des produits agrochimiques appliqués directement sur le sol, ou des substances chimiques dont on peut prévoir la quantité qui pénètre dans le sol, les concentrations d'essai recommandées sont égales à la concentration maximale prévisible dans l'environnement (CPE) et cinq fois cette concentration. Les substances qui doivent être appliquées sur le sol plusieurs fois au cours d'une même saison doivent être testées à des concentrations calculées en multipliant la CPE par le nombre maximal d'applications prévues. La concentration la plus élevée testée ne doit toutefois pas dépasser dix fois la dose maximale d'application unique.

Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, une série géométrique de cinq concentrations au moins est utilisée. Les concentrations testées doivent couvrir la gamme nécessaire pour déterminer les valeurs CE_x.

▼B

1.7. EXÉCUTION DE L'ESSAI

1.7.1. **Conditions expérimentales**

1.7.1.1. *Traitement et contrôle*

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, le sol est divisé en trois fractions de poids égal. Deux fractions sont mélangées avec l'excipient contenant le produit, et la troisième avec l'excipient sans produit (témoin). Il est recommandé de préparer un minimum de trois réplicats de sol traité et non traité. Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, le sol est divisé en six fractions de poids égal. Cinq échantillons sont mélangés avec l'excipient contenant la substance d'essai, et le sixième est mélangé avec l'excipient sans la substance chimique. Il est recommandé de préparer trois réplicats de sol traité et de témoins. Il convient de veiller à la répartition homogène de la substance d'essai dans les échantillons de sol traité. Pendant le mélange, il convient d'éviter la compression ou le compactage du sol.

1.7.1.2 *Incubation des échantillons de sol*

L'incubation des échantillons de sol peut être effectuée de deux façons: sous forme d'échantillons en vrac de sol traité et de sol non traité ou sous forme d'une série de sous-échantillons individuels et de taille identique de chaque sol traité et non traité. Toutefois, lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, l'essai doit être effectué uniquement avec une série de sous-échantillons individuels. Lorsque les sols sont incubés en vrac, de grandes quantités de chaque sol traité et non traité sont préparées et les sous-échantillons à analyser sont prélevés en fonction des besoins pendant l'essai. La quantité préparée initialement pour chaque traitement et pour le contrôle dépend de la taille des sous-échantillons, du nombre de réplicats utilisés pour l'analyse et du nombre maximal de temps de prélèvement. Les sols incubés en vrac doivent être soigneusement mélangés avant de procéder au sous-échantillonnage. Lorsque les sols sont incubés sous forme d'échantillons individuels, on divise chaque sol en vrac traité et non traité dans le nombre requis de sous-échantillons, et ceux-ci sont utilisés selon les besoins. Dans les expériences où l'on peut prévoir plus de deux temps de prélèvement, une quantité suffisante de sous-échantillons doit être préparée pour tenir compte de tous les réplicats et de tous les temps de prélèvement. Au moins trois exemplaires de sol d'essai doivent être incubés en milieu aérobie (voir le point 1.7.1.1). Pendant tous les essais, il convient d'utiliser des récipients appropriés comportant un espace libre suffisant afin d'éviter le développement de conditions anaérobies. Lorsque l'essai porte sur des substances volatiles, il doit être effectué uniquement avec une série de sous-échantillons individuels.

1.7.1.3. *Conditions et durée de l'essai*

L'essai est effectué dans le noir à température ambiante de 20 ± 2 °C. Pendant l'essai, la teneur en eau des échantillons de sol doit être maintenue entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau du sol (voir le point 1.6.4.2) avec une marge de ± 5 %. De l'eau distillée, désionisée peut être ajoutée si nécessaire.

La durée minimale de l'essai est de 28 jours. Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, on compare les quantités de dioxyde de carbone dégagé ou d'oxygène consommé dans les échantillons traités et dans les échantillons témoins. Si celles-ci diffèrent de plus de 25 % au jour 28, on poursuit l'essai jusqu'à obtenir une différence égale ou inférieure à 25 %, ou pendant une durée maximale de 100 jours, si celle-ci est la plus courte. Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, l'essai est arrêté au bout de 28 jours. Au jour 28, les quantités de dioxyde de carbone dégagé ou d'oxygène consommé dans les échantillons traités et les échantillons témoins sont déterminées et les valeurs CE_x sont calculées.

▼B

1.7.2. **Prélèvement et analyse des sols**

1.7.2.1. *Échelonnement des prélèvements*

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, les échantillons de sol font l'objet d'une analyse de mesure des taux de respiration induits par le glucose aux jours 0, 7, 14 et 28. S'il est nécessaire de prolonger l'essai, de nouvelles mesures doivent être effectuées tous les 14 jours après le jour 28.

Lorsque l'essai porte sur des produits non agrochimiques, au moins cinq concentrations d'essai sont utilisées et les échantillons de sol sont analysés pour mesurer la respiration induite par le glucose au début (jour 0) et à la fin de la période d'exposition (28 jours). Une mesure intermédiaire, par exemple au jour 7, peut être ajoutée si nécessaire. Les données obtenues au jour 28 sont utilisées pour déterminer la valeur CE_x de la substance chimique. Si on le souhaite, on peut utiliser les données des témoins du jour 0 afin d'estimer les quantités initiales de biomasse microbienne métaboliquement active dans le sol (12).

1.7.2.2. *Mesure des taux de respiration induits par le glucose*

Le taux de respiration induit par le glucose est déterminé dans chaque échantillon de sol traité et dans chaque témoin à chaque temps de prélèvement. Les échantillons de sol sont mélangés avec une quantité de glucose suffisante pour entraîner une réaction respiratoire maximale immédiate. La quantité de glucose nécessaire pour provoquer une réaction respiratoire maximale dans un sol donné peut être déterminée dans un essai préliminaire à l'aide d'une série de concentrations de glucose (14). Toutefois, dans le cas des sols sableux contenant 0,5-1,5 % de carbone organique, 2 000 mg à 4 000 mg de glucose par kg de poids sec sont généralement suffisants. Le glucose peut être réduit en poudre avec du sable de quartz propre (10 g sable/kg poids sec) et mélangé de façon homogène avec le sol.

Les échantillons de sol amendés avec le glucose sont incubés dans un appareil adapté pour mesurer les taux de respiration en continu, toutes les heures, ou toutes les deux heures (voir point 1.6.1) à 20 ± 2 °C. Le dioxyde de carbone dégagé ou l'oxygène consommé est mesuré pendant 12 heures consécutives et les mesures doivent commencer le plus rapidement possible, c'est-à-dire 1 à 2 heures après l'adjonction de glucose. On mesure la quantité totale de dioxyde de carbone dégagé ou d'oxygène consommé pendant les 12 heures et on détermine le taux moyen de respiration.

2 **DONNÉES**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Si l'essai porte sur des produits agrochimiques, le dioxyde de carbone dégagé ou l'oxygène consommé par chaque réplicat doit être enregistré, et les valeurs moyennes de tous les réplicats doivent être présentées sous forme de tableau. Les résultats doivent être évalués à l'aide de méthodes statistiques appropriées et généralement reconnues (F-test, seuil de signification de 5 %). Les taux de respiration induits par le glucose sont exprimés en mg de dioxyde de carbone/kg poids sec/h ou mg oxygène/poids sec/h. Le taux moyen de formation de dioxyde de carbone ou le taux moyen de consommation d'oxygène de chaque échantillon traité est comparé à celui du témoin, et l'écart en pourcentage par rapport au témoin est calculé.

▼B

Si l'essai porte sur des produits non agrochimiques, les quantités de dioxyde de carbone dégagé ou d'oxygène consommé dans chaque réplicat sont déterminées, et une courbe dose-réponse est établie pour déterminer les valeurs CE_x. Les taux de respiration induits par le glucose (mg de dioxyde de carbone/kg poids sec/h ou mg oxygène/poids sec/h) observés dans les échantillons traités au bout de 28 jours sont comparés à ceux des échantillons témoins. À partir de ces résultats, on calcule le pourcentage des valeurs d'inhibition pour chaque concentration d'essai. Une courbe de pourcentages en fonction de la concentration est établie, et on utilise ensuite une méthode statistique pour calculer les valeurs CE_x. Les seuils de confiance ($p = 0,95$) des CE_x calculées sont également déterminés à l'aide des méthodes standard (15) (16) (17).

2.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Lorsqu'on évalue les résultats d'essais avec des produits agrochimiques, et que la différence de taux de respiration entre l'échantillon le moins traité (concentration maximale prévisible) et l'échantillon témoin est égale ou inférieure à 25 % quel que soit le temps de prélèvement après le jour 28, le produit peut être considéré comme n'ayant aucune influence à long terme sur la transformation du carbone dans le sol. Lorsqu'on évalue les résultats d'essais avec des substances chimiques autres que les produits agrochimiques, on utilise les valeurs CE_{50}, CE_{25} et/ou CE_{10}.

3. **RAPPORT D'ESSAI**

RAPPORT DE L'ESSAI

Le rapport de l'essai doit comporter les informations suivantes:

Identification complète du sol utilisé, à savoir:

— coordonnées géographiques du site (latitude, longitude),

— information sur l'historique du site (couvert végétal, traitement aux produits phytosanitaires, traitement aux engrais, contamination accidentelle, etc.),

— type d'utilisation (sol agricole, forestier, etc.),

— profondeur du prélèvement (cm),

— teneur en sable/limon/argile (% poids sec),

— pH (dans l'eau),

— teneur en carbone organique (% poids sec),

— teneur en azote (% poids sec),

— capacité d'échange cationique (mmol/kg),

— biomasse microbienne initiale en pourcentage du carbone organique total,

— référence des méthodes utilisées pour la détermination de chaque paramètre,

— toutes les informations relatives au prélèvement et au stockage des échantillons de sol,

— détails de la préincubation du sol s'il y a lieu.

▼B

Substance d'essai:

— nature physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques,

— données d'identification des substances chimiques, s'il y a lieu, notamment la formule structurale, la pureté (pour les produits phytosanitaires, le pourcentage de produit actif), la teneur en azote.

Conditions de l'essai:

— détails de la modification du sol avec un substrat organique,

— nombre de concentrations de la substance d'essai utilisée et, le cas échéant, justification des concentrations sélectionnées,

— procédure d'application de la substance d'essai au sol,

— température d'incubation,

— teneur en eau du sol au début et pendant le déroulement de l'essai,

— méthode d'incubation du sol utilisée (en vrac ou en série de sous-échantillons individuels),

— nombre de réplicats,

— temps de prélèvement.

Résultats:

— méthode et matériel utilisés pour mesurer les taux de respiration,

— tableaux indiquant les valeurs individuelles et les valeurs moyennes des quantités de dioxyde de carbone ou d'oxygène,

— variation entre réplicats dans les échantillons traités et dans les échantillons témoins,

— explications des corrections apportées aux calculs, s'il y a lieu,

— la variation en pourcentage des taux de respiration induits par le glucose à chaque temps de prélèvement ou, le cas échéant, la valeur CE_{50} avec une limite de confiance de 95 %, les autres valeurs CE_X (CE_{25} ou CE_{10}) avec des intervalles de confiance, et un graphique de la courbe dose-réponse,

— traitement statistique des résultats, s'il y a lieu,

— toutes informations et observations utiles pour l'interprétation des résultats.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24, p. 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in «Pesticide Effects on Soil Microflora». Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3, p. 45-60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in «Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties». Agronomy Monograph Nº 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41, p. 831-871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests, for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeyej, O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116, p. 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). EinfluB von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenuber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38, p. 113-120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., 96, p. 99-113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. TRANSFORMATION AÉROBIE ET ANAÉROBIE DANS LE SOL

1. MÉTHODE

La présente méthode d'essai reprend la méthode TG 307 (2002) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode d'essai s'appuie sur les lignes directrices existantes (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). La méthode décrite ici est conçue pour mesurer la transformation aérobie et anaérobie des substances chimiques dans le sol. Les expériences ont pour but de déterminer i) le taux de transformation de la substance d'essai, et ii) la nature des produits de transformation auxquels les végétaux et les organismes du sol peuvent être exposés, ainsi que les taux de formation et de déplétion de ces produits. Ces études sont nécessaires pour les substances chimiques qui sont appliquées directement sur le sol ou qui sont susceptibles d'atteindre l'environnement du sol. Les résultats de ces études de laboratoire peuvent également être utilisés pour mettre au point des protocoles d'échantillonnage et d'analyse destinés à des études dans des domaines voisins.

Il est généralement suffisant d'effectuer des études aérobies et anaérobies avec un seul type de sol pour déterminer les voies de transformation (8) (10) (11). Les taux de transformation doivent être déterminés dans trois autres sols au moins (8) (10).

Un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, organisé à Belgirate, en Italie, en 1995 (10), a défini notamment le nombre et le type de sols à utiliser dans le cadre de cet essai. Les types de sol testés doivent être représentatifs des conditions environnementales d'utilisation ou de rejet prévus. Par exemple, les substances chimiques devant être appliquées sous des climats subtropicaux ou tropicaux doivent être testées avec des Ferrasols ou des Nitosols (système FAO). Cet atelier a également formulé des recommandations relatives au prélèvement, à la manipulation et au stockage des échantillons de sol, sur la base des lignes directrices de l'ISO (15). L'utilisation de sols de rizières est également étudiée dans le cadre de cette méthode.

1.2. DÉFINITIONS

Substance d'essai: toute substance, qu'il s'agisse de la substance mère ou des produits de transformation correspondants.

Produits de transformation: toute substance résultant de réactions de transformations biotiques ou abiotiques de la substance d'essai et en particulier le CO_2 et les produits qui se trouvent dans les résidus liés.

Résidus liés: les «résidus liés» désignent des composés du sol, végétaux ou animaux, qui subsistent dans la matrice après extraction, sous forme de la substance mère ou de ses métabolite(s)/produits de transformation. La méthode d'extraction ne doit pas modifier de manière substantielle les composés eux-mêmes ni la structure de la matrice. La nature de la liaison peut être clarifiée en partie par des méthodes d'extraction qui modifient la matrice et par des techniques analytiques complexes. C'est de cette façon que l'on a déterminé jusqu'ici la nature de la liaison, covalente, ionique et de la liaison par sorption ou piégeage. De manière générale, la formation de résidus liés abaisse sensiblement la bioaccessibilité et la biodisponibilité (12) [modifié d'après l'UICPA 1984 (13)].

Transformation aérobie: réaction se produisant en présence d'oxygène moléculaire (14).

▼B

Transformation anaérobie: réaction se produisant en l'absence d'oxygène moléculaire (14).

Sol: mélange de constituants chimiques minéraux et organiques, ces derniers contenant des composés à haute teneur en carbone et en azote, et à poids moléculaire élevé, contenant de petits (principalement micro) organismes. Le sol peut être manipulé sous deux formes:

a) non brassé, tel qu'il s'est formé au cours du temps, en couches caractéristiques d'un grand nombre de types de sol;

b) brassé, tel qu'on le trouve habituellement dans les terres arables ou qu'il est recueilli en creusant et tel qu'il est utilisé dans la présente méthode d'essai (14).

Minéralisation: dégradation complète d'un composé organique en CO_2 et H_2O dans des conditions aérobies, et en CH_4, CO_2 et H_2O dans des conditions anaérobies. Dans le cadre de la présente méthode d'essai, lorsqu'on utilise un composé marqué au ^{14}C, la minéralisation désigne la dégradation importante au cours de laquelle un atome de carbone marqué est oxydé quantitativement avec dégagement de la quantité correspondante de $^{14}CO_2$ (14).

Demi-vie: $t_{0,5}$, temps nécessaire à la transformation de 50 % d'une substance d'essai lorsque la transformation peut être décrite par une cinétique du premier ordre; la demi-vie est indépendante de la concentration.

DT_{50} (temps de dégradation 50): période au cours de laquelle la concentration de la substance d'essai diminue de 50 %; elle est différente de la demi-vie $t_{0,5}$ lorsque la transformation ne suit pas une cinétique du premier ordre.

DT_{75} (temps de dégradation 75): période au cours de laquelle la concentration de la substance d'essai diminue de 75 %.

DT_{90} (temps de dégradation 90): période au cours de laquelle la concentration de la substance d'essai diminue de 90 %.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Des substances de référence doivent être utilisées pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation par des méthodes spectroscopiques et chromatographiques.

1.4. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

La méthode s'applique à toutes les substances chimiques (non marquées ou radiomarquées) pour lesquelles il existe une méthode analytique présentant une précision et une sensibilité suffisantes. Elle peut être appliquée aux composés légèrement volatils, non volatils, solubles ou insolubles dans l'eau. L'essai ne doit pas être appliqué aux substances chimiques fortement volatiles à partir du sol (fumigants, solvants organiques) et qui ne peuvent donc pas être maintenues dans le sol dans les conditions expérimentales de cet essai.

▼B

1.5. INFORMATIONS RELATIVES À LA SUBSTANCE D'ESSAI

Une substance d'essai marquée ou non marquée peut être utilisée pour mesurer le taux de transformation. Il est nécessaire d'utiliser du matériel marqué pour étudier les voies de transformation et établir un bilan massique. Le marquage au ^{14}C est recommandé mais l'utilisation d'autres isotopes, comme ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P, peut aussi être utile. Dans la mesure du possible, le marquage doit être situé dans la(les) partie(s) la(les) plus stable(s) de la molécule ([1]). La pureté de la substance d'essai doit être d'au moins 95 %.

Avant de procéder à un essai sur la transformation aérobie et anaérobie dans le sol, il convient de disposer des informations suivantes sur la substance d'essai:

a) solubilité dans l'eau (Méthode A.6)

b) solubilité dans les solvants organiques;

c) pression de vapeur (Méthode A.4) et constante de la loi de Henry;

d) coefficient de partage n-octanol/eau (Méthode A.8);

e) stabilité chimique dans le noir (hydrolyse) (Méthode C.7);

f) coefficient pK_a si une molécule est susceptible de subir une protonation ou une déprotonation (ligne directrice 112 de l'OCDE) (16).

Il peut également être utile de disposer d'informations relatives à la toxicité de la substance d'essai sur les micro-organismes du sol (Méthodes d'essai C.21 et C.22) (16).

Il faut disposer des méthodes analytiques (dont des méthodes d'extraction et de purification) nécessaires à la quantification et à l'identification de la substance d'essai et de ses produits de transformation.

1.6. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Les échantillons de sol sont traités avec la substance d'essai et incubés dans le noir dans des flacons de type biomètre ou dans des systèmes à circulation continue dans des conditions de laboratoire contrôlées (à température et humidité constantes). Après un intervalle de temps approprié, les échantillons de sol sont extraits et analysés pour mesurer la substance mère et les produits de transformation. Les produits volatils sont aussi collectés pour analyse au moyen de dispositifs d'absorption appropriés. À l'aide de produit marqué au ^{14}C, il est possible de mesurer les différents taux de minéralisation de la substance d'essai en piégeant le $^{4}CO_2$ dégagé, et un bilan massique, notamment la formation de résidus liés au sol, peut être établi.

1.7. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.7.1. **Récupération**

L'extraction et l'analyse, en double exemplaire au moins, des échantillons de sol immédiatement après l'addition de la substance d'essai donnent une première indication de la reproductibilité de la méthode analytique et de l'uniformité de la procédure d'application de la substance d'essai. Les taux de récupération concernant les étapes ultérieures des expériences sont fournis par les bilans massiques respectifs. Ces taux de récupération doivent osciller entre 90 % et 110 % pour les substances chimiques marquées (8) et entre 70 % et 110 % pour les substances chimiques non marquées (3).

([1]) Par exemple, si la substance d'essai contient un cycle, il est nécessaire de marquer ce cycle; si la substance d'essai contient deux cycles ou plus, il peut être nécessaire d'effectuer des études distinctes pour évaluer le devenir de chaque cycle marqué et obtenir des informations fiables sur la formation de produits de transformation.

▼B

1.7.2. **Reproductibilité et sensibilité de la méthode analytique**

La reproductibilité de la méthode analytique (à l'exception du rendement d'extraction initial) servant à quantifier la substance d'essai et les produits de transformation peut être contrôlée en effectuant en double les analyses du même extrait de sol, incubé suffisamment longtemps pour permettre la formation de produits de transformation.

Le seuil de détection de la méthode d'analyse de la substance d'essai et des produits de transformation doit être au moins égal à 0,01 $mg.kg^{-1}$ de sol (substance d'essai) ou 1 % de la dose appliquée si celle-ci est inférieure. Le seuil de quantification doit également être spécifié.

1.7.3. **Précision des données de transformation**

L'analyse de régression des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps permet d'obtenir les informations sur la précision de la courbe de transformation et de calculer les limites de confiance des demi-vies (en cas de cinétique du pseudo premier ordre) ou des valeurs DT_{50} et, le cas échéant, des valeurs DT_{75} et DT_{90}.

1.8. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.8.1. **Appareils et réactifs chimiques**

Les incubateurs sont composés de circuits fermés statiques ou de systèmes à circulation continue adaptés (7) (17). Les figures 1 et 2, respectivement, présentent des exemples d'incubateur à circulation continue et de flacons de type biomètre. Les deux types d'incubateur présentent des avantages et des inconvénients (7) (17).

Matériel courant de laboratoire, notamment:

— instruments d'analyse: chromatographie gaz-liquide, chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), chromatographie en couche mince, y compris les systèmes de détection appropriés pour analyser les substances radiomarquées ou non marquées ou la méthode de dilution isotopique inverse,

— instruments destinés à l'identification (spectromètre de masse, chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS, HPLC-MS, RMN, etc.),

— compteur à scintillation liquide,

— appareillage d'oxydation pour la combustion des produits radioactifs,

— centrifugeuse,

— appareil d'extraction (par exemple, tubes de centrifugation pour extraction à froid et appareil pour extraction en continu sous reflux de type soxhlet),

— instrumentation pour concentrer les solutions et les extraits (évaporateur rotatif),

— bain-marie,

— mélangeurs mécaniques (pétrin, mélangeur rotatif).

▼B

Les réactifs chimiques utilisés sont, par exemple:

— NaOH, de pureté analytique, 2 mol . dm^{-3}, ou une autre base appropriée (par exemple, KOH, éthanolamine),

— H_2SO_4, de pureté analytique, 0,05 mol . dm^{-3},

— Éthylène glycol, de pureté analytique,

— matériaux d'absorption solide tels que chaux sodée et tampons de polyuréthane,

— solvants organiques, de pureté analytique, tels qu'acétone, méthanol, etc.,

— liquide de scintillation.

1.8.2. **Application de la substance d'essai**

Pour l'incorporer et la répartir dans le sol, on peut dissoudre la substance d'essai dans l'eau (désionisée ou distillée) ou, si nécessaire, dans une quantité minimale d'acétone ou d'autres solvants organiques (6) dans lesquels la substance d'essai est suffisamment soluble et stable. Toutefois, la quantité de solvant sélectionnée ne doit pas avoir une influence significative sur l'activité microbienne du sol (voir les points 1.5 et 1.9.2-1.9.3). Il convient d'éviter d'utiliser des solvants qui inhibent l'activité microbienne, comme le chloroforme, le dichlorométhane et autres solvants halogénés.

La substance d'essai peut également être ajoutée sous forme solide, mélangée avec du sable de quartz (6) ou dans un petit sous-échantillon de sol séché à l'air et stérilisé. Si la substance d'essai est ajoutée à l'aide d'un solvant, le solvant doit pouvoir s'évaporer avant que le sous-échantillon chargé soit ajouté à l'échantillon original de sol non stérile.

Pour les substances chimiques courantes, dont la principale voie de pénétration dans le sol passe par les boues d'épuration ou le traitement agricole, il convient de commencer par ajouter la substance d'essai dans la boue avant de l'introduire dans l'échantillon de sol (voir les points 1.9.2 et 1.9.3).

Il n'est pas recommandé d'utiliser systématiquement des produits formulés. Toutefois, pour les substances peu solubles, l'utilisation de produit formulé peut être une solution appropriée.

1.8.3. **Sols**

1.8.3.1. *Sélection du sol*

Pour déterminer la voie de transformation, on peut utiliser un sol représentatif; un limon sableux, un limon fin, un limon ou un sable limoneux [selon la classification de la FAO et de l'USDA (18)] avec un pH de 5,5-8,0, une teneur en carbone organique de 0,5-2,5 % et une biomasse microbienne d'au moins 1 % de carbone organique total est recommandée (10).

Pour les études des taux de transformation, il convient d'utiliser au moins trois sols supplémentaires représentatifs de la gamme de sols concernés. La teneur en carbone organique, le pH, la teneur en argile et la biomasse microbienne des sols doivent varier (10).

▼B

Pour tous les sols, il convient d'établir au moins les caractéristiques suivantes: texture (% sable, % limon, % argile) [selon la classification de la FAO et de l'USDA (18)], pH, capacité d'échange cationique, carbone organique, densité apparente, caractéristiques de rétention d'eau ([1]) et biomasse microbienne (pour les études aérobies uniquement). Des informations complémentaires sur les propriétés du sol peuvent être utiles pour interpréter les résultats. Les méthodes recommandées dans les références (19) (20) (21) (22) (23) peuvent être utilisées pour déterminer les caractéristiques du sol. La biomasse microbienne doit être déterminée à l'aide de la méthode de respiration induite par le substrat (SIR) (25) (26) ou d'autres méthodes (20).

1.8.3.2. *Prélèvement, manipulation et stockage des sols*

Il est nécessaire de fournir des informations détaillées sur l'historique du site de prélèvement, qui englobent la localisation, le couvert végétal, les traitements aux substances chimiques, les traitements aux engrais organiques et inorganiques, les apports biologiques ou d'autres contaminations. Si les sols ont été traités avec la substance d'essai ou ses analogues structuraux au cours des quatre années précédentes, ils ne doivent pas être utilisés pour les études de transformation (10) (15).

Le sol doit être fraîchement extrait du site (de l'horizon A ou de la couche supérieure de 20 cm) avec une teneur en eau facilitant le tamisage. Pour les sols autres que les sols de rizières, il faut éviter de prélever les échantillons pendant ou immédiatement après de longues périodes (> 30 jours) de sécheresse, de gel ou d'inondations (14). Les échantillons doivent être transportés de façon à minimiser les modifications de la teneur en eau du sol et conservés dans le noir avec libre circulation d'air, dans la mesure du possible. Un sac en polyéthylène à fermeture non étanche est généralement indiqué à cet effet.

Le sol doit être traité le plus rapidement possible après le prélèvement. Il convient de retirer les gros débris végétaux, animaux et les pierres avant de passer le sol à travers un tamis de 2 mm pour retirer les petits débris de pierres, et les débris animaux et végétaux. Il convient d'éviter de sécher et de broyer le sol de manière importante avant de le tamiser (15).

Lorsqu'il est difficile de prélever des échantillons en hiver (sol gelé ou recouvert d'une couche de neige), ceux-ci peuvent être prélevés sur un lot de sol stocké dans une serre sous couvert végétal (herbe ou mélange d'herbe et de trèfle). Il est nettement préférable d'effectuer des études avec des sols qui viennent d'être extraits du site, mais si le sol prélevé et traité doit être stocké avant le début de l'étude, les conditions de stockage doivent être appropriées et leur durée doit être limitée (4 + 2 °C pendant une durée maximale de trois mois) afin de préserver l'activité microbienne ([2]). On trouvera des instructions détaillées sur le prélèvement, la manipulation et le stockage des sols à utiliser pour les expériences de biotransformation sous les références (8) (10) (15) (26) (27).

([1]) La caractéristique de rétention d'eau d'un sol peut être mesurée comme capacité au champ, capacité de rétention d'eau ou comme potentiel de succion (pF). Pour les explications, voir l'annexe 1. Il convient d'indiquer dans le rapport d'essai si les caractéristiques de rétention d'eau et la densité apparente des sols ont été déterminées sur des échantillons de sol non brassé ou avec des échantillons brassés (transformés).

([2]) Des résultats récents indiquent que les sols des zones tempérées peuvent également être stockés à — 20 °C pendant plus de trois mois (28) (29) sans perte significative de l'activité microbienne.

▼B

Avant son utilisation dans le cadre du présent essai, le sol traité doit être préincubé afin de permettre la germination et l'élimination des semences, et de rétablir l'équilibre du métabolisme microbien après le passage des conditions de prélèvement ou de stockage aux conditions d'incubation. Une période de préincubation de 2 à 28 jours approchant les conditions de température et d'humidité de l'essai réel est généralement indiquée (15). La durée du stockage et de la préincubation ne doit pas dépasser trois mois au total.

1.9. EXÉCUTION DE L'ESSAI

1.9.1. **Conditions de l'essai**

1.9.1.1. *Température de l'essai*

Au cours de toute la période d'essai, les sols doivent être incubés dans le noir, à température constante, respectant les conditions climatiques dans lesquelles l'utilisation ou le rejet interviendra. Une température de 20 ± 2 °C est recommandée pour toutes les substances d'essai susceptibles d'entrer en contact avec le sol dans les climats tempérés. La température doit être enregistrée.

Pour les substances chimiques appliquées ou libérées dans les climats froids (par exemple dans les pays nordiques, pendant l'automne/hiver), des échantillons de sol supplémentaires doivent également être incubés mais à une température plus basse (par exemple à 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Teneur en humidité*

Pour les essais de transformation en milieu aérobie, la teneur en humidité du sol ([1]) doit être ajustée et maintenue à une pF située entre 2,0 et 2,5 (3). La teneur en humidité du sol est exprimée en masse d'eau par masse de sol sec et elle doit être contrôlée régulièrement (toutes les 2 semaines par exemple) en pesant les flacons d'incubation et les pertes en eau doivent être compensées par l'adjonction d'eau (de préférence de l'eau du robinet stérilisée par filtration). Il convient de veiller à éviter ou à réduire les pertes de substance d'essai et/ou des produits de transformation par évaporation et/ou photodégradation (le cas échéant) pendant l'ajout d'eau.

Pour les essais de transformation dans des conditions anaérobies et de rizière, le sol est saturé en eau par submersion.

1.9.1.3. *Conditions d'incubation aérobies*

Dans les systèmes à circulation continue, les conditions aérobies sont maintenues par lessivage périodique ou par aération continue avec de l'air humidifié. Dans les flacons de type biomètre, l'échange d'air est maintenu par diffusion.

1.9.1.4. *Conditions aérobies stériles*

Pour obtenir des informations sur l'importance de la transformation abiotique d'une substance d'essai, les échantillons de sol peuvent être stérilisés (pour les méthodes de stérilisation, voir les références 16 et 29), traités avec une substance d'essai stérile (par exemple l'addition de solution à travers un filtre stérile) et aérés avec de l'air stérile humidifié comme décrit au point 1.9.1.3. Pour les sols de rizière, le sol et l'eau doivent être stérilisés et l'incubation doit être effectuée comme décrit au point 1.9.1.6.

([1]) Le sol ne doit jamais être trop humide ni trop sec afin de maintenir des conditions adéquates d'aération et de nutrition de la microflore du sol. Les teneurs en eau recommandées pour une croissance microbienne optimale vont de 40 à 60 % de capacité de rétention d'eau (WHC) et de 0,1 à 0,33 bar (6). Cette fourchette est équivalente à un intervalle de pF de 2,0-2,5. L'annexe 2 présente la teneur habituelle en eau de plusieurs types de sol.

▼B

1.9.1.5. *Conditions d'incubation anaérobies*

Afin de créer et de maintenir des conditions anaérobies, le sol traité avec la substance d'essai et incubé dans des conditions aérobies pendant 30 jours ou une demi-vie ou DT_{50} (si celle-ci est plus courte) est ensuite recouvert d'eau (couche de 1-3 cm d'eau) et le système d'incubation est balayé avec un gaz inerte (azote ou argon) ([1]). Le système d'essai doit permettre de mesurer le pH, la concentration en oxygène et le potentiel redox et comprendre des dispositifs de piégeage des produits volatiles. Le système de type biomètre doit être fermé pour éviter toute entrée d'air par diffusion.

1.9.1.6. *Conditions d'incubation dans les sols de rizière*

Pour étudier la transformation dans les sols de rizière, le sol est recouvert d'une couche d'eau de 1-5 cm environ et la substance d'essai appliquée à la phase aqueuse (9). Une profondeur de couche de sol de 5 cm au moins est recommandée. Le système est ventilé avec de l'air comme en situation aérobie. Le pH, la concentration en oxygène et le potentiel redox de la couche aqueuse doivent être surveillés et enregistrés. Une période de préincubation de deux semaines au moins est nécessaire avant de commencer les études de transformation (voir le point 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Durée de l' essai*

En règle générale, les études des taux et des voies de transformation ne doivent pas dépasser 120 jours ([2]) (3) (6) (8), parce qu'au-delà, dans un système artificiel en laboratoire qui ne peut se reconstituer naturellement, on peut attendre une diminution de l'activité microbienne du sol avec le temps. S'il est nécessaire de caractériser la déplétion de la substance d'essai et la formation et la déplétion des principaux produits de transformation, les études peuvent être poursuivies pendant une période plus longue (de 6 à 12 mois) (8). Des périodes d'incubation plus longues doivent être justifiées dans le rapport d'essai et accompagnées de mesures de la biomasse pendant et à la fin de ces périodes.

1.9.2. **Exécution de l'essai**

On place 50 à 200 g de sol environ (sur la base du poids sec) dans chaque flacon d'incubation (voir les figures 1 et 2 à l'annexe 3) et on traite le sol avec la substance d'essai en utilisant l'une des méthodes décrites au point 1.8.2. Si l'on utilise des solvants organiques pour appliquer la substance d'essai, il convient de les éliminer du sol par évaporation. Puis, le sol est soigneusement mélangé à l'aide d'une spatule et/ou en agitant le flacon. Si l'étude est menée dans des conditions de sol de rizière, le sol et l'eau doivent être soigneusement mélangés après l'application de la substance d'essai. De petits aliquots (1 g par exemple) des sols traités doivent être analysés pour mesurer la substance d'essai afin de vérifier l'uniformité de la répartition. D'autres méthodes sont décrites ci-dessous.

([1]) Les conditions aérobies sont prédominantes dans les sols de surface et même dans les sols subsurfaciques comme le montre un projet de recherche financé par PUE [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil températures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., p. 270-277, 17-21 août 1992, Sigtuna, Suède]. Les conditions anaérobies ne peuvent se produire qu'occasionnellement sur des sols inondés après d'importantes chutes de pluie ou sur des sols de rizières submergées.

([2]) Les études aérobies doivent être terminées en moins de 120 jours sous réserve que la voie de transformation et la minéralisation se soient effectivement produites à cette date. Il est possible de mettre fin à l'essai au bout de 120 jours, ou lorsque 90 % au moins de la substance d'essai sont transformés, mais seulement s'il y a formation de 5 % de CO_2 au moins.

▼B

Le taux de traitement doit correspondre à la dose d'application la plus élevée d'un produit phytosanitaire recommandée dans les instructions d'utilisation et à l'incorporation uniforme à une profondeur appropriée dans le champ [couche supérieure du sol sur 10 cm ([1])]. Par exemple, pour les substances chimiques appliquées sur le feuillage ou sans enfouissement dans le sol, la profondeur appropriée pour calculer la quantité de substance chimique à ajouter à chaque flacon est de 2,5 cm. Pour les substances chimiques enfouies dans le sol, la profondeur appropriée est la profondeur d'enfouissement spécifiée dans les instructions d'utilisation. Pour les substances chimiques courantes, la dose d'application doit être estimée sur la base de la voie de pénétration la plus pertinente; par exemple, lorsque les boues d'épuration sont la principale voie de pénétration dans le sol, la substance chimique doit être dosée dans la boue à une concentration correspondant à la concentration prévue et la quantité de boue ajoutée au sol doit correspondre à la charge normale en boue des sols agricoles. Si cette concentration n'est pas suffisamment élevée pour identifier les principaux produits de transformation, l'incubation d'échantillons de sol contenant des taux plus élevés peut être utile, mais il convient d'éviter des taux excessifs qui influencent les fonctions microbiennes du sol (voir les points 1.5 et 1.8.2).

Un autre moyen consiste à traiter un lot plus important (de 1 à 2 kg) de sol avec la substance d'essai, en le mélangeant soigneusement dans un mélangeur adapté puis en le transférant en petites fractions de 50 à 200 g dans les flacons d'incubation (par exemple à l'aide de répartiteurs). De petits aliquots (1 g par exemple) du lot de sol traité doivent être analysés afin de vérifier l'uniformité de la répartition de la substance d'essai. Cette procédure est préférable car elle permet une répartition plus uniforme de la substance d'essai dans le sol.

De même, les échantillons de sol non traités sont incubés dans les mêmes conditions (aérobies) que les échantillons traités avec la substance d'essai. Ces échantillons sont utilisés pour mesurer la biomasse pendant le déroulement et à la fin des essais.

Lorsque la substance d'essai est appliquée dans le sol dissous dans un (ou plusieurs) solvant(s) organique(s), des échantillons de sol traité avec la même quantité de solvant(s) sont incubés dans les mêmes conditions (aérobies) que les échantillons traités avec la substance d'essai. Ces échantillons sont utilisés pour mesurer la biomasse au début, pendant le déroulement et à la fin des essais afin de contrôler les effets du(des) solvant(s) sur la biomasse microbienne.

Les flacons contenant le sol traité sont attachés au système à circulation continue décrit à la figure 1 ou fermés par la colonne d'absorption présentée dans la figure 2 (voir l'annexe 3).

([1]) Calcul de la concentration initiale en fonction de la superficie à l'aide de l'équation suivante:

$$C_{sol}[mg/kg_{sol}] = \frac{A[kg/ha]\cdot 10^6[mg/kg]}{l[m]\cdot 10^4[m^2/ha]\cdot d\left[kg_{sol}/m^3\right]}$$

C_{sol} = concentration initiale dans le sol [mg.kg-^{1}]
A = Taux d'application [kg.ha-^{1}]; 1 = épaisseur de la couche de sol du champ [m]; d = densité apparente du sol sec [kg-m-^{3}].
En règle générale, si on applique un taux de 1 kg.ha-^{1}, on obtient une concentration de 1 mg.kg-^{1} environ dans une couche de 10 cm (en supposant une densité apparente de 1 g.cm-^{3}).

▼B

1.9.3. **Échantillonnage et mesures**

Les flacons d'incubation en deux exemplaires sont retirés à des intervalles appropriés et les échantillons de sol extraits à l'aide de solvants appropriés de polarité différente et analysés pour mesurer la substance d'essai et/ou les produits de transformation. Une étude bien conçue comprend un nombre suffisant de flacons de façon à pouvoir sacrifier deux flacons à chaque prélèvement. De plus, des solutions d'absorption ou des matériaux d'absorption solides sont retirés à différents intervalles de temps (tous les 7 jours au cours du premier mois et, au bout d'un mois, tous les 17 jours) pendant et à la fin de l'incubation de chaque échantillon de sol et analysés pour mesurer les produits volatils. Par ailleurs, au moins 5 points supplémentaires de prélèvement devraient être prévus en plus de l'échantillon de sol prélevé directement après application (échantillon de 0 jour). Les intervalles de temps doivent être choisis de façon à pouvoir établir la courbe de déplétion de la substance d'essai et les courbes de formation et de déplétion des produits de transformation (par exemple 0, 1, 3, 7 jours; 2, 3 semaines; 1, 2, 3 mois, etc.).

Lorsqu'on utilise une substance d'essai marquée au ^{14}C, la radioactivité non extractible est quantifiée par combustion et un bilan massique est calculé pour chaque intervalle de prélèvement.

Dans le cas de l'incubation anaérobie et des sols de rizière, la phase sol et la phase aqueuse peuvent être analysées ensemble pour mesurer la substance d'essai et les produits de transformation ou séparées par filtration ou centrifugation avant extraction et analyse.

1.9.4. **Essais facultatifs**

Il peut être utile d'effectuer des études aérobies non stériles à d'autres températures et humidités de sol pour estimer l'influence de la température et de l'humidité du sol sur le taux de transformation d'une substance d'essai et/ou de ses produits de transformation dans le sol.

On peut essayer d'effectuer une caractérisation plus poussée de la radioactivité non extractible en utilisant, par exemple, l'extraction par un fluide supercritique.

2. **DONNÉES**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Les quantités de substance d'essai, de produits de transformation, de substances volatiles (en % uniquement) et non extractibles doivent être données en pourcentage de la concentration initiale appliquée et, s'il y a lieu, en $mg.kg^{-1}$ de sol (sur la base du poids sec de sol) à chaque intervalle de prélèvement. Pour chaque intervalle de prélèvement, un bilan massique doit être donné en pourcentage de la concentration initiale appliquée. La représentation graphique des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps permet d'estimer sa durée de demi-vie de la transformation ou sa DT_{50}. Les produits de transformation principaux doivent être identifiés et leurs concentrations doivent également être présentées graphiquement en fonction du temps afin de montrer leurs taux de formation et de déplétion. On entend par produit de transformation principal tout produit représentant > 10 % de la dose appliquée à n'importe quel moment de l'étude.

Les produits volatils piégés donnent une indication du potentiel de volatilité d'une substance d'essai et de ses produits de transformation à partir du sol.

▼B

Il est possible de déterminer avec plus de précision les demi-vies ou les valeurs DT_{50} et, s'il y a lieu, les valeurs DT_{75} et DT_{90} en utilisant des méthodes de calcul fondées sur des modèles cinétiques appropriés. La durée de demi-vie et les valeurs DT_{50} doivent être notées dans le rapport avec la description du modèle cinétique utilisé, l'ordre de la cinétique et le coefficient de détermination (r^2). La cinétique du premier ordre est préférable sauf si $r^2 < 0,7$. Si nécessaire, les calculs doivent aussi être appliqués aux principaux produits de transformation. Des exemples des modèles appropriés sont décrits sous les références 31 à 35.

Dans le cas des études de taux effectuées à des températures différentes, les taux de transformation doivent être décrits comme fonction de la température à l'intérieur de l'intervalle de température de l'expérience en appliquant la formule de la relation d'Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } lnk = 1nA - \frac{B}{T}$$

où In A et B sont des constantes de régression, respectivement, l'intersection et la pente de la droite d'interpolation produite par régression linéaire de In k par rapport à 1/T, où k est la constante de vitesse à la température T et T la température en degrés Kelvin. Il convient de prendre soin à l'intervalle limité de température à l'intérieur de laquelle la relation d'Arrhenius est valable dans le cas où la transformation dépend de l'activité microbienne.

2.2. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Bien que les études soient effectuées dans un système artificiel en laboratoire, les résultats permettent d'estimer le taux de transformation de la substance d'essai ainsi que les taux de formation et de déplétion des produits de transformation dans des conditions de terrain (36) (37).

L'étude des voies de transformation d'une substance d'essai donne des informations sur la façon dont la structure de la substance appliquée est modifiée dans le sol par des réactions chimiques et microbiennes.

3. **RAPPORT**

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nom courant, nom chimique, numéro de fichier CAS, formule structurale [indiquant la(les) position (s) du(des) marquage(s) lorsqu'on utilise un produit radiomarqué] et propriétés physico-chimiques pertinentes (voir le point 1.5),

— pureté (impuretés) de la substance d'essai,

— pureté radiochimique de la substance marquée et activité spécifique (s'il y a lieu).

Substances de référence:

— nom et structure chimique des substances de référence utilisées pour caractériser et/ou identifier le produit de transformation.

Sol d'essai:

— détails du site de prélèvement,

— date et procédure d'échantillonnage du sol,

▼B

— propriétés des sols: pH, teneur en carbone organique, texture (% sable, % limon, % argile), capacité d'échange cationique, densité apparente, caractéristique de rétention d'eau, et biomasse microbienne,

— durée et conditions de stockage du sol (s'il y a lieu).

Conditions d'essai:

— dates de réalisation des études,

— quantité de substance d'essai appliquée,

— solvants utilisés et méthode d'application de la substance d'essai,

— poids de sol traité initialement et prélevé à chaque intervalle pour analyse,

— description du système d'incubation utilisé,

— débit d'écoulement de l'air (pour les systèmes à circulation continue uniquement),

— température au début de l'expérience,

— teneur en humidité du sol pendant l'incubation,

— biomasse microbienne au début, pendant le déroulement et à la fin des études aérobies,

— pH, concentration en oxygène et potentiel redox au début, pendant le déroulement et à la fin des études anaérobies et des sols de rizière,

— méthode(s) d'extraction,

— méthodes de quantification et d'identification de la substance d'essai et des principaux produits de transformation dans le sol et matériau d'absorption,

— nombre de réplicats et nombre de témoins.

Résultats:

— résultat de la détermination de l'activité microbienne,

— reproductibilité et sensibilité des méthodes analytiques utilisées,

— taux de récupération (les pourcentages acceptables pour que l'étude soit valable sont présentés au point 1.7.1),

— tableaux de résultats exprimés en % de la dose initiale appliquée et, s'il y a lieu, en $mg.kg^{-1}$ de sol (sur la base de poids sec),

— bilan massique pendant et à la fin des études,

— caractérisation de la radioactivité non extractible (liée) ou des résidus dans le sol,

— quantification du CO_2 dégagé et des autres composés volatiles,

— graphes représentant la concentration de la substance d'essai dans le sol en fonction du temps et, s'il y a lieu, des principaux produits de transformation,

— demi-vie ou DT_{50}, DT_{75} et DT_{90} pour la substance d'essai et, s'il y a lieu, des principaux produits de transformation, ainsi que les limites de confiance,

▼B

— estimation de la vitesse de dégradation abiotique dans des conditions stériles,

— évaluation de la cinétique de transformation de la substance d'essai et, s'il y a lieu, des principaux produits de transformation,

— voies de transformation proposées, s'il y a lieu,

— discussion et interprétation des résultats,

— données brutes (chromatogramme des échantillons, calcul des vitesses de transformation des échantillons et moyens utilisés pour identifier les produits de transformation).

4. **RÉFÉRENCES**

(1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) Union européenne (UE) (1995). Directive 95/36/CE de la Commission du 14 juillet 1995 modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. Annexe II, partie A, et annexe III, partie A: Devenir et comportement dans l'environnement.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie fur die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation Systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF — Japon 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OCDE (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italie, 18-20 January 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academie Press, p. 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(14) Ligne directrice de l'OCDE 304 A: Biodégradabilité intrinsèque dans le sol (adoptée le 12 mai 1981).

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Qualité des sols — Échantillonnage — Partie 6: Guide du prélèvement, de la manipulation et du stockage des sols pour l'évaluation des processus microbiens en laboratoire.

(16) Annexe V de la directive 67/548/CEE.

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, p. 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO Systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Kliite, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemicai and physical méthodes of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Schefïer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, p. 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, p. 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio- transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, p. 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, p. 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, p. 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, p. 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In «Environmental Dynamics of Pesticides». R. Haque and V.H. Freed, Eds., p. 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide résidus. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, p. 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, p. 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, p. 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, p. 83-122.

▼B

Annexe 1

SUCCION, CAPACITÉ AU CHAMP (FC) ET CAPACITÉ DE RÉTENTION D'EAU (WHC) ([1])

Hauteur de la colonne d'eau [cm]	pF ([a])	bar ([b])	Remarques
10^7	7	10^4	Sol sec
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Point de flétrissement
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 ([c])	Échelle de la capacité au champ ([d])
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	Capacité de rétention d'eau (approximation)
1	0	0,001	Sol saturé en eau

([a]) pF = log de la colonne d'eau en cm.
([b]) 1 bar = 10^5 Pa.
([c]) Correspond à une teneur en eau approximative de 10 % dans le sable, de 35 % dans le limon et de 45 % dans l'argile.
([d]) La capacité au champ n'est pas constante mais varie selon le type de sol de pF 1,5 à 2,5.

La *succion* est mesurée en cm de colonne d'eau ou en bar. Comme l'échelle de valeur de la succion est très large, celle-ci est exprimée simplement en pF, qui est égal au logarithme de la colonne d'eau en cm.

La *capacité au champ* (FC) est définie comme la quantité d'eau qui peut être stockée contre la gravité par un sol naturel 2 jours après une longue période de pluie ou après une irrigation suffisante. Elle est déterminée dans un sol non brassé in situ dans le champ. Cette mesure ne peut donc pas s'appliquer aux échantillons de sol brassé. Les valeurs de capacité au champ déterminées dans les sols brassés peuvent présenter une variabilité systématique importante.

La *capacité de rétention d'eau* (WHC) est déterminée en laboratoire avec un sol non brassé et un sol brassé en saturant une colonne de sol avec de l'eau par capillarité. Elle est particulièrement utile pour les sols brassés et peut être jusqu'à 30 % supérieure à la capacité au champ (1). Elle est également plus facile à déterminer expérimentalement que des valeurs de capacité au champ fiables.

Notes

([1]) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

Annexe 2

TENEUR EN HUMIDITÉ (g d'eau pour 100 g de sol sec) DE DIFFÉRENTS TYPES DE SOL PROVENANT DE DIFFÉRENTS PAYS

Type de sol	Pays	Teneur en humidité à		
		WHC (1)	pF = 1,8	pF = 2,5
Sable	Allemagne	28,7	8,8	3,9
Sable limoneux	Allemagne	50,4	17,9	12,1
Sable limoneux	Suisse	44,0	35,3	9,2
Limon fin	Suisse	72,8	56,6	28,4
Limon argileux	Brésil	69,7	38,4	27,3
Limon argileux	Japon	74,4	57,8	31,4
Limon sableux	Japon	82,4	59,2	36,0
Limon fin	États-Unis	47,2	33,2	18,8
Limon sableux	États-Unis	40,4	25,2	13,3

(1) Capacité de rétention d'eau

▼B

Annexe 3

Figure 1

Exemple d'appareil à circulation continue pour étudier la transformation des substances chimiques dans le sol ([1]) ([2])

1: robinet à pointeau

2: bouteille de lavage du gaz contenant de l'eau

3: ultramembrane (conditions stériles uniquement), taille de pore 0,2 µm

4: flacon pour le métabolisme du sol (saturé en eau uniquement pour les conditions anaérobies et de rizière)

5: piège à éthylène glycol pour les composés volatils organiques

6: piège à acide sulfurique pour les composés alcalins volatils

7, 8: piège d'hydroxyde de sodium pour le CO_2 & autres acides volatils

9: débitmètre

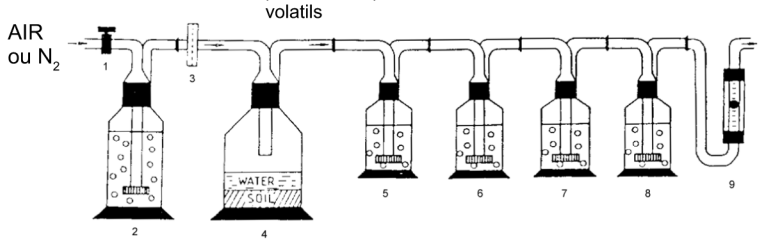
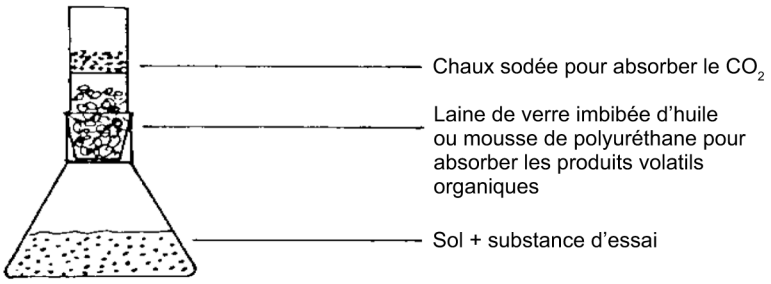


Figure 2

Exemple de flacon de type biomètre pour l'étude de la transformation des substances chimiques dans le sol ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academie Press, p. 123-157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, p. 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, p. 141-146.

▼B

C.24. TRANSFORMATION AÉROBIE ET ANAÉROBIE DANS LES SYSTÈMES SÉDIMENTAIRES AQUATIQUES

1. MÉTHODE

La présente méthode d'essai reprend l'essai TG 308 (2002) de l'OCDE.

1.1. INTRODUCTION

Les substances chimiques peuvent pénétrer dans les eaux de surface peu ou très profondes par des voies telles que l'application directe, la déperdition lors de l'épandage, le ruissellement, le drainage, l'élimination des déchets, les effluents industriels, domestiques ou agricoles et le dépôt atmosphérique. La présente méthode d'essai décrit une méthode de laboratoire conçue pour évaluer la transformation aérobie et anaérobie des substances chimiques organiques dans les systèmes sédimentaires aquatiques. Elle s'appuie sur les lignes directrices existantes (1) (2) (3) (4) (5) (6). Un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, qui s'est tenu à Belgirate, en Italie, en 1995 (7), a défini notamment le nombre et le type de sédiments à utiliser dans le cadre de cet essai. Il a également formulé des recommandations relatives au prélèvement, à la manipulation et au stockage des échantillons de sédiments, sur la base des lignes directrices de l'ISO (8). Ces études sont nécessaires pour les substances chimiques qui sont introduites directement dans l'eau ou qui sont susceptibles de pénétrer dans le milieu aquatique par les voies décrites ci-dessus.

La phase aqueuse supérieure des systèmes sédimentaires aquatiques présente souvent des conditions aérobies. La couche superficielle du sédiment peut être aérobie ou anaérobie, alors que, en profondeur, le sédiment est généralement anaérobie. Afin de tenir compte de toutes ces possibilités, le présent document décrit des essais aérobies et anaérobies. L'essai aérobie simule une colonne d'eau aérobie sur une couche de sédiment aérobie et une sous-couche avec un gradient anaérobie. L'essai anaérobie simule un système eau-sédiment complètement anaérobie. Si, selon les circonstances, il est nécessaire de s'écarter sensiblement de ces recommandations, par exemple en utilisant des carottes de sédiment intact ou des sédiments qui ont pu être exposés à la substance d'essai, il existe d'autres méthodes à cette fin (9).

1.2. DÉFINITIONS

Il convient d'utiliser dans tous les cas les unités standard internationales (SI).

Substance d'essai: toute substance, qu'il s'agisse de la substance mère ou des produits de transformation correspondants.

Produits de transformation: toutes les substances résultant des réactions de transformation biotiques et abiotiques de la substance d'essai, et notamment le CO_2 et les résidus liés.

Résidus liés: les «résidus liés» désignent des composés du sol, végétaux ou animaux, qui subsistent dans la matrice après extraction, sous la forme de la substance mère ou de ses métabolite(s). La méthode d'extraction ne doit pas modifier de manière substantielle les composés eux-mêmes ni la structure de la matrice. La nature de la liaison peut être clarifiée en partie par les méthodes d'extraction qui modifient la matrice et des techniques analytiques sophistiquées. C'est de cette façon que l'on a déterminé jusqu'ici la nature de la liaison, covalente ionique, par sorption ou piégeage. De manière générale, la formation de résidus liés abaisse sensiblement la bioaccessibilité et la biodisponibilité (10) [modifié d'après l'UICPA 1984 (11)].

▼B

Transformation aérobie: (oxydation): réaction se produisant en présence d'oxygène moléculaire (12).

Transformation anaérobie: (réduction): réaction se produisant en l'absence d'oxygène moléculaire (12).

Eaux naturelles: eaux superficielles provenant de mares, rivières, fleuves, etc.

Sédiment: mélange de constituants chimiques minéraux et organiques, ces derniers contenant des composés à haute teneur en carbone et en azote et à masse moléculaire élevée. Il est déposé par les eaux naturelles avec lesquelles il forme une interface.

Minéralisation: dégradation complète d'un composé organique en CO_2 et H_2O dans des conditions aérobies, et en CH_4, CO_2 et H_2O dans des conditions anaérobies. Dans le cadre de la présente méthode d'essai, lorsqu'on utilise un composé radiomarqué, la minéralisation désigne la dégradation importante au cours de laquelle un atome de carbone marqué est oxydé ou réduit quantitativement avec dégagement de la quantité correspondante de $^{14}CO_2$ ou de $^{14}CH_4$, respectivement.

Demi-vie, $t_{0,5}$, temps nécessaire à la transformation de 50 % d'une substance d'essai lorsque la transformation peut être décrite par une cinétique du premier ordre; elle est indépendante de la concentration initiale.

DT_{50} (temps de dégradation 50): période au cours de laquelle la concentration initiale de la substance d'essai diminue de 50 %.

DT_{75} (temps de dégradation 75): période au cours de laquelle la concentration initiale de la substance d'essai diminue de 75 %.

DT_{90} (temps de dégradation 90): période au cours de laquelle la concentration initiale de la substance d'essai diminue de 90 %.

1.3. SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Des substances de référence doivent être utilisées pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation par des méthodes spectroscopiques et chromatographiques.

1.4. INFORMATIONS RELATIVES À LA SUBSTANCE D'ESSAI

Une substance d'essai marquée ou non marquée peut être utilisée pour mesurer le taux de transformation, bien qu'il soit préférable d'utiliser du matériel marqué. Il est nécessaire d'utiliser du matériel marqué pour étudier les voies de transformation et établir un bilan massique, le marquage au ^{14}C est recommandé mais l'utilisation d'autres isotopes, comme ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P, peut aussi être utile. Dans la mesure du possible, le-marquage doit être situé dans la partie(s) la plus stable de la molécule ([1]). La substance d'essai doit avoir une pureté chimique et/ou radiochimique d'au moins 95 %.

Avant de procéder à un essai, il convient de disposer des informations suivantes sur la substance d'essai:

a) solubilité dans l'eau (Méthode A.6);

b) solubilité dans les solvants organiques;

c) pression de vapeur (Méthode A.4) et constante de la loi de Henry;

([1]) Par exemple, si la substance d'essai contient un cycle, il est nécessaire de marquer ce cycle; si la substance d'essai contient deux cycles ou plus, il peut être nécessaire d'effectuer des études distinctes pour évaluer le devenir de chaque cycle marqué et obtenir des informations fiables sur la formation de produits de transformation.

▼B

d) coefficient de partage n-octanol/eau (Méthode A.8);

e) coefficient d'adsorption (K_d, K_r ou K_{oc}, s'il y a lieu) (Méthode C.18);

f) hydrolyse (Méthode C.7);

g) constante de dissociation (pK_a) [ligne directrice 112 de l'OCDE] (13);

h) structure chimique de la substance d'essai et position des marqueurs isotopiques, s'il y a lieu.

Note: Il convient d'indiquer la température à laquelle ces mesures ont été effectuées.

Il peut également être utile de disposer d'informations sur la toxicité de la substance d'essai sur les micro-organismes, sur la biodégradabilité immédiate et/ou intrinsèque, ainsi que sur la transformation aérobie et anaérobie dans le sol.

Il faut disposer des méthodes analytiques (dont des méthodes d'extraction et de purification) nécessaires à la quantification et à l'identification de la substance d'essai et de ses produits de transformation dans l'eau et dans les sédiments (voir le point 1.7.2).

1.5. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La méthode décrite ici emploie un système sédimentaire aquatique aérobie et anaérobie (voir l'annexe 1) qui permet:

i) de mesurer le taux de transformation de la substance d'essai dans le sédiment;

ii) de mesurer le taux de transformation de la substance d'essai dans le sédiment;

iii) de mesurer le taux de minéralisation de la substance d'essai et/ou de ses produits de transformation (lorsqu'on utilise une substance d'essai marquée au ^{14}C);

iv) d'identifier et de quantifier les produits de transformation dans les phases aqueuse et sédimentaire et notamment le bilan massique (lorsqu'on utilise une substance d'essai marquée);

v) de mesurer la répartition de la substance d'essai et de ses produits de transformation entre les deux phases pendant une période d'incubation dans le noir (pour éviter, par exemple, la prolifération d'algues) à température constante. Les durées de demi-vie, les valeurs DT_{50}, DT_{75} et DT_{90} sont déterminées lorsque les données le permettent, mais elles ne doivent pas être extrapolées bien au-delà de la période expérimentale (voir le point 1.2).

Au moins deux sédiments et les phases aqueuses associées sont nécessaires pour les études aérobies et anaérobies respectivement (7). Il peut toutefois être nécessaire dans certains cas d'utiliser plus de deux sédiments aquatiques, par exemple, pour une substance chimique pouvant être présente dans l'eau douce et/ou le milieu marin.

▼B

1.6. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

La méthode peut être appliquée aux substances chimiques (marquées ou non marquées) pour lesquelles il existe une méthode analytique de précision et de sensibilité suffisantes. Elle s'applique à des composés faiblement volatils, non volatils, hydrosolubles ou peu hydrosolubles. L'essai ne doit pas être appliqué aux substances chimiques fortement volatiles dans l'eau (fumigants, solvants organiques) et qui ne peuvent donc pas être gardées dans l'eau et/ou le sédiment dans les conditions expérimentales de cet essai.

La méthode a été appliquée jusqu'ici pour étudier la transformation des substances chimiques dans les eaux douces et dans les sédiments, mais, en principe, elle peut également être appliquée aux systèmes estuariens/marins. Elle n'est pas adaptée à la simulation des conditions de l'eau courante (rivières) ou de pleine mer.

1.7. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.7.1. **Récupération**

L'extraction et l'analyse, au moins en double exemplaire, des échantillons d'eau et de sédiment immédiatement après l'addition de la substance d'essai donnent une première indication de la reproductibilité de la méthode analytique et de l'uniformité de la procédure d'application de la substance d'essai. Les taux de récupération des stades ultérieurs des expériences sont fournis par les bilans massiques respectifs (lorsqu'on utilise une substance marquée). Les taux de récupération doivent osciller entre 90 % et 110 % pour les substances chimiques marquées (6) et entre 70 % et 110 % pour les substances chimiques non marquées.

1.7.2. **Reproductibilité et sensibilité de la méthode analytique**

La reproductibilité de la méthode analytique (à l'exception du rendement d'extraction initial) servant à quantifier la substance d'essai et les produits de transformation peut être contrôlée en effectuant en double les analyses du même extrait d'échantillons d'eau ou de sédiments, incubés suffisamment longtemps pour permettre la formation de produits de transformation.

La limite de détection de la méthode d'analyse de la substance d'essai et ses produits de transformation doit être au moins égale à 0,01 $mg.kg^{-1}$ dans l'eau ou le sédiment (substance d'essai) ou à 1 % de la quantité initiale appliquée à un système d'essai si cette quantité est inférieure. La limite de quantification doit également être spécifiée.

1.7.3. **Précision des données de transformation**

L'analyse de régression des concentrations de la substance d'essai en fonction du temps permet d'obtenir les informations appropriées sur la précision de la courbe de transformation et de calculer les limites de confiance des demi-vies (en cas de cinétique du pseudo premier ordre) ou des valeurs DT_{50} et, le cas échéant, des valeurs DT_{75} et DT_{90}.

1.8. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.8.1. **Système et appareillage d'essai**

L'étude doit être effectuée dans des récipients en verre (bouteilles, tubes de centrifugation), à moins que les informations préliminaires (coefficient de partage n-octanol/eau, données de sorption, etc.) indiquent que la substance d'essai risque d'adhérer au verre, auquel cas on peut envisager l'utilisation d'un autre matériau (Téflon). Lorsque l'on sait que la substance d'essai adhère au verre, il est possible de contourner le problème en utilisant l'une des méthodes suivantes:

▼B

— déterminer la masse de la substance d'essai et de ses produits de transformation sorbés sur le verre,

— veiller à nettoyer toute la verrerie à l'aide d'un solvant à la fin de l'essai,

— utilisation de produits formulés (voir également le point 1.9.2),

— utilisation d'une quantité croissante de cosolvant pour ajouter la substance d'essai au système; si l'on utilise un cosolvant, celui-ci ne doit pas entraîner de réaction de solvolyse avec la substance d'essai.

Des exemples d'appareillage d'essai courant (systèmes à flux continu et biomètres) sont présentés dans les annexes 2 et 3, respectivement (14). On trouvera d'autres systèmes d'incubation sous la référence 15. L'appareil utilisé pour l'expérience doit permettre l'échange d'air ou d'azote et le piégeage des produits volatils. Les dimensions de l'appareillage doivent permettre de satisfaire aux exigences de l'essai (voir le point 1.9.1). La ventilation peut être effectuée soit par léger barbotage soit en faisant circuler de l'air ou de l'azote à la surface de l'eau. Dans ce cas, il est conseillé de remuer doucement la surface de l'eau pour obtenir une meilleure répartition de l'oxygène ou de l'azote dans l'eau. Il ne faut pas utiliser d'air sans CO_2 car cela pourrait entraîner une augmentation du pH de l'eau. Dans les deux cas, il n'est pas souhaitable de toucher au sédiment et il convient de l'éviter dans toute la mesure du possible. Les substances chimiques faiblement volatiles doivent être testées dans un système de type biomètre en remuant légèrement la surface de l'eau. Des récipients fermés avec un espace libre d'air atmosphérique ou d'azote et des fioles à l'intérieur pour le piégeage des produits volatils peuvent également être utilisés (16). Un bon échange du gaz de surface est nécessaire dans l'essai aérobie afin de compenser la consommation d'oxygène par la biomasse.

La liste non restrictive des pièges adaptés à la collecte des produits de transformation volatils est la suivante: solutions à 1 $mol.dm^{-3}$ d'hydroxyde de potassium ou d'hydroxyde de sodium pour le dioxyde de carbone ([1]) et éthylène glycol, éthanolamine ou 2 % paraffine dans le xylène pour les composés organiques. Les produits volatils formés en anaérobie, comme le méthane, peuvent être récupérés, par exemple, à l'aide de tamis moléculaires. Ces produits volatils peuvent être brûlés, par exemple, en CO_2 en faisant passer le gaz à travers un tube de quartz rempli de CuO à la température de 900 °C et en piégeant le CO_2 formé dans une colonne d'absorption contenant un produit alcalin (17).

Des instruments de laboratoire pour l'analyse chimique de la substance d'essai et des produits de transformation sont nécessaires [chromatographie gaz-liquide (GLQ), chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), chromatographie en couche mince (TLC), spectroscopie de masse (MS), chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), résonance magnétique nucléaire (RMN), etc.], ainsi que, le cas échéant, des dispositifs de détection des substances chimiques radiomarquées ou non marquées. Lorsqu'on utilise des substances radiomarquées, un compteur à scintillation liquide et un appareil d'oxydation pour la combustion (pour la combustion des échantillons de sédiment avant l'analyse de radioactivité) sont également nécessaires.

D'autres équipements courants de laboratoire peuvent s'avérer nécessaires selon le cas pour effectuer des analyses physico-chimiques et biologiques (voir le tableau 1 du point 1.8.2.2), ainsi que de la verrerie, des produits chimiques et des réactifs.

([1]) Comme ces solutions d'absorption alcalines absorbent également le dioxyde de carbone de l'air de ventilation et de l'air formé par la respiration dans les expériences aérobies, il convient de les changer à intervalles réguliers afin d'éviter leur saturation et par conséquent la perte de leur capacité d'absorption.

▼B

1.8.2. **Sélection et nombre de sédiments aquatiques**

Les sites de prélèvement doivent être choisis en fonction de la finalité de l'essai dans une situation donnée. Pour choisir les sites de prélèvement, il convient de prendre en compte l'historique des éventuels apports agricoles, industriels ou domestiques dans le bassin versant et les eaux en amont. Les sédiments ne doivent pas être utilisés s'ils ont été contaminés par la substance d'essai ou ses analogues structuraux au cours des quatre années précédentes.

1.8.2.1. *Sélection des sédiments*

On utilise généralement deux sédiments pour les études aérobies (7). Les deux sédiments sélectionnés doivent différer en texture et en teneur en carbone organique. Un sédiment doit avoir une teneur élevée en carbone organique (2,5-7,5 %) et une texture fine, et l'autre doit avoir une teneur en carbone organique peu élevée (0,5-2,5 %) et une texture grossière. La différence de teneur en carbone organique doit être normalement égale ou supérieure à 2 %. On entend par «texture fine» une teneur en [argile + limon] ([1]) > 50 % et par «texture grossière» une teneur en [argile + limon] < 50 %. La différence de teneur [argile + limon] entre les deux sédiments doit être normalement égale ou supérieure à 20 %. Dans le cas où des substances chimiques risquent d'entrer également en contact avec les eaux de mer, au moins un des deux systèmes eau-sédiment doit être d'origine marine.

Pour l'étude strictement anaérobie, deux échantillons de sédiments (ainsi que la phase aqueuse associée) doivent être prélevés dans les zones anaérobies des systèmes à eaux de surface (7). Les sédiments comme les phases aqueuses doivent être manipulés et transportés avec précaution en évitant tout contact avec l'oxygène.

D'autres paramètres peuvent présenter de l'importance dans la sélection des sédiments et ils doivent être envisagés cas par cas. Par exemple, le pH des sédiments est important pour tester les substances chimiques dont la transformation et/ou la sorption peuvent être dépendantes du pH. La dépendance au pH de la sorption peut être une conséquence du pK_a de la substance d'essai.

1.8.2.2. *Caractérisation des échantillons eau-sédiment*

Les paramètres clés qui doivent être mesurés et notés dans le rapport (en indiquant la méthode utilisée) pour l'eau et pour le sédiment, ainsi que l'étape de l'essai à laquelle ces paramètres doivent être déterminés, sont résumés dans le tableau ci-dessous. Pour information, les méthodes de détermination de ces paramètres sont fournies sous les références (18) (19) (20) (21).

Par ailleurs, il peut être nécessaire de mesurer et d'enregistrer d'autres paramètres selon le cas [eau douce: particules, alcalinité, dureté, conductivité, NO_3/PO_4 (rapport et valeurs individuelles); pour les sédiments: capacité d'échange cationique, capacité de rétention d'eau, carbonate, azote total et phosphore; pour les systèmes marins: salinité]. Il peut également être utile d'analyser les sédiments et l'eau pour mesurer le nitrate, le sulfate, le fer biodisponible, et d'autres accepteurs d'électrons peuvent aussi être utiles pour évaluer les conditions redox, notamment en ce qui concerne la transformation anaérobie.

([1]) [Argile + limon] est la fraction minérale du sédiment de granulométrie < 50 μm.

▼B

Paramètres mesurés pour la caractérisation des échantillons d'eau et de sédiment (7) (22) (23)

Paramètre	Étape de la procédure d'essai					
	prélèvement sur site	post-manipulation	début de l'acclimatation	début de l'essai	pendant l'essai	à la fin de l'essai
Eau						
Origine/source	x					
Température	x					
pH	x		x	x	x	x
Carbone organique total			x	x		x
Concentration O_2*	x		x	x	x	x
Potentiel redox*			x	x	x	x
Sédiment						
Origine/source	x					
Profondeur de la couche	x					
pH		x	x	x	x	x
Répartition de la taille des particules		x				
Carbone organique total		x	x	x		x
Biomasse microbienne (**)		x		x		x
Potentiel redox (*)	Observation (couleur/odeur)		x	x	x	x

(*) Selon des résultats récents, les mesures des concentrations d'oxygène dans l'eau et des potentiels redox n'ont de valeur ni mécanique ni prédictive en ce qui concerne la croissance et le développement de colonies microbiennes dans les eaux superficielles (24) (25). La détermination de la demande biochimique en oxygène (lors du prélèvement, au début et à la fin de l'essai) et des concentrations de micro/macroéléments nutritifs Ca, Mg et Mn (au début et à la fin de l'essai) dans l'eau et la mesure du N total et du P total dans les sédiments (lors du prélèvement et à la fin de l'essai) peuvent être de meilleurs outils pour interpréter et évaluer les taux et les voies de biotransformation aérobie.

(**) Méthode du taux de respiration microbienne (26), méthode de fumigation (27) ou mesures de numération (bactéries, actinomycètes, champignons et colonies totales) pour les études aérobies; taux de méthanogenèse pour les études anaérobies.

1.8.3. **Prélèvement, manipulation et stockage**

1.8.3.1. *Prélèvement*

Il convient de se référer au projet de ligne directrice ISO sur l'échantillonnage des fonds sédimentaires (8) pour prélever les échantillons de sédiment. Les échantillons de sédiment doivent être prélevés sur la totalité de la couche supérieure de 5 à 10 cm du sédiment. L'eau correspondante doit être collectée sur le même site ou dans le même lieu et en même temps que le sédiment. Pour l'étude anaérobie, le sédiment et l'eau correspondante doivent être prélevés et transportés en évitant tout contact avec l'oxygène (28) (voir le point 1.8.2.1). Quelques dispositifs d'échantillonnage sont décrits dans la littérature (8) (23).

▼B

1.8.3.2. *Manipulation*

Le sédiment est séparé de l'eau par filtration et passé au travers d'un tamis de 2 mm en utilisant l'eau excédentaire prélevée sur le même site qui est ensuite éliminée. Des quantités connues de sédiments et d'eau sont ensuite mélangées dans le rapport désiré (voir le point 1.9.1) dans des flacons d'incubation et préparées pour la période d'acclimatation (voir le point 1.8.4). Pour l'étude anaérobie, toutes les étapes de la manipulation doivent être effectuées en l'absence d'oxygène (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. *Stockage*

Il est vivement recommandé d'utiliser des sédiments et de l'eau fraîchement prélevés, mais si le stockage est nécessaire, le sédiment et l'eau doivent être tamisés comme décrit ci-dessus et stockés ensemble, recouverts d'eau (couche d'eau de 6-10 cm), dans l'obscurité, à 4 ± 2 °C[4] pendant une durée maximale de quatre semaines (7) (8) (23). Les échantillons destinés aux études aérobies doivent être stockés en laissant un accès libre à l'air (dans des récipients ouverts), alors que les échantillons destinés aux études anaérobies doivent être conservés en l'absence d'oxygène. Il ne faut pas que le sédiment et l'eau soient congelés ni que le sédiment sèche pendant le transport et le stockage.

1.8.4. **Préparation des échantillons de sédiment/eau pour l'essai**

Une période d'acclimatation doit être respectée avant d'ajouter la substance d'essai, au cours de laquelle chaque échantillon de sédiment/eau est placé dans le récipient d'incubation à utiliser dans l'essai principal, et l'acclimatation est réalisée exactement dans les mêmes conditions que l'incubation de l'essai (voir le point 1.9.1). La période d'acclimatation est le temps nécessaire pour atteindre une stabilité suffisante du système, en termes de pH, de concentration de l'oxygène dans l'eau, de potentiel redox du sédiment et de l'eau, et de séparation macroscopique des phases. La période d'acclimatation doit durer normalement de une à deux semaines et elle ne doit pas excéder quatre semaines. Le résultat des déterminations effectuées pendant cette période doit être enregistré.

1.9. RÉALISATION DE L'ESSAI

1.9.1. **Conditions de l'essai**

L'essai doit être effectué dans le dispositif d'incubation (voir le point 1.8.1) avec un rapport de volume eau/sédiment situé entre 3:1 et 4:1, et une couche sédimentaire de 2,5 cm (± 0,5 cm). ([1]) On recommande une quantité minimale de 50 g de sédiment (sur une base de poids sec) par récipient d'incubation.

L'essai doit être effectué dans le noir à température constante dans la fourchette de 10 à 30 °C. La température indiquée est de 20 ± 2 °C. Le cas échéant, une température supplémentaire plus basse (10 °C par exemple) peut être envisagée selon le cas, en fonction de l'information que l'on souhaite retirer de l'essai. La température d'incubation doit être surveillée et enregistrée.

([1]) Selon des études récentes, un stockage à 4 °C peut entraîner une diminution de la teneur en carbone organique du sédiment, ce qui risque d'entraîner une diminution de l'activité microbienne (34).

▼B

1.9.2. **Traitement et application de la substance d'essai**

Une seule concentration d'essai de la substance chimique est utilisée ([1]) Pour les produits phytosanitaires appliqués directement dans le milieu aquatique, le dosage maximal indiqué sur le mode d'emploi doit être pris comme taux maximal d'application calculé sur la base de la surface de l'eau dans le récipient d'essai. Dans tous les autres cas, la concentration à utiliser doit s'appuyer sur les estimations des émissions dans l'environnement. Il convient de veiller à appliquer une concentration de substance d'essai adéquate afin de caractériser la voie de transformation et la formation et le déclin des produits de transformation. Il peut être nécessaire d'appliquer des doses plus élevées (10 fois par exemple) dans le cas où les concentrations de la substance d'essai sont proches de la limite de détection au début de l'étude et/ou les principaux produits de transformation n'ont pas pu être facilement détectés à un taux égal à 10 % du taux d'application de la substance d'essai. Toutefois, si des concentrations d'essai plus élevées sont utilisées, celles-ci ne doivent pas avoir un effet négatif important sur l'activité microbienne du système eau-sédiment. Afin d'obtenir une concentration constante de la substance d'essai dans des récipients de dimensions différentes, il peut être indiqué d'ajuster la quantité de produit appliqué, en fonction de la profondeur de la colonne d'eau dans le récipient par rapport à la profondeur de l'eau dans le champ (que l'on suppose égale à 100 cm, mais on peut prendre une autre profondeur comme base). Voir l'annexe 4 pour un exemple de calcul.

Théoriquement, la substance d'essai doit être appliquée sous forme de solution aqueuse dans la phase aqueuse du système d'essai. S'il n'est pas possible de procéder autrement, on peut utiliser de faibles quantités de solvants miscibles avec l'eau (comme l'acétone ou l'éthanol) pour appliquer et répartir la substance d'essai, mais ce solubilisant ne doit pas dépasser 1 % v/v ni avoir d'effets négatifs sur l'activité microbienne du système d'essai. La solution aqueuse de la substance d'essai doit être préparée avec soin — afin d'assurer une homogénéité totale, on peut effectuer un prémélange et utiliser des colonnes de générateur. Après l'addition de la solution aqueuse au système d'essai, il est recommandé de remuer doucement la phase aqueuse en brassant le moins possible le sédiment.

Il n'est pas recommandé d'utiliser de manière routinière des produits formulés car les ingrédients de formulation risquent d'affecter la répartition de la substance d'essai et/ou des produits de transformation entre la phase aqueuse et la phase sédimentaire. Toutefois, dans le cas de substances peu solubles dans l'eau, l'utilisation de matériau formulé peut être une solution de remplacement appropriée.

Le nombre de récipients d'incubation dépend du nombre de temps de prélèvement (voir le point 1.9.3). Un nombre suffisant de systèmes d'essai doit être prévu de façon à pouvoir sacrifier deux systèmes à chaque temps de prélèvement. Lorsqu'on utilise des unités témoins de chaque système sédimentaire aquatique, ces unités ne doivent pas être traitées avec la substance d'essai. Les unités témoins peuvent être utilisées pour déterminer la biomasse microbienne du sédiment et le carbone organique total de l'eau et du sédiment à la fin de l'étude. Deux unités témoins (une unité de chaque sédiment aquatique) peuvent être utilisées pour surveiller les paramètres requis dans le sédiment et dans l'eau pendant la période d'acclimatation (voir le tableau du point 1.8.2.2). Deux témoins supplémentaires doivent être ajoutés lorsque la substance d'essai est appliquée au moyen d'un solvant afin de mesurer les effets négatifs sur l'activité microbienne du système d'essai.

([1]) Il peut être utile d'effectuer un essai avec une deuxième concentration pour les substances chimiques qui atteignent les eaux superficielles par différentes voies d'entrée, ce qui entraîne des concentrations très différentes, dans la mesure où la concentration la plus faible peut être analysée avec une précision suffisante.

▼B

1.9.3. **Durée de l'essai et échantillonnage**

L'expérience ne doit pas durer plus de 100 jours (6), et elle doit se poursuivre jusqu'à ce que les voies de dégradation et le profil de répartition eau/sédiment se soient établis ou lorsque 90 % de la substance d'essai s'est dissipée par transformation et/ou volatilisation. Le nombre de temps de prélèvement doit être au moins égal à six (y compris le temps zéro), et une étude préliminaire facultative (voir le point 1.9.4) est effectuée pour déterminer le régime de prélèvement et la durée de l'essai, à moins que l'on ne dispose de données suffisantes sur la substance d'essai d'après les études antérieures. Pour les substances hydrophobes, il peut être nécessaire d'effectuer des points de prélèvement complémentaires pendant la période initiale afin de déterminer le taux de répartition entre la phase aqueuse et la phase sédimentaire.

À chaque temps de prélèvement, les récipients d'incubation (réplicats) sont retirés pour analyse. Le sédiment et l'eau qui le recouvre sont analysés séparément ([1]). L'eau de surface doit être retirée avec précaution en évitant autant que possible de toucher au sédiment. L'extraction et la caractérisation de la substance d'essai et des produits de transformation doivent suivre les procédures analytiques appropriées. Il faut prendre soin d'éliminer les matières adsorbées sur les parois du récipient d'incubation et dans les tuyaux utilisés pour piéger les produits volatils.

1.9.4. **Essai préliminaire facultatif**

S'il n'est pas possible de prévoir la durée et le régime d'échantillonnage à partir d'autres études analogues sur la substance d'essai, il peut être indiqué d'effectuer un essai préliminaire, dans les mêmes conditions d'essai que les conditions proposées pour l'étude définitive. Si cet essai préliminaire est effectué, les conditions expérimentales et les résultats de l'essai doivent être décrits brièvement.

1.9.5. **Mesures et analyse**

La concentration de la substance d'essai et des produits de transformation à chaque temps de prélèvement dans l'eau et le sédiment doit être mesurée et enregistrée (en concentration et en pourcentage de la substance appliquée). En règle générale, tout produit de transformation détecté à > 10 % de la radioactivité totale appliquée au système eau/sédiment, quel que soit le temps de prélèvement, doit être identifié, à moins d'une justification suffisante. Les produits de transformation dont les concentrations sont en augmentation constante pendant la durée de l'étude doivent également être identifiés, même si leurs concentrations ne dépassent pas les limites indiquées ci-dessus, car cela peut indiquer une persistance. Des justifications doivent être fournies dans le rapport.

Les résultats des systèmes de piégeage des gaz/volatils (CO_2 et autres, à savoir les composés organiques volatils) doivent être enregistrés à chaque temps de prélèvement. Les taux de minéralisation doivent être enregistrés. Les résidus (liés) non extractibles dans le sédiment doivent être notés à chaque temps de prélèvement.

([1]) Dans le cas où les produits de transformation anaérobie peuvent se réoxyder très rapidement, les conditions anaérobies doivent être maintenues pendant l'échantillonnage et l'analyse.

▼B

2. **DONNÉES**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

Le bilan massique total ou la récupération (voir le point 1.7.1) de la radioactivité ajoutée doit être calculé à chaque temps de prélèvement. Les résultats doivent être transcrits en pourcentage de radioactivité ajoutée. La répartition de la radioactivité entre l'eau et le sédiment doit être transcrite sous la forme de concentration et de pourcentage, à chaque temps de prélèvement.

La demi-vie, les valeurs DT_{50} et, le cas échéant, DT_{75} et DT_{90} de la substance d'essai doivent être calculées avec leurs limites de confiance (voir le point 1.7.3). Différents outils d'évaluation permettent d'obtenir des informations sur le taux de dégradation de la substance d'essai dans l'eau et le sédiment. Il est possible d'appliquer des cinétiques du pseudo premier ordre, des techniques d'interpolation empiriques utilisant des solutions graphiques ou numériques ou d'autres méthodes d'évaluation utilisant par exemple des modèles à un ou plusieurs compartiments. On trouvera plus de détails dans la littérature spécialisée (35) (36) (37).

Toutes les méthodes ont leurs avantages et leurs inconvénients et leur complexité varie considérablement. L'hypothèse d'une cinétique du premier ordre peut être une simplification trop poussée des processus de dégradation et de répartition, mais cette hypothèse, lorsque c'est possible, donne un terme (la constante de vitesse ou la demi-vie) facilement compréhensible et très utile en modélisation par simulation et pour calculer les concentrations prévisibles dans l'environnement. Les méthodes empiriques ou les transformations linéaires peuvent produire une meilleure interpolation entre les courbes et les données et permettre ainsi une meilleure estimation des demi-vies, des valeurs DT_{50} et, le cas échéant, DT_{75} et DT_{90}. L'utilisation des constantes dérivées est toutefois limitée. Les modèles à compartiments servent à établir des constantes utiles pour l'évaluation des risques qui décrivent la vitesse de dégradation dans les différents compartiments et la répartition de la substance chimique. Ils doivent également être utilisés pour estimer les constantes de vitesse de formation et de dégradation des principaux produits de transformation. Dans tous les cas, la méthode choisie doit être justifiée et l'expérimentateur doit démontrer graphiquement et/ou statistiquement la qualité de l'ajustement.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport doit comprendre les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nom courant, nom chimique, numéro de fichier CAS, formule structurale (indiquant la position du marquage lorsqu'on utilise un produit radiomarqué) et propriétés physico-chimiques pertinentes,

— pureté (impuretés) de la substance d'essai,

— pureté radiochimique de la substance marquée et activité molaire (s'il y a lieu).

▼B

Substances de référence:

— nom et structure chimique des substances de référence utilisées pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation.

Sédiments et eaux d'essai:

— localisation et description du (ou des) site(s) de prélèvement des sédiments aquatiques avec, si possible, l'historique de la contamination,

— toute information relative au prélèvement, au stockage (s'il y a lieu) et à l'acclimatation des systèmes eau-sédiment,

— caractéristiques des échantillons eau-sédiment telles qu'indiquées dans le tableau du point 1.8.2.2.

Conditions de l'essai:

— système d'essai utilisé (circulation continue, biomètre, mode de ventilation, méthode de remuage, volume d'eau, masse sédimentaire, épaisseur de la couche d'eau et de la couche de sédiment, dimension des récipients d'essai, etc.),

— application de la substance d'essai au système: concentration utilisée, nombre de réplicats et de témoins, mode d'application de la substance d'essai (usage éventuel de solvant), etc.,

— température d'incubation,

— temps de prélèvement,

— méthodes d'extraction, rendements et limites de détection des méthodes analytiques,

— méthodes de caractérisation/identification des produits de transformation,

— modification du protocole d'essai ou des conditions de l'essai pendant l'étude.

Résultats:

— données brutes des analyses représentatives (toutes les données brutes doivent être conservées dans les archives BPL),

— reproductibilité et sensibilité des méthodes analytiques utilisées,

— taux de récupération (les % acceptables pour valider une étude sont présentés au point 1.7.1),

— tableaux des résultats exprimés en % de la dose appliquée et en $mg.kg^{-1}$ dans l'eau, le sédiment et le système total (% uniquement) de la substance d'essai et, s'il y a lieu, des produits de transformation et de la radioactivité non extractible,

— bilan massique pendant la durée et à la fin des expériences,

— représentation graphique de la transformation dans les fractions eau/sédiment et dans le système total (y compris la minéralisation),

— taux de minéralisation,

▼B

— durée de demi-vie, DT_{50} et, le cas échéant, valeurs DT_{75} et DT_{90} de la substance d'essai et, s'il y a lieu, des principaux produits de transformation comprenant les limites de confiance dans l'eau, le sédiment et dans le système total,

— une évaluation de la cinétique de transformation de la substance d'essai et, le cas échéant, des principaux produits de transformation,

— voie de transformation proposée, le cas échéant,

— discussion des résultats.

4. **RÉFÉRENCES**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment System. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water Systems. Ref No SC 9046. United Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada. p. 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, p. 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988). Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem.BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, p. 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, p. 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, p. 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17^{th} edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, p. 1038- 1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in fresh water mesocosms. From the Workshop «A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests», 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, p. 2858-2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, p. 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, p. 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen, (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), p. 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, p. 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, C, Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, p. 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, p. 3597-3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contain. Toxicol. 58, p. 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 39, p. 187-203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 33, p. 47-60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pestici- des in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, p. 1349- 1354.

▼B

Annexe 1

INFORMATIONS SUR LES SYSTÈMES D'ESSAI AÉROBIES ET ANAÉROBIES

Système d'essai aérobie

Le système d'essai aérobie décrit dans la présente méthode d'essai se compose d'une couche d'eau aérobie (généralement la concentration d'oxygène varie entre 7 et 10 $mg.l^{-1}$) et une couche de sédiment, aérobie à la surface et anaérobie sous la surface [généralement, le potentiel redox moyen (E_h) dans la zone anaérobie du sédiment est situé entre –80 et –190 mV]. On fait passer de l'air humide à la surface de l'eau dans chaque unité d'incubation afin de maintenir suffisamment d'oxygène dans l'espace libre.

Système d'essai anaérobie

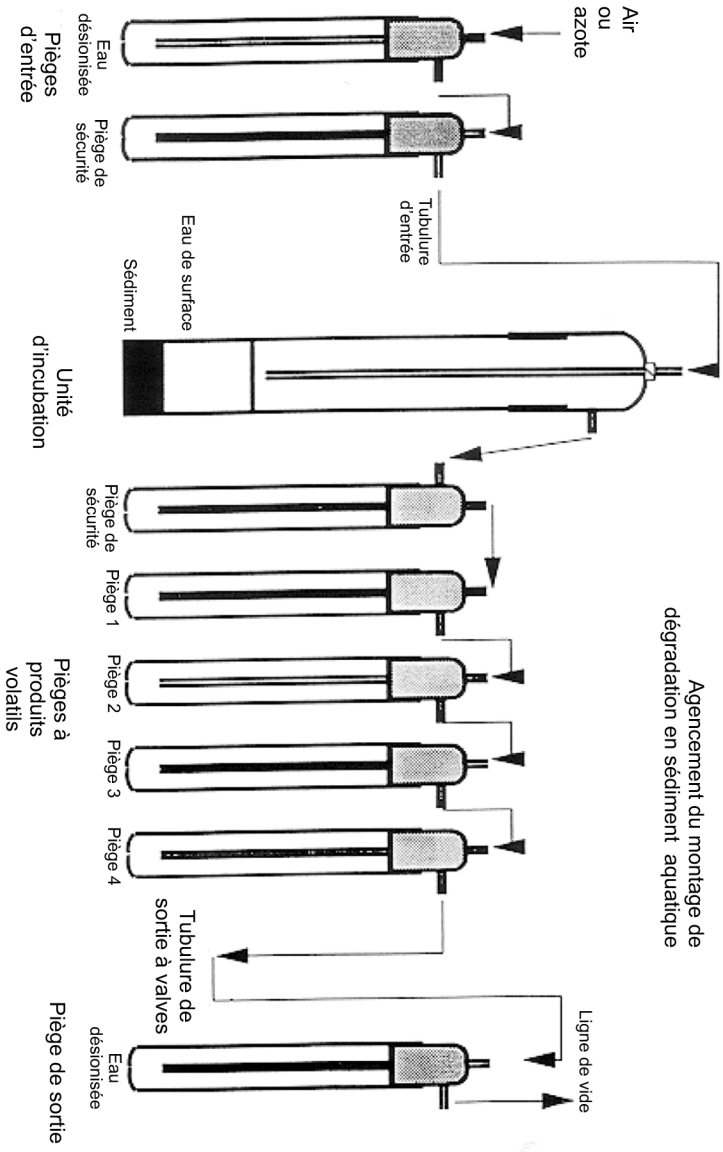
Dans le système d'essai anaérobie, la méthode d'essai est pratiquement la même que celle du système aérobie, à l'exception que l'on fait passer de l'azote humide à la surface de l'eau dans chaque unité d'incubation afin de maintenir un espace libre d'azote. Le sédiment et l'eau sont considérés comme anaérobies lorsque le potentiel redox (E_h) est inférieur à –100 mV.

Dans l'essai anaérobie, l'évaluation de la minéralisation comprend la mesure du dioxyde de carbone et du méthane dégagé.

▼B

Annexe 2

EXEMPLE D'APPAREIL À CIRCULATION CONTINUE

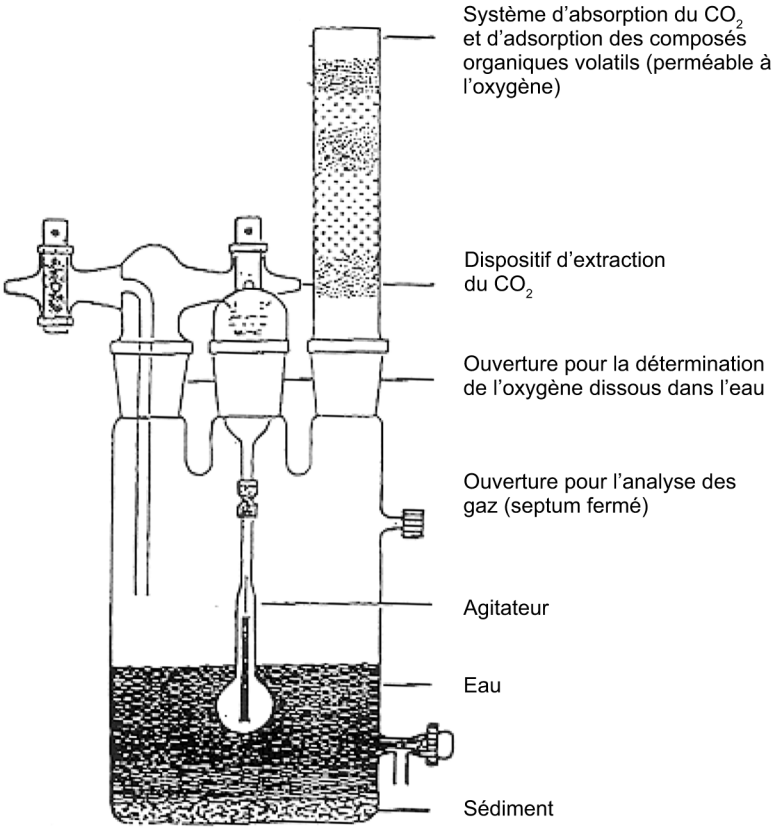


Piège de sécurité, vide
Piège 1:
éthylène glycol pour piéger les produits volatils organiques
Piège 2:
acide sulfurique 0,1 M pour piéger les produits volatils alcalins
Pièges 3 & 4:
hydroxyde de sodium 2 M pour piéger le CO_2 et les autres produits volatils acides

▼B

Annexe 3

EXEMPLE DE BIOMÈTRE



▼B

Annexe 4

EXEMPLE DE CALCUL DE LA DOSE À APPLIQUER AUX RÉCIPIENTS D'ESSAI

Diamètre interne du cylindre:	= 8 cm
Profondeur de la colonne d'eau excluant le sédiment:	= 12 cm
Surface: $3{,}142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Taux d'application: 500 g de substance d'essai/ha correspondant à 5 µg/cm^2	
Total en µg: $5 \times 50{,}3$	= 251,5 µg
Ajuster la quantité par rapport à la quantité correspondant à une profondeur de 100 cm: $12 \times 251{,}5 \div 100$	= 30,18 µg
Volume de la colonne d'eau: $50{,}3 \times 12$	= 603 ml
Concentration dans l'eau: $30{,}18 \div 603$	= 0,050 µg/ml ou 50 µg/l

▼M1

C.25. MINÉRALISATION AÉROBIE DANS LES EAUX SUPERFICIELLES — ESSAI DE SIMULATION DE LA BIODÉGRADATION

1. MÉTHODE

Cette méthode est équivalente à la ligne directrice TG 309 (2004) de l'OCDE (1).

1.1. INTRODUCTION

Cet essai est destiné à mesurer la biodégradation en fonction du temps d'une substance d'essai présente en faible concentration dans une eau naturelle aérobie et à quantifier les observations sous la forme d'expressions cinétiques. Cet essai de simulation, réalisé en laboratoire avec des lots de flacons agités, sert à déterminer les vitesses de biodégradation aérobie de substances organiques dans des échantillons d'eaux naturelles de surface (douces, saumâtres ou marines). Il s'appuie sur la norme ISO/DIS 14592-1 (2) et reprend également des éléments des méthodes d'essai C.23 et C.24 (3)(4). Si l'essai dure longtemps, le procédé en lots peut être remplacé par un processus semi-continu, afin de prévenir la détérioration du microcosme expérimental. L'essai de simulation vise principalement à déterminer la minéralisation de la substance d'essai dans les eaux de surface, minéralisation qui est à la base de l'expression cinétique de la dégradation. Néanmoins, l'essai permet aussi, si on le souhaite, d'obtenir des renseignements sur la dégradation primaire et la formation des principaux produits de transformation. L'identification des produits de transformation et, si possible, la quantification de leurs concentrations, sont particulièrement importantes pour les substances qui se minéralisent très lentement (par exemple, dont la demi-vie du ^{14}C résiduel total dépasse soixante jours). L'identification et la quantification des principaux produits de transformation réclament normalement des concentrations plus élevées de la substance d'essai (par exemple, > 100 µg/l), en raison des limites analytiques.

Dans cet essai, on entend par faible concentration (par exemple, inférieure à 1 µg/l et jusqu'à 100 µg/l), une concentration suffisamment faible pour que la cinétique de biodégradation obtenue au cours de l'essai reflète les cinétiques que l'on s'attend à trouver dans l«environnement. Comparée à la masse totale des substrats carbonés biodégradables présents dans l'eau naturelle utilisée pour l»essai, la substance d'essai en faible concentration servira de substrat secondaire. Cela implique que la cinétique de biodégradation attendue soit de premier ordre (cinétique de «non-croissance») et que la substance d'essai puisse être dégradée par «cométabolisme». Une cinétique de premier ordre signifie que la vitesse de dégradation (mg/l/jour) est proportionnelle à la concentration du substrat qui diminue au cours du temps. Avec une véritable cinétique de premier ordre, la constante spécifique de la vitesse de dégradation, k, est indépendante du temps et de la concentration. Autrement dit, k ne varie pas sensiblement au cours d'une expérience et ne se modifie pas avec l'augmentation de la concentration entre les expériences. Par définition, la constante spécifique de la vitesse de dégradation est égale au changement relatif de concentration par unité de temps: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Bien qu'il faille normalement s'attendre à une cinétique de premier ordre dans les conditions prescrites, il se peut que d'autres cinétiques soient plus appropriées dans certaines circonstances. Des écarts par rapport à la cinétique de premier ordre peuvent s'observer si, par exemple, un phénomène de transfert de masse, tel que la vitesse de diffusion, plutôt que la vitesse de réaction biologique, freine la biotransformation. Cependant, les résultats peuvent presque toujours être décrits par une cinétique de pseudo-premier ordre acceptant une constante de vitesse dépendante de la concentration.

▼M1

Avant d'entamer l'essai, il faudrait disposer d'informations sur la biodégradabilité de la substance d'essai aux concentrations supérieures (tirées, par exemple, d'essais préliminaires standard) et de données sur la dégradabilité abiotique, les produits de transformation et les propriétés physico-chimiques pertinentes, afin de mieux planifier l'essai et de faciliter l'interprétation des résultats. L'utilisation de substances d'essai marquées au ^{14}C et la détermination de la répartition du ^{14}C entre les phases à la fin de l'essai permettent de déterminer la biodégradabilité finale. Si on utilise une substance d'essai non marquée, la biodégradation finale ne peut être estimée que si une concentration supérieure est mise à l'essai et si tous les principaux produits de transformation sont connus.

1.2. DÉFINITIONS

Biodégradation primaire: transformation structurelle d'une substance chimique par des microorganismes, débouchant sur la perte de l'identité chimique.

Biodégradation fonctionnelle: transformation structurelle d'une substance chimique par des microorganismes, entraînant la perte d'une propriété spécifique.

Biodégradation aérobie finale: décomposition d'une substance chimique par des microorganismes, en présence d'oxygène, en dioxyde de carbone, eau et sels minéraux des autres éléments présents (minéralisation) et production d'une nouvelle biomasse et de produits organiques par synthèse biomicrobienne.

Minéralisation: décomposition d'une substance chimique ou de matières organiques par des microorganismes, en présence d'oxygène, en dioxyde de carbone, eau et sels minéraux des autres éléments présents.

Phase de latence: période comprise entre le début de l'essai et le moment où le degré de biodégradation d'une substance chimique ou de la matière organique atteint une valeur détectable (par exemple, 10 % de la biodégradation théorique maximale, ou moins, selon la précision de la technique de mesure) et durant laquelle les microorganismes dégradants s'adaptent.

Degré maximal de biodégradation: degré de biodégradation d'une substance chimique ou de la matière organique, au cours d'un essai, enregistré en pourcentage, au delà duquel la biodégradation ne se produit plus durant l'essai.

Substrat primaire: ensemble de sources de carbone naturel et d'énergie grâce auxquelles la biomasse microbienne croît et se maintient.

Substrat secondaire: élément du substrat présent à une concentration si faible que sa dégradation ne fournit que des quantités négligeables de carbone et d'énergie aux microorganismes compétents, en comparaison avec l'apport de carbone et d'énergie que les microorganismes tirent de la dégradation des principaux composés du substrat (substrats primaires).

Constante de vitesse de dégradation: constante de vitesse correspondant à une cinétique de premier ordre ou de pseudo-premier ordre, k ($jour^{-1}$), indiquant la vitesse des processus de dégradation. Dans un essai en lots, k est estimé à partir de la première partie de la courbe de dégradation, débutant juste après la fin de la phase de latence.

▼M1

Demi-vie, $t_{1/2}$ (jour): caractérise la vitesse d'une réaction de premier ordre; c'est le laps de temps durant lequel la concentration diminue d'un facteur 2. La relation entre la demi-vie et la constante de vitesse de dégradation est régie par l'équation: $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Demi-temps de dégradation, TD_{50} (jour): quantifie le résultat des essais de biodégradation; c'est le laps de temps, incluant la phase de latence, nécessaire pour atteindre 50 % de biodégradation.

Seuil de détection et seuil de quantification: le seuil de détection est la concentration d'une substance en dessous de laquelle il n'est plus possible de distinguer l'identité de la substance des artéfacts de la technique d'analyse. Le seuil de quantification est la concentration d'une substance en dessous de laquelle la concentration ne peut être déterminée avec une précision acceptable.

Carbone organique dissous (COD): fraction du carbone organique présent dans un échantillon d'eau qui ne peut être extraite par une technique de séparation des phases définie, par exemple par centrifugation à 40 000 ms^{-2} durant 15 minutes ou par filtration sur une membrane dont les pores mesurent entre 0,20 et 0,45 µm de diamètre.

Activité totale du ^{14}C organique (AOT): activité totale du ^{14}C associé au carbone organique.

Activité du ^{14}C organique dissous (AOD): activité totale du ^{14}C associé au carbone organique dissous.

Activité du ^{14}C organique particulaire (AOP): activité totale du ^{14}C associé au carbone organique particulaire.

1.3. APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

Cet essai de simulation s'applique aux substances organiques non volatiles ou légèrement volatiles testées à de faibles concentrations. Si l'on utilise des flacons ouverts à l'atmosphère (par exemple, fermés par des tampons d'ouate), les substances dont les constantes de Henry sont inférieures à environ 1 $Pa.m^3/mol$ (approximativement $10^{-5} atm.m^3/mol$) peuvent être considérées comme non volatiles en pratique. En utilisant des flacons fermés pourvus d'un espace libre au-dessus du liquide, il est possible de mettre à l'essai des substances légèrement volatiles (avec des constantes de Henry < 100 $Pa.m^3/mol$ ou < 10^{-3} $atm.m^3/mol$) sans que le système expérimental ne fuie. Des pertes de substances marquées au ^{14}C peuvent se produire si les précautions requises ne sont pas prises, lors de l'extraction du CO_2. Dans ces situations, il peut être nécessaire de piéger le CO_2 dans un absorbeur interne renfermant un produit alcalin ou d'utiliser un dispositif externe d'absorption du CO_2 (détermination directe du $^{14}CO_2$; voir annexe 3). Pour la détermination de la cinétique de biodégradation, les concentrations de la substance d'essai doivent être inférieures à la solubilité de cette dernière dans l'eau. Remarquons, toutefois, que les valeurs d'hydrosolubilité mentionnées dans les publications peuvent dépasser de beaucoup la solubilité de la substance d'essai dans les eaux naturelles. Il est possible, le cas échéant, de déterminer la solubilité des substances d'essai particulièrement peu solubles dans l'eau en utilisant les eaux naturelles mises à l'essai.

La méthode permet de simuler la biodégradation dans des eaux superficielles exemptes de particules grossières («essai pélagique») ou dans des eaux superficielles troubles, comme celles qui peuvent se trouver à proximité d'une interface eau-sédiments («essai en suspension de sédiments»).

▼M1

1.4. PRINCIPE DE L'ESSAI

On réalise l'essai par lots, en incubant la substance d'essai dans l'eau superficielle uniquement («essai pélagique»), ou dans l'eau superficielle enrichie d'une suspension de solides/sédiments de 0,01 à 1 g/l de poids sec («essai en suspension de sédiments») pour simuler un plan d'eau contenant des solides en suspension ou des sédiments resuspendus. La plupart des eaux superficielles renferment des solides/sédiments en suspension à une concentration correspondant aux valeurs inférieures de cette gamme. Les flacons d'essai sont incubés dans l'obscurité à la température de l'environnement étudié, en aérobiose et sous agitation. Il faut utiliser au moins deux concentrations différentes de la substance d'essai pour déterminer la cinétique de dégradation. Les concentrations devraient être espacées d'un facteur de 5 à 10 et représenter la gamme de concentrations supposée régner dans l'environnement. La concentration maximale de la substance d'essai ne devrait pas excéder 100 µg/l, mais il est préférable d'appliquer des concentrations maximales inférieures à 10 µg/l pour s'assurer que la biodégradation obéit à une cinétique de premier ordre. La concentration la plus faible ne devrait pas dépasser 10 µg/l, mais il vaut mieux choisir une concentration minimale de 1 à 2 µg/l ou inférieure à 1 µg/l. En règle générale, une concentration aussi faible peut être correctement analysée en utilisant des substances marquées au ^{14}C vendues dans le commerce. Compte tenu des limites analytiques, il est souvent impossible de mesurer la concentration de la substance d'essai avec la précision requise si cette substance est appliquée à une concentration $\leq$ 100 µg/l (voir deuxième alinéa du paragraphe 1.7.2). Des concentrations plus élevées de la substance d'essai (>100 µg/l et quelquefois > 1 mg/l) peuvent être utilisées pour l'identification et la quantification des principaux produits de transformation, ou s'il n'existe pas de méthode d'analyse spécifique pourvue d'un seuil de détection bas. En testant des concentrations élevées de la substance d'essai, on risque de ne pas pouvoir utiliser les résultats pour estimer la constante de dégradation de premier ordre et la demi-vie, car la dégradation n'obéira probablement pas à une cinétique de premier ordre.

La dégradation est suivie, à des intervalles de temps appropriés, par la mesure du ^{14}C résiduel ou de la concentration résiduelle de la substance d'essai lorsqu'on utilise une méthode spécifique d'analyse chimique. Le marquage au ^{14}C de la partie la plus stable de la molécule permet de déterminer la minéralisation totale, tandis que le marquage d'une partie moins stable de la molécule, de même que le recours à une analyse spécifique, ne permettra d'évaluer que la biodégradation primaire. Néanmoins, la partie la plus stable n'inclut pas nécessairement le groupement fonctionnel pertinent de la molécule (qui peut lui conférer une propriété particulière, telle que la toxicité, la bioaccumulation, etc.). Si c'est le cas, il peut être utile d'utiliser une substance d'essai, marquée au ^{14}C, dans le groupement fonctionnel, afin de suivre l'élimination de la propriété particulière.

1.5. INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Cet essai convient aussi bien aux substances radiomarquées qu'aux substances non marquées. Le marquage recommandé est celui au ^{14}C et devrait normalement s'effectuer sur la ou les parties les plus stables de la molécule (voir également paragraphe 1.4). Pour les substances renfermant plus d'un cycle aromatique, il est préférable de marquer un ou plusieurs atomes de carbone de chaque cycle. En outre, il est préférable de marquer au ^{14}C un ou plusieurs atomes de carbone situés de part et d'autre d'une liaison chimique facilement dégradable. La pureté chimique et/ou radiochimique de la substance d'essai devrait être supérieure à 95 %. En ce qui concerne les substances radiomarquées, une activité spécifique d'au moins quelque 50 µCi/mg (1,85 MBq) est préférable pour faciliter la mesure du ^{14}C dans les essais réalisés avec de faibles concentrations initiales. Les informations suivantes sur la substance d'essai devraient être connues:

▼**M1**

— solubilité dans l'eau [méthode A.6],

— solubilité dans un ou plusieurs solvants organiques (substances appliquées avec un solvant ou peu solubles dans l'eau),

— constante de dissociation (pKa) si la substance est sujette à la protonation ou à la déprotonation [ligne directrice TG 112 de l'OCDE] (5),

— pression de vapeur [méthode A.4] et constante de Henry,

— stabilité chimique dans l'eau et dans l'obscurité (hydrolyse) [méthode C.7].

Si des substances peu solubles dans l'eau sont mises à l'essai dans de l'eau de mer, il peut aussi être utile de connaître la constante de désalination (ou «constante de Setschenow») Ks, définie par l'expression suivante: $\log (S/S') = K^s . C_m$, où S et S' représentent respectivement la solubilité de la substance dans l'eau douce et dans l'eau de mer, et C_m la concentration molaire des sels.

Si l'essai est un «essai en suspension de sédiments», on devrait également disposer des informations suivantes:

— coefficient de partage n-octanol/eau [méthode A.8],

— coefficient d'adsorption [méthode C.18],

Parmi les autres renseignements utiles, citons:

— la concentration dans la nature, si elle est connue ou estimée,

— la toxicité de la substance d'essai pour les microorganismes [méthode C.11],

— la biodégradabilité immédiate et/ou intrinsèque [méthodes C.4 A-F, C.12, C.9, ligne directrice TG 302 de l'OCDE (5)],

— la biodégradabilité aérobie ou anaérobie dans le sol et les études de transformation sédiment/eau [méthodes C.23, C.24].

1.6. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Il convient d'utiliser une substance de référence qui, normalement, se dégrade facilement en aérobiose (aniline ou benzoate de sodium, par exemple). La dégradation de l'aniline et du benzoate de sodium prend généralement moins de deux semaines. L'emploi de substances de référence sert à vérifier que l'activité microbienne de l'eau d'essai se situe dans une certaine gamme, autrement dit, que l'eau renferme une flore microbienne active.

▼M1

1.7. CRITÈRES DE QUALITÉ

1.7.1. **Récupération**

Immédiatement après l'ajout de la substance d'essai, chaque concentration expérimentale initiale devrait être vérifiée par une mesure de l'activité du ^{14}C, ou par des analyses chimiques s'il s'agit de substances non marquées, dans au moins deux échantillons. Cette mesure nous renseigne sur l'applicabilité et la répétabilité de la méthode d'analyse et sur l'homogénéité de la répartition de la substance d'essai. Normalement, on utilise l'activité du ^{14}C initiale mesurée, équivalant à la concentration de la substance d'essai, dans les analyses ultérieures des résultats plutôt que la concentration nominale, ce qui compense les pertes par sorption et les erreurs de dosage. Pour les substances d'essai marquées au ^{14}C, le taux de récupération à la fin de l'expérience est fourni par le bilan massique (voir dernier alinéa du paragraphe 1.8.9.4). Idéalement, le bilan massique radiomarqué devrait se situer entre 90 % et 110 %, tandis que la méthode d'analyse devrait donner un taux de récupération initial compris entre 70 % et 110 % pour les substances d'essai non marquées. Ces intervalles sont donnés à titre indicatif et ne devraient pas servir de critères d'acceptation pour l'essai. On peut, si on le souhaite, déterminer l'exactitude de la méthode d'analyse pour la substance d'essai à une concentration inférieure à la concentration initiale et pour les principaux produits de transformation.

1.7.2. **Répétabilité et sensibilité de la méthode analytique**

La répétabilité de la méthode analytique (notamment l'efficacité de l'extraction initiale) pour quantifier la substance d'essai, et les produits de transformation le cas échéant, devrait être vérifiée par cinq analyses identiques d'extraits de l'eau superficielle.

Le seuil de détection de la méthode analytique pour la substance d'essai et les produits de transformation devrait, si possible, atteindre au moins 1 % de la quantité introduite initialement dans le système expérimental. La limite de quantification devrait être inférieure ou égale à 10 % de la concentration appliquée. Les analyses chimiques de nombreuses substances organiques et de leurs produits de transformation exigent souvent des concentrations relativement élevées de la substance d'essai, à savoir > 100 μg/l.

1.8. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.8.1. **Matériel**

L'essai peut être effectué dans des flacons cylindriques ou coniques d'une capacité adéquate (0,5 ou 1,0 litre, par exemple), fermés par des bouchons en silicone ou en caoutchouc, ou dans des bouteilles à sérum munies de couvercles étanches au CO_2 (avec des bouchons cloisonnés (septa) en caoutchouc butylique, par exemple). Une autre possibilité consiste à pratiquer l'essai avec plusieurs flacons et à prélever des flacons entiers (au moins deux identiques) à chaque intervalle de prélèvement (voir dernier alinéa du paragraphe 1.8.9.1). Pour les substances d'essai non volatiles et non radiomarquées, il n'est pas nécessaire d'employer des bouchons ou des couvercles étanches aux gaz; des tampons d'ouate empêchant la contamination par l'air suffisent (voir deuxième alinéa du paragraphe 1.8.9.1). Les substances légèrement volatiles devraient être testées dans un système de type biomètre fournissant une agitation douce à la surface de l'eau. Si l'on veut être sûr d'empêcher toute contamination bactérienne, on peut éventuellement stériliser les récipients en les chauffant ou en les autoclavant avant l'emploi. En outre, les instruments courants de laboratoire suivants sont nécessaires:

— une table tournante ou des agitateurs magnétiques pour agiter en continu les flacons expérimentaux,

▼**M1**

— une centrifugeuse,

— un pH-mètre,

— un turbidimètre pour les mesures néphélométriques de la turbidité,

— un four ou un four à micro-ondes pour les déterminations pondérales,

— un appareil de filtration à membrane,

— un autoclave ou un four pour stériliser la verrerie,

— des instruments permettant de manipuler les substances marquées au ^{14}C,

— un appareil permettant de quantifier l'activité du ^{14}C dans des échantillons de solutions piégeant le CO_2 et, si nécessaire, dans des échantillons de sédiment,

— des instruments analytiques pour doser la substance d'essai (et de référence) si l'on pratique une analyse chimique spécifique (chromatographie en phase gazeuse, en phase liquide à haute pression, par exemple).

1.8.2. **Solutions mères de la substance d'essai**

Les solutions mères de la substance d'essai et de la substance de référence sont préparées avec de l'eau désionisée (voir premier alinéa du paragraphe 1.8.7). L'eau désionisée devrait être exempte de substances susceptibles d'être toxiques pour les microorganismes et la teneur en carbone organique dissous (COD) ne devrait pas dépasser 1 mg/l (6).

1.8.3. **Prélèvement et transport de l'eau de surface**

Quelle que soit la situation, le site de prélèvement de l'eau superficielle sera choisi en fonction de la finalité de l'essai. Il faut se renseigner sur le déversement antérieur d'éventuels effluents agricoles, industriels ou domestiques et en tenir compte dans la sélection du site. S'il s'avère qu'un milieu aquatique a été contaminé par la substance d'essai ou l'un de ses analogues de structure au cours des quatre dernières années, l'eau d'essai ne doit pas y être prélevée, à moins que l'expérimentateur n'étudie précisément la vitesse de dégradation dans des sites précédemment exposés. Le pH et la température de l'eau sont à mesurer sur le lieu de prélèvement. On notera également la profondeur de prélèvement et l'aspect de l'échantillon d'eau (couleur et turbidité, par exemple) (voir paragraphe 3). Il faut mesurer la concentration d'oxygène et/ou le potentiel redox dans l'eau et dans la couche superficielle du sédiment afin de démontrer l'aérobiose, sauf si cette condition est patente à en juger par l'apparence et une connaissance préalable du site. L'eau superficielle doit être transportée dans un récipient très bien nettoyé. Durant le transport, la température de l'échantillon n'excédera guère la température appliquée dans l'essai. Le refroidissement à 4 °C est recommandé si le transport dure plus de deux ou trois heures. Il ne faut pas congeler l'échantillon d'eau.

▼M1

1.8.4. **Stockage et préparation de l'eau superficielle**

Il est préférable de commencer l'essai au plus tard le lendemain du prélèvement de l'échantillon. Le cas échéant, le stockage de l'eau sera réduit au minimum et n'excédera en aucun cas quatre semaines. L'échantillon d'eau devrait être conservé à 4 °C, sous aération, jusqu'à utilisation. Les particules grossières devront être éliminées de l'échantillon d'eau avant son utilisation, par exemple par filtration à travers une toile de nylon dont les mailles mesurent quelque 100 μm ou un papier filtre grossier, ou par sédimentation.

1.8.5. **Préparation de l'eau additionnée de sédiment (facultatif)**

Pour l'essai en suspension de sédiment, on ajoute le sédiment superficiel aux flacons contenant l'eau naturelle (filtrée pour être exempte de particules grossières, comme décrit au paragraphe 1.8.4), afin d'obtenir une suspension; la concentration des solides suspendus devrait être comprise entre 0,01 et 1 g/l. Le sédiment superficiel devrait provenir du même site que l'échantillon d'eau. Suivant les particularités du milieu aquatique, le sédiment superficiel peut se caractériser soit par une teneur élevée en carbone organique (2,5-7,5 %) et une texture fine, soit par une faible teneur en carbone organique (0,5-2,5 %) et une texture grossière (3). Le sédiment superficiel peut être préparé de la façon suivante: extraire plusieurs carottes de sédiment au moyen de tubes en plastique transparent, découper les tranches contenant les couches supérieures aérobies (à une profondeur maximale de 5 mm à partir de la surface) immédiatement après le prélèvement, et les réunir. L'échantillon de sédiment ainsi obtenu devrait être transporté dans un récipient muni d'un vaste espace libre au-dessus du contenu, de façon à maintenir le sédiment en aérobiose (refroidir à 4 °C si le transport dure plus de deux à trois heures). L'échantillon de sédiment devrait être suspendu dans l'eau d'essai dans une proportion de 1/10 et conservé à 4 °C sous aération jusqu'à son utilisation. Le cas échéant, le stockage du sédiment sera réduit au minimum et n'excédera en aucun cas quatre semaines.

1.8.6. **Procédé semi-continu (facultatif)**

Une incubation prolongée (plusieurs mois) peut s'avérer nécessaire lorsqu'il s'écoule une longue période de latence avant qu'il ne soit possible de mesurer une dégradation sensible de la substance d'essai. Si des expérimentations antérieures ont révélé que tel était le cas de la substance d'essai, l'essai peut débuter par un procédé semi-continu qui permet le renouvellement périodique d'une partie de l'eau ou de la suspension d'essai (voir annexe 2). Par ailleurs, l'essai normal par lots peut être converti en essai semi-continu si aucune dégradation de la substance d'essai n'est observée après une soixantaine de jours d'essai (voir deuxième alinéa du paragraphe 1.8.8.3).

1.8.7. **Ajout de la substance d'essai (ou de référence)**

Pour les substances dont l'hydrosolubilité est élevée (> 1 mg/l) et la volatilité faible (constante de Henry < 1 $Pa.m^3/mol$ ou < 10^{-5} $atm.m^3/mol$), la solution mère peut être préparée dans de l'eau désionisée (voir paragraphe 1.8.2): on verse le volume nécessaire de solution mère dans les récipients expérimentaux pour obtenir la concentration voulue. Le volume de solution mère ajouté ne devrait pas excéder le minimum pratique (< 10 % du volume de liquide final, si possible). Un autre procédé consiste à dissoudre la substance d'essai dans un plus grand volume d'eau d'essai, au lieu de recourir à des solvants organiques, par exemple.

▼M1

S'il est impossible de procéder autrement, les solutions mères de substances non volatiles et peu solubles dans l'eau sont préparées à l'aide d'un solvant organique volatil, mais la quantité de solvant ajoutée au système expérimental ne doit pas dépasser 1 % v/v, ni nuire à l'activité microbienne. Le solvant ne devrait pas affecter la stabilité de la substance d'essai dans l'eau. On enlève le solvant jusqu'à ce qu'il n'en subsiste qu'une quantité extrêmement faible, de façon à ce qu'il n'augmente pas sensiblement la teneur en COD de l'eau ou de la suspension d'essai. Ce point est à vérifier par une analyse de la substance d'essai ou, si possible, du COD (6). On veillera à limiter la quantité de solvant transférée au strict minimum pour dissoudre la quantité de substance d'essai dans le volume final d'eau d'essai. D'autres techniques permettant d'introduire la substance d'essai dans les récipients expérimentaux peuvent être utilisées, comme cela a été décrit dans les références (7) et (8). Lorsqu'on utilise un solvant organique pour appliquer la substance d'essai, les témoins au solvant contenant l'eau d'essai (sans aucun ajout) et l'eau d'essai additionnée de la substance de référence devraient être traités de la même manière que les récipients expérimentaux renfermant la substance d'essai véhiculée par le solvant. Les témoins au solvant servent à mettre en évidence d'éventuels effets nocifs de ce dernier pour la flore microbienne, d'après la dégradation de la substance de référence.

1.8.8. **Conditions expérimentales**

1.8.8.1. *Température*

L'incubation devrait avoir lieu dans l'obscurité (de préférence) ou sous une lumière diffuse, à une température réglée (± 2 °C) qui peut être la température relevée sur le site ou une température standard de 20-25 °C. La température du site peut être la température de l'échantillon au moment du prélèvement ou une température moyenne du site de prélèvement.

1.8.8.2. *Agitation*

Il convient de fournir une agitation continue, afin de maintenir les particules et les microorganismes en suspension. L'agitation facilite également le transfert d'oxygène de l'espace libre situé au-dessus du liquide vers le liquide, ce qui permet de maintenir correctement l'aérobiose. Les flacons sont placés sur une table tournante (agitation d'environ 100 rpm) ou munis d'agitateurs magnétiques. L'agitation doit être continue, mais aussi douce que possible, de façon à maintenir l'homogénéité de la suspension.

1.8.8.3. *Durée de l'essai*

La durée de l'essai ne devrait normalement pas dépasser 60 jours, à moins que l'on n'ait opté pour le procédé semi-continu avec renouvellement périodique de la suspension expérimentale (voir paragraphe 1.8.6 et annexe 2). Toutefois, l'essai par lots peut-être prolongé jusqu'à 90 jours au maximum si la dégradation de la substance d'essai a débuté au cours des 60 premiers jours. La dégradation est contrôlée, à intervalles appropriés, par la détermination de l'activité du ^{14}C résiduel ou du $^{14}CO_2$ dégagé (voir paragraphe 1.8.9.4) et/ou par analyse chimique (paragraphe 1.8.9.5). Le temps d'incubation doit être suffisamment long pour permettre d'évaluer le processus de dégradation. Il serait préférable que la dégradation excède 50 %; pour les substances lentement dégradables, le degré de dégradation doit être suffisant (normalement supérieur à 20 %) pour permettre l'estimation d'une constante cinétique de la vitesse de dégradation.

▼M1

Le pH et la concentration d'oxygène sont à mesurer périodiquement dans le système expérimental, à moins que l'expérience acquise par des essais identiques menés sur des échantillons d'eau et de sédiments prélevés sur le même site ne rende ces mesures superflues. Dans certaines conditions, le métabolisme de substrats primaires présents à des concentrations bien plus élevées dans l'eau ou le sédiment pourrait engendrer un dégagement de CO_2 et une diminution d'oxygène tels qu'ils modifieraient sensiblement les conditions expérimentales durant l'essai.

1.8.9. **Mode opératoire**

1.8.9.1. *Préparation des flacons destinés à l'essai pélagique*

On transfère un volume approprié d'au moins quelque 100 ml d'eau d'essai dans les flacons expérimentaux, de façon à les remplir environ au tiers. Si on utilise plusieurs flacons (de façon à prélever des flacons entiers à chaque moment de prélèvement), le volume approprié d'eau d'essai s'élève aussi à environ 100 ml, les petits volumes risquant d'influencer la longueur de la phase de latence. La substance d'essai est ajoutée à partir d'une solution mère, comme décrit aux paragraphes 1.8.2 et 1.8.7. Il faudrait utiliser au moins deux concentrations de la substance d'essai, espacées d'un facteur de 5 à 10, pour déterminer la cinétique de dégradation et calculer la constante cinétique de la vitesse de dégradation. Les deux concentrations choisies devraient être inférieures à 100 µg/l et de préférence comprises dans l'intervalle 1-10 µg/l.

Les flacons sont fermés avec des bouchons ou des couvercles étanches à l'air et au CO_2. Pour les substances d'essai non volatiles et non marquées au ^{14}C, des tampons d'ouate empêchant la contamination par l'air suffisent (voir paragraphe 1.8.1), à condition que les principaux produits de dégradation soient notoirement non volatils et que l'on procède à une détermination indirecte du CO_2 (voir annexe 3).

Les flacons sont incubés à la température choisie (voir paragraphe 1.8.8.1). Les échantillons destinés à l'analyse chimique ou à la détermination du ^{14}C sont prélevés au début de l'essai (avant le début de la biodégradation; voir paragraphe 1.7.1), puis à une fréquence appropriée au cours de l'essai. Le prélèvement peut s'effectuer par l'extraction de sous-échantillons (aliquotes de 5 ml, par exemple) de chaque expérience identique ou par la collecte de flacons entiers à chaque moment de prélèvement. La minéralisation de la substance d'essai se détermine directement ou indirectement (voir annexe 3). Habituellement, il est nécessaire d'inclure au moins cinq points de prélèvement durant la phase de dégradation (après la fin de la phase de latence) pour estimer une constante de vitesse fiable, sauf si l'on peut justifier que trois points de prélèvement suffisent pour les substances rapidement dégradables. Les substances à dégradation lente se prêtent aisément à plus de mesures durant la phase de dégradation, si bien qu'il faut inclure plus de points pour l'estimation de k. Il est impossible de prescrire un calendrier fixe pour les prélèvements puisque la vitesse de biodégradation varie; on recommande toutefois d'effectuer un prélèvement par semaine si la dégradation est lente. Si la substance d'essai se dégrade rapidement, les prélèvements devraient avoir lieu une fois par jour durant les trois premiers jours, puis tous les deux ou trois jours. Dans certaines circonstances, notamment dans le cas de substances s'hydrolysant très rapidement, il pourra être nécessaire de pratiquer un prélèvement horaire. On recommande d'effectuer une étude préliminaire avant l'essai, afin de déterminer le rythme de prélèvement approprié. Si l'on doit conserver des échantillons en vue d'autres analyses spécifiques, il est préférable de prélever davantage d'échantillons et de sélectionner ensuite ceux à analyser à la fin de l'expérience suivant une logique d'ordre inverse, c'est-à-dire que les derniers échantillons seront analysés en premier (le deuxième alinéa du paragraphe 1.8.9.5 donne des conseils sur la façon de préserver la stabilité des échantillons durant le stockage).

▼**M1**

1.8.9.2. *Nombre de flacons et d'échantillons*

Préparer suffisamment de flacons expérimentaux de façon à disposer:

— de flacons d'essai: au moins deux flacons pour chaque concentration de la substance d'essai (de préférence au moins trois) ou une série de flacons d'essai pour chaque concentration si des flacons entiers sont prélevés à chaque moment de prélèvement (symbolisés par F_T),

— de flacons d'essai pour le calcul du bilan massique: au moins deux flacons pour chaque concentration expérimentale (symbolisés par F_M),

— de témoins sans substance d'essai: au moins un flacon ne contenant que l'eau d'essai (symbolisé par F_B),

— de témoins de référence: deux flacons contenant la substance de référence (aniline ou benzoate de sodium, par exemple, à 10 µg/l) (symbolisés par F_C). Le témoin de référence sert à confirmer l'existence d'une activité microbienne minimale. S'il y a lieu, une substance de référence radiomarquée peut être utilisée, y compris lorsque la dégradation de la substance d'essai est suivie par des analyses chimiques,

— de témoins stériles: un ou deux flacons contenant de l'eau d'essai stérilisée pour vérifier l'existence éventuelle d'une dégradation abiotique ou d'une autre élimination non biologique de la substance d'essai (symbolisés par F_S). L'activité biologique peut être supprimée par autoclavage (121 °C; 20 min) de l'eau d'essai ou par ajout d'un toxique [par exemple, azoture de sodium (NaN_3) à 10-20 g/l, chlorure de mercure ($HgCl_2$) à 100 mg/l ou formaline à 100 mg/l] ou par irradiation gamma. Si l'on utilise du $HgCl_2$, il faudra l'éliminer comme un déchet toxique. Il est difficile de stériliser une eau renfermant une grande quantité de sédiments ajoutés; dans ce cas, un autoclavage répété est recommandé (par exemple, trois fois). Il faut tenir compte du fait que les caractéristiques de sorption du sédiment peuvent être altérées par l'autoclavage,

— de témoins au solvant contenant l'eau d'essai ainsi que l'eau d'essai et la substance de référence: des flacons en double exemplaire contenant la même quantité de solvant, appliquée de la même façon que la substance d'essai. Ces témoins servent à détecter une éventuelle nocivité du solvant, d'après la dégradation de la substance de référence.

En concevant l'essai, l'expérimentateur doit apprécier l'importance relative de l'augmentation du nombre d'expériences identiques au regard de l'augmentation de la fréquence des prélèvements. Le nombre exact de flacons requis dépendra de la méthode employée pour mesurer la dégradation (voir troisième alinéa du paragraphe 1.8.9.1 et du paragraphe 1.8.9.4, ainsi que l'annexe 3).

▼M1

On prélève deux sous-échantillons (par exemple, des aliquotes de 5 ml) dans chaque flacon expérimental, à chaque moment de prélèvement. Si on utilise une série de flacons afin de prélever des flacons entiers, il faut sacrifier au moins deux flacons à chaque moment de prélèvement (voir premier alinéa du paragraphe 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Préparation des flacons destinés à l'essai en suspension de sédiments (facultatif)*

On verse les volumes nécessaires d'eau d'essai et de sédiments, le cas échéant, dans les flacons expérimentaux (voir paragraphe 1.8.5). Les flacons destinés à l'essai en suspension de sédiments sont préparés de la même façon que les flacons pour l'essai pélagique (voir paragraphes 1.8.9.1 et 1.8.9.2). On utilise de préférence des bouteilles à sérum ou des flacons ayant la même forme. Les flacons fermés sont placés horizontalement sur un agitateur. Il va de soi que les flacons ouverts contenant les substances non volatiles, non marquées au ^{14}C, doivent être placés en position verticale; dans ce cas, il est recommandé d'utiliser des agitateurs magnétiques et des barres magnétiques enrobées de verre. Si nécessaire, on aère les bouteilles pour maintenir une aérobiose adéquate.

1.8.9.4. *Déterminations radiochimiques*

Le $^{14}CO_2$ dégagé se mesure directement et indirectement (voir annexe 3). Le $^{14}CO_2$ est mesuré indirectement d'après la différence entre l'activité initiale du ^{14}C dans l'eau d'essai ou la suspension et l'activité résiduelle totale au moment du prélèvement, mesurée après avoir acidifié l'échantillon à pH 2-3 et extrait le CO_2. Le carbone minéral est ainsi éliminé et l'activité résiduelle mesurée provient des composés organiques. Le $^{14}CO_2$ ne doit pas être déterminé indirectement s'il y a des composés volatils parmi les principaux produits de transformation qui se forment (voir annexe 3). Si possible, le dégagement de $^{14}CO_2$ est mesuré directement (voir annexe 3) à chaque moment de prélèvement dans au moins un flacon expérimental; ce mode opératoire permet de vérifier le bilan massique et le processus de biodégradation, mais il ne convient qu'aux essais réalisés avec des flacons fermés.

Si le $^{14}CO_2$ dégagé est mesuré directement au cours de l'essai, il convient de prévoir un plus grand nombre de flacons à cet effet au début de l'essai. La détermination directe du $^{14}CO_2$ est recommandée s'il y a des composés volatils parmi les principaux produits de transformation de la substance d'essai. À chaque point de mesure, les flacons expérimentaux supplémentaires sont acidifiés à pH 2-3 et le $^{14}CO_2$ est collecté dans un absorbeur interne ou externe (voir annexe 3).

On peut, si on le souhaite, déterminer les concentrations de la substance d'essai marquée au ^{14}C et des principaux produits de transformation par radiochromatographie (par exemple, chromatographie en couche mince, RAD-TLC) ou HPLC couplée à une détection radiochimique.

On peut aussi, si on le souhaite, déterminer la répartition entre les phases de la radioactivité restante (voir annexe 1), ainsi que de la substance d'essai résiduelle et des produits de transformation.

▼**M1**

À la fin de l'essai, le bilan massique devrait être établi par une mesure directe du $^{14}CO_2$, effectuée à l'aide de flacons expérimentaux distincts d'où aucun échantillon n'a été prélevé au cours de l'essai (voir annexe 3).

1.8.9.5. *Analyse chimique spécifique*

Si l'on dispose d'une méthode analytique spécifique sensible, la biodégradation primaire peut être évaluée par une mesure de la concentration résiduelle totale de la substance d'essai, plutôt que par des techniques de radiomarquage. Si l'on utilise une substance d'essai radiomarquée (pour mesurer la minéralisation totale), des analyses chimiques spécifiques peuvent être pratiquées en parallèle pour fournir des informations supplémentaires utiles et vérifier le procédé. Des analyses chimiques spécifiques peuvent aussi être utilisées pour mesurer les produits de transformation formés durant la dégradation de la substance d'essai, et cette procédure est recommandée pour les substances dont la demi-vie de minéralisation dépasse soixante jours. La concentration de la substance d'essai et des produits de transformation à chaque moment de prélèvement devrait être mesurée et rapportée (en termes de concentration et de pourcentage appliqué). En général, les produits de transformation détectés à ≥ 10 % de la concentration appliquée, à un quelconque moment de prélèvement, doivent être identifiés, à moins que le contraire ne se justifie. On envisagera aussi d'identifier les produits de transformation dont les concentrations s'accroissent continuellement au cours de l'étude, même si leur concentration n'atteint pas le seuil susmentionné, car cela pourrait être un signe de persistance. On envisagera d'analyser les produits de transformation présents dans les témoins stériles si une transformation abiotique rapide de la substance d'essai (par hydrolyse, par exemple) est jugée possible. La nécessité de quantifier et d'identifier les produits de transformation est à évaluer cas par cas et à justifier dans le rapport. Les techniques d'extraction faisant appel à un solvant organique doivent être appliquées selon les instructions données pour le procédé d'analyse respectif.

Tous les échantillons doivent être stockés à une température de 2 à 4 °C dans des récipients étanches à l'air si l'analyse est réalisée dans les vingt-quatre heures, ce qui est préférable. Si la période de stockage est plus longue, les échantillons doivent être congelés à – 18 °C ou conservés chimiquement. Il est déconseillé d'acidifier les échantillons pour les conserver, car l'acidification risque de les rendre instables. Si les échantillons ne sont pas analysés dans les vingt-quatre heures et sont conservés au-delà de ce délai, une étude de stabilité du stockage doit être effectuée pour démontrer la stabilité des produits chimiques en question à – 18 °C ou dans des conditions de conservation. Si la méthode d'analyse requiert une extraction au solvant ou une extraction de la phase solide, l'extraction doit être menée immédiatement après le prélèvement ou après le stockage de l'échantillon au réfrigérateur durant vingt-quatre heures au maximum.

Suivant la sensibilité de la méthode analytique, il pourra être nécessaire de prélever des échantillons d'un volume supérieur à celui indiqué au paragraphe 1.8.1. Il est facile de réaliser l'essai avec des volumes d'un litre contenus dans des flacons d'une capacité de 2 à 3 litres, ce qui permet de recueillir des échantillons d'environ 100 ml.

▼M1

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

2.1.1. **Représentation graphique des résultats**

Il convient d'arrondir les intervalles de prélèvement à un nombre d'heures entier (sauf si la substance se dégrade fortement en l'espace de quelques heures ou minutes), mais pas à un nombre de jours entier. On produit un tracé linéaire et un tracé semi-logarithmique des estimations de l'activité résiduelle de la substance d'essai (pour les substances marquées au ^{14}C) ou de la concentration résiduelle (pour les substances non marquées) en fonction du temps (voir figures 1a et 1b). S'il y a eu une dégradation, on compare les résultats des flacons F_T à ceux des flacons F_S. Si les moyennes des résultats des flacons contenant la substance d'essai (F_T) et des flacons stériles (F_S) s'écartent de moins de 10 %, on peut supposer que la dégradation observée est principalement abiotique. Si la dégradation mesurée dans les flacons F_S est inférieure, les résultats peuvent être utilisés pour corriger ceux obtenus dans les flacons F_T (par soustraction), en vue d'estimer l'ampleur de la biodégradation. Si des analyses facultatives sont effectuées sur les principaux produits de transformation, il faut fournir un tracé de leur formation et disparition en fonction du temps, en plus d'un tracé de la disparition de la substance d'essai.

On estime la durée de la phase de latence t_L à partir de la courbe de dégradation (tracé semi-logarithmique), en extrapolant sa partie linéaire jusqu'à une dégradation nulle ou en déterminant la durée d'une dégradation d'environ 10 % (voir figures 1a et 1b). À partir du tracé semi-logarithmique, on estime la constante de vitesse de premier ordre, k, et son écart-type par régression linéaire du ln (activité résiduelle du ^{14}C ou concentration de la substance d'essai) en fonction du temps. Avec les mesures du ^{14}C en particulier, on n'utilisera que les résultats se rapportant à la partie linéaire initiale de la courbe, située après la phase de latence, et l'on s'attachera à sélectionner un petit nombre de résultats représentatifs, plutôt qu'un grand nombre de résultats incertains. Ici, l'incertitude comprend les erreurs inhérentes à l'utilisation directe recommandée des activités résiduelles du ^{14}C mesurées (voir plus bas). Il peut parfois s'avérer pertinent de calculer deux constantes de vitesse différentes, si la dégradation suit un mode biphasique. À cet effet, on délimite deux phases différentes de la courbe de dégradation. Il convient de calculer la constante de vitesse, k, et la demi-vie, $t_{1/2} = \ln 2/k$, pour chacun des flacons des expériences identiques, lorsque des sous-échantillons sont prélevés à partir du même flacon, ou en utilisant les valeurs moyennes, lorsqu'on recueille des flacons entiers à chaque moment de prélèvement (voir paragraphe 1.8.9.2). Si l'on applique le premier procédé mentionné, la constante de vitesse et la demi-vie doivent être rapportées individuellement pour chacun des flacons en double et exprimées sous la forme d'une moyenne avec un écart-type. Si les concentrations de la substance d'essai sont élevées, la courbe de dégradation pourrait s'écarter considérablement d'une droite (tracé semi-logarithmique) et la cinétique de premier ordre risque de ne pas être valable. Dans ces circonstances, la détermination d'une demi-vie n'aurait pas de sens. Cependant, il est possible d'appliquer une cinétique de pseudo-premier ordre à une gamme limitée de résultats et d'estimer la demi-vie de dégradation TD_{50} (temps nécessaire pour atteindre 50 % de dégradation). On gardera toutefois à l'esprit qu'il est impossible de prédire la durée de la dégradation au-delà de la gamme limitée de résultats en utilisant la TD_{50}, qui n'est qu'un descripteur d'un ensemble donné de résultats. Les outils analytiques facilitant les calculs statistiques et l'ajustement des courbes sont faciles à se procurer et l'usage de ce type de logiciel est recommandé.

▼M1

Si des analyses chimiques spécifiques sont pratiquées, on estime les constantes de vitesse et les demi-vies pour la dégradation primaire comme indiqué plus haut pour la minéralisation totale. Si la dégradation primaire est le processus limitant, les résultats ponctuels se rapportant à la totalité du processus de dégradation peuvent quelquefois être utilisés. Et ce, parce qu'il s'agit de mesures directes, contrairement aux mesures de l'activité du ^{14}C.

Si l'on utilise des substances marquées au ^{14}C, le bilan massique devrait être exprimé en pourcentage de la concentration initiale appliquée, au moins à la fin de l'essai.

2.1.2. **Activité résiduelle**

Lorsque le fragment marqué au ^{14}C d'une substance organique est biodégradé, la majeure partie du ^{14}C est convertie en $^{14}CO_2$, tandis qu'une autre partie est mobilisée par la croissance de la biomasse et/ou la synthèse de métabolites extra-cellulaires. Aussi, la biodégradation complète, «finale», d'une substance ne correspond-elle pas à une conversion à 100 % de son carbone en $^{14}CO_2$. Le ^{14}C intégré aux produits biosynthétisés est ensuite libéré lentement sous la forme de $^{14}CO_2$ à la suite d'une «minéralisation secondaire». C'est pourquoi les tracés de l'activité du ^{14}C organique résiduel (mesurée après l'extraction du CO_2) ou du $^{14}CO_2$ produit en fonction du temps se prolongent au-delà de la fin de la dégradation. Cela complique l'interprétation cinétique des résultats, de sorte que seule la première partie de la courbe (juste après la fin de la phase de latence et avant que la dégradation atteigne environ 50 %) devrait normalement être utilisée pour l'estimation de la constante de vitesse de dégradation. Si la substance d'essai est dégradée, l'activité du ^{14}C résiduel organique total est toujours supérieure à l'activité du ^{14}C associée à la substance d'essai intacte restante. Si la substance d'essai est dégradée par une réaction de premier ordre et qu'une fraction constante α est minéralisée en CO_2, la pente initiale de la courbe de disparition du ^{14}C (^{14}C organique total en fonction du temps) sera égale à α fois la pente de la courbe correspondante de concentration de la substance d'essai (ou, plus précisément, du fragment de la substance d'essai marqué au ^{14}C). Les mesures de l'activité du ^{14}C organique total utilisées n'étant pas corrigées, la constante de vitesse de dégradation sera calculée avec une marge de sécurité. Des procédés permettant d'estimer les concentrations de la substance d'essai à partir des activités radiochimiques mesurées, sur la base de diverses hypothèses simplificatrices, ont été décrits dans des publications (2)(9)(10)(11). Ces procédés s'appliquent le plus facilement aux substances rapidement dégradables.

2.2. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

S'il s'avère que k est indépendant de la concentration (si le k calculé est à peu près identique aux différentes concentrations de la substance d'essai), on peut supposer que la constante de vitesse de premier ordre est représentative des conditions expérimentales appliquées, à savoir la substance d'essai, l'échantillon d'eau et la température de l'essai. Il appartient à un expert d'apprécier dans quelle mesure les résultats peuvent être généralisés ou extrapolés à d'autres systèmes. Si la substance d'essai est testée à une concentration élevée et que, de ce fait, la dégradation n'obéit pas à une cinétique de premier ordre, les résultats ne peuvent servir à estimer directement une constante de vitesse de premier ordre ou la demi-vie correspondante. Cependant, les données fournies par un essai mené à une concentration élevée de la substance d'essai peuvent toujours être utilisées pour estimer le degré de minéralisation totale et/ou détecter et quantifier les produits de transformation.

▼M1

Si les vitesses de phénomènes de disparition autres que la biodégradation sont connues (hydrolyse ou volatilisation, par exemple), elles peuvent être soustraites de la vitesse de disparition nette relevée durant l'essai, pour fournir une estimation approximative de la vitesse de biodégradation. Les valeurs concernant l'hydrolyse peuvent, par exemple, être obtenues à partir du témoin stérile ou d'un essai parallèle mené à une concentration plus élevée de la substance d'essai.

Les déterminations indirecte et directe du $^{14}CO_2$ (paragraphes 1.8.9.4 et annexe 3) ne peuvent être utilisées que pour mesurer l'ampleur de la minéralisation de la substance d'essai en CO_2. La radiochromatographie en couche mince (RAD-TLC) ou la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) peuvent servir à analyser la concentration de la substance d'essai marquée au ^{14}C et la formation des principaux produits de transformation (troisième alinéa du paragraphe 1.8.9.4). La demi-vie ne peut être estimée directement qu'en l'absence de tous les principaux produits de transformation (définis comme étant ≥10 % de la quantité de substance d'essai appliquée). En présence de produits de transformation principaux (selon la définition ci-dessus), une évaluation détaillée des résultats est requise. Cette évaluation peut inclure l'essai et/ou l'identification répétés des produits de transformation (voir premier alinéa du paragraphe 1.8.9.5), à moins que le devenir des produits de transformation ne puisse être raisonnablement évalué d'après l'expérience antérieure (par exemple, des informations sur les voies de dégradation). La proportion de carbone de la substance d'essai convertie en CO_2 variant (en grande partie en fonction de la concentration de la substance d'essai et des autres substrats disponibles, des conditions expérimentales et de la flore microbienne), cet essai ne permet pas d'estimer directement la biodégradation finale, comme dans un essai de disparition du carbone organique dissous; mais le résultat est similaire à celui obtenu avec l'essai au respiromètre. Le degré de minéralisation sera donc inférieur ou égal au degré minimal de biodégradation finale. Pour obtenir un tableau plus complet de la biodégradation finale (minéralisation et incorporation dans la biomasse), il faudrait analyser la répartition du ^{14}C entre les phases à la fin de l'essai (voir annexe 1). Le ^{14}C présent dans les matières particulaires consistera en ^{14}C incorporé dans la biomasse bactérienne et en ^{14}C sorbé sur les particules organiques.

2.3. VALIDITÉ DE L'ESSAI

Si la substance de référence ne se dégrade pas au cours de la période prévue (pour l'aniline et le benzoate de sodium, généralement moins de deux semaines), la validité de l'essai est incertaine et demande à être vérifiée; sinon, l'essai peut aussi être répété avec un nouvel échantillon d'eau. À l'issue d'un essai tournant de la méthode, organisé par l'ISO, auquel sept laboratoires européens ont participé, les constantes de vitesse de dégradation adaptées de l'aniline s'échelonnaient entre 0,3 et 1,7 jour $^{-1}$, avec une moyenne de 0,8 jour^{-1} à 20 °C et un écart-type de ± 0,4 jour^{-1} ($t_{1/2}$ = 0,9 jour). Les périodes de latence étaient généralement comprises entre un et sept jours. Les eaux examinées renfermaient une biomasse bactérienne correspondant à 10^3-10^4 unités formant colonie par ml. Les eaux riches en éléments nutritifs de l'Europe tempérée accusaient des vitesses de dégradation supérieures aux eaux oligotrophes de l'Europe septentrionale, probablement à cause d'une différence d'état trophique ou d'une exposition préalable à des substances chimiques.

La récupération totale (bilan massique) à la fin de l'expérience devrait se situer entre 90 % et 110 % pour les substances radiomarquées, tandis que le taux de récupération au début de l'expérience devrait être compris entre 70 % et 110 % pour les substances non marquées. Toutefois, ces gammes ne sont mentionnées qu'à titre indicatif et ne devraient pas servir de critère d'acceptation pour l'essai.

▼M1

3. **RAPPORT D'ESSAI**

Le type d'essai, à savoir pélagique ou en suspension de sédiments, doit être stipulé clairement dans le rapport d'essai, qui fournira également, au minimum, les informations suivantes:

Substance d'essai et substance(s) de référence:

— noms courants, noms chimiques (suivant la nomenclature recommandée par l'IUPAC et/ou le CAS), numéros CAS, formule structurale (indiquant la position du ^{14}C, dans le cas d'une substance radiomarquée) et propriétés physico-chimiques pertinentes de la substance d'essai et de la (des) substance(s) de référence (voir paragraphes 1.5 et 1.6),

— noms chimiques, numéros CAS, formule structurale (indiquant la position du ^{14}C, dans le cas d'une substance radiomarquée) et propriétés physico-chimiques pertinentes des substances servant d'étalon pour l'identification et la quantification des produits de transformation,

— pureté (impuretés) de la substance d'essai et de la (des) substance(s) de référence,

— pureté radiochimique de la substance marquée et activité spécifique (le cas échéant).

Eau superficielle:

Il convient de fournir, au minimum, les informations suivantes sur l'échantillon d'eau prélevé:

— localisation et description du site de prélèvement et, si possible, son histoire en matière de contamination,

— date et heure du prélèvement de l'échantillon,

— éléments nutritifs (N total, ammonium, nitrite, nitrate, P total, orthophosphate dissous),

— profondeur du prélèvement,

— aspect de l'échantillon (couleur et turbidité, par exemple),

— carbone organique dissous et carbone organique total,

— demande biologique en oxygène,

— température et pH sur le lieu et à l'heure du prélèvement,

— oxygène ou potentiel redox (obligatoire seulement si l'aérobiose n'est pas évidente),

— salinité ou conductivité (dans le cas d'une eau de mer ou d'une eau saumâtre),

— solides en suspension (dans le cas d'un échantillon trouble),

— éventuellement, autres informations pertinentes sur le lieu de prélèvement au moment du prélèvement (par exemple, données actuelles ou antérieures sur le débit des cours d'eau ou les courants marins, présence d'importantes sources de rejets à proximité et nature des rejets, conditions météorologiques précédant le moment du prélèvement),

et, à titre facultatif:

— biomasse microbienne (comptage direct à l'orangé d'acridine ou unités formant colonie, par exemple),

▼M1

— carbone minéral,

— estimation de la biomasse des algues d'après la concentration en chlorophylle a.

De surcroît, si l'essai est réalisé en suspension de sédiments, il faudrait fournir les renseignements suivants sur le sédiment:

— profondeur de prélèvement du sédiment,

— aspect du sédiment (coloré, boueux, vaseux ou sableux, par exemple),

— texture (pourcentages de sable grossier, de sable fin, de limon et d'argile, par exemple),

— poids sec en g/l des solides suspendus, concentration du carbone organique total ou mesure de la teneur en matière organique d'après la perte de poids à l'inflammation,

— pH,

— oxygène ou potentiel redox (obligatoire seulement si l'aérobiose n'est pas évidente).

Conditions expérimentales:

— temps écoulé entre le prélèvement de l'échantillon et son utilisation dans l'essai en laboratoire, stockage et traitement préalable de l'échantillon, dates auxquelles les études ont été menées,

— quantité de substance d'essai appliquée, concentration expérimentale et substance(s) de référence,

— méthode d'application de la substance d'essai, notamment utilisation de solvants, le cas échéant,

— volume d'eau superficielle utilisé, et de sédiment le cas échéant, et volume prélevé à chaque moment d'analyse,

— description du système expérimental utilisé.

Si l'obscurité ne s'impose pas, informations sur les paramètres de la lumière diffuse,

— informations sur la ou les méthodes utilisées pour préparer des témoins stériles (température, durée et nombre d'autoclavages, par exemple),

— température d'incubation,

— renseignements sur les techniques analytiques et la ou les méthodes appliquées pour les mesures radiochimiques, la vérification du bilan massique et la détermination de la répartition entre les phases (le cas échéant),

— nombre d'expériences identiques.

Résultats:

— pourcentages de récupération (voir paragraphe 1.7.1),

— répétabilité et sensibilité des méthodes analytiques employées, y compris les seuils de détection et de quantification (voir paragraphe 1.7.2),

▼M1

— toutes les données mesurées (y compris les heures de prélèvement), les valeurs calculées présentées sous forme de tableau et les courbes de dégradation; pour chaque concentration expérimentale et chaque flacon en double, indiquer le coefficient de corrélation linéaire de la pente du tracé logarithmique, la durée estimée de la phase de latence, une constante de vitesse de premier ordre ou de pseudo-premier ordre (si possible) et la demi-vie de dégradation correspondante (ou le temps de demi-vie, $t_{1/2}$),

— consigner les valeurs importantes telles que les moyennes des résultats observés pour chaque double, par exemple la longueur de la phase de latence, la constante de vitesse de dégradation et la demi-vie de dégradation (ou $t_{1/2}$),

— déterminer si le système est adapté ou non, d'après l'aspect de la courbe de dégradation et l'influence éventuelle de la concentration d'essai,

— résultats de la vérification du bilan massique final et résultats des mesures de la répartition entre les phases (le cas échéant),

— fraction de ^{14}C minéralisé et, si des analyses spécifiques ont été menées, niveau final de la dégradation primaire,

— identification, concentration molaire et pourcentage des principaux produits de transformation (voir premier alinéa du paragraphe 1.8.9.5), le cas échéant,

— proposition d'un chemin réactionnel pour la transformation, s'il y a lieu,

— analyse des résultats.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test

2. ISO/DIS 14592-1 (1999). Qualité de l'eau — évaluation de la biodégradabilité aérobie des composés organiques présents en faibles concentrations — partie 1: essai en lots de flacons agités avec des eaux de surface ou des suspensions eaux de surface/sédiments.

3. Méthode d'essai C.23. Transformation aérobie et anaérobie dans le sol.

4. Méthode d'essai C.24. Transformation aérobie et anaérobie dans les systèmes sédimentaires aquatiques.

5. OCDE (1993). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Qualité de l'eau — lignes directrices pour le dosage du carbone organique total (COT) et du carbone organique dissous (COD).

7. ISO 10634 (1995). Qualité de l'eau — lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. N° 22 (to be published summer 2000).

▼**M1**

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394-401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999). Qualité de l'eau — évaluation de la biodégradabilité aérobie des composés organiques présents en faibles concentrations — partie 1: essai en lots de flacons agités avec des eaux de surface ou des suspensions eaux de surface/sédiments.

▼M1

Appendice 1

Répartition du ^{14}C entre les phases

Afin de contrôler le procédé employé, il convient de compléter les mesures systématiques de l'activité totale du ^{14}C organique (AOT) résiduel par des mesures du bilan massique comportant une détermination directe du $^{14}CO_2$ émis après piégeage dans un absorbeur (voir annexe 3). En soi, la formation de $^{14}CO_2$ constitue une preuve directe de biodégradation, par opposition à la dégradation abiotique ou à d'autres mécanismes de disparition, tels que la volatilisation et la sorption. D'autres renseignements utiles caractérisant la biodégradabilité peuvent être tirés des mesures de la répartition de l'AOT entre la phase dissoute (activité du ^{14}C organique dissous, AOD) et la phase particulaire (activité du ^{14}C organique particulaire, AOP), après la séparation des particules par filtration sur membrane ou centrifugation. L'AOP se rapporte à la substance d'essai sorbée sur la biomasse microbienne et sur d'autres particules ainsi qu'au carbone de la substance d'essai qui a été mobilisé pour synthétiser de nouveaux matériaux cellulaires et incorporé de ce fait dans la fraction particulaire de la biomasse. La formation du ^{14}C organique dissous peut être estimée d'après l'AOD à la fin de la biodégradation (plateau sur la courbe de dégradation en fonction du temps).

On estime la répartition du ^{14}C résiduel entre les phases dans des échantillons choisis en filtrant les échantillons sur un filtre à membrane composé d'un matériau qui n'adsorbe, le cas échéant, que des quantités négligeables de la substance d'essai (les filtres en polycarbonate, par exemple, conviennent) et dont les pores mesurent 0,22 μm ou 0,45 μm. Si la sorption de la substance d'essai sur le filtre est trop importante pour être négligée (à vérifier avant l'expérience), la filtration peut être remplacée par une centrifugation à grande vitesse (2 000 g; 10 min).

Le filtrat ou le centrifugat sont traités comme les échantillons non filtrés (voir à l'annexe 3). Les membranes des filtres sont dissoutes dans un liquide à scintillation approprié, et le comptage s'effectue comme d'habitude, en principe uniquement à l'aide de la méthode du quotient avec un étalon externe pour corriger l'extinction, ou à l'aide d'un dispositif oxydant l'échantillon. Si l'on a utilisé la centrifugation, il faut de nouveau suspendre la boulette formée par la fraction particulaire dans 1 à 2 ml d'eau distillée et transférer le tout dans un petit tube à scintillation. Après deux rinçages du tube à centrifuger avec 1 ml d'eau distillée, l'eau de rinçage est transférée dans le petit tube à scintillation. Si nécessaire, la suspension peut être incorporée à un gel pour le comptage par scintillation liquide.

▼M1

Appendice 2

Procédé semi-continu

Il est parfois nécessaire de prolonger l'incubation durant plusieurs mois afin de dégrader suffisamment les substances récalcitrantes. L'essai ne doit normalement pas dépasser 60 jours, sauf si les caractéristiques de l'échantillon d'eau original sont maintenues grâce au renouvellement de la suspension d'essai. Cependant, la durée de l'essai peut être prolongée jusqu'à 90 jours maximum sans renouvellement de la suspension d'essai si la dégradation de la substance d'essai a débuté au cours des 60 premiers jours.

Si l'incubation couvre une longue période, la diversité de la flore microbienne risque de s'amenuiser, du fait de divers mécanismes de disparition et de l'appauvrissement possible de l'échantillon d'eau en éléments nutritifs essentiels et en substrats carbonés primaires. Il est donc recommandé de recourir à l'essai semi-continu pour déterminer correctement la vitesse de dégradation des substances qui se dégradent lentement. L'essai devrait débuter par un procédé semi-continu si des données expérimentales laissent supposer qu'une période d'incubation de trois mois est nécessaire pour que la substance se dégrade à 20 %. Sinon, l'essai en lots peut être converti en essai semi-continu si la substance d'essai ne s'est pas dégradée au terme d'un essai en lots mené sur une soixantaine de jours. Il est possible de mettre fin à un essai semi-continu et de poursuivre l'expérience selon le procédé en lots si une dégradation substantielle a été enregistrée (> 20 %, par exemple).

Dans l'essai semi-continu, toutes les deux semaines, environ un tiers du volume de la suspension d'essai est remplacé par un volume d'eau venant d'être prélevé, dans lequel a été ajoutée la quantité requise de substance d'essai pour rétablir sa concentration initiale. De la même façon, on ajoute la quantité nécessaire de sédiment dans l'eau de remplacement pour rétablir la concentration initiale de sédiment (entre 0,01 et 1 g/l) si l'on effectue l'essai facultatif en suspension de sédiments. Si l'essai est mené avec des sédiments solides en suspension, il importe que le système demeure totalement suspendu et ce, également lors du renouvellement de l'eau, et il convient d'appliquer un temps de séjour identique pour les solides et l'eau, sinon on risquerait de perdre la similarité voulue avec un système aqueux homogène sans phases fixes. C'est pourquoi, il est préférable que la concentration initiale des sédiments suspendus se situe dans la partie inférieure de l'intervalle spécifié lorsqu'on utilise un procédé semi-continu.

L'ajout de la substance d'essai, tel qu'il est prescrit, implique que le renouvellement partiel de la suspension d'essai n'entraîne pas de dépassement de la concentration initiale de la substance d'essai, et que l'on évite par conséquent l'adaptation couramment observée avec des concentrations élevées de la substance d'essai. Le procédé prévoyant une réinoculation et une compensation des carences en éléments nutritifs et en substrats primaires, la diversité microbienne originale est rétablie et la durée de l'essai peut, en principe, être prolongée à l'infini. Lorsqu'on applique le procédé semi-continu, il est important de noter que la concentration résiduelle de la substance d'essai doit être corrigée en fonction des quantités de substance d'essai ajoutées et ôtées à chaque renouvellement. La concentration totale de la substance d'essai et sa concentration à l'état dissous peuvent être utilisées de façon interchangeable pour les composés peu sujets à la sorption. La sorption est négligeable (< 5 %) dans les conditions spécifiées (0,1-1 g solides/l) pour les substances dont le log K_{oe} < 3 (valable pour les substances neutres, lipophiles). L'exemple de calcul présenté ci-dessous illustre ce qui précède. En gros, 0,1 g/l de solides correspond à 10 mg de carbone par litre (fraction de carbone f_C = 0,01). Soit:

Log K_{oe} (de la substance d'essai) = 3

$K_{co} = 0{,}42 \times K_{oe}$

Coefficient de partage, $K_d = f_C \times K_{co}$

alors, la fraction dissoute de la concentration totale (C-eau (C_e)/C-total (C_t)) est égale à:

$C_e/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{co} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Appendice 3

Détermination du $^{14}CO_2$

Détermination indirecte du $^{14}CO_2$

Pour les mesures systématiques, la méthode indirecte est normalement la plus rapide et la plus précise, si la substance d'essai est non volatile et ne se transforme pas en produits volatils. Pour ce faire, il suffit de transférer des échantillons non filtrés, d'un volume de 5 ml, par exemple, dans des tubes à scintillation. L'activité initiale adéquate des échantillons est comprise entre 5 000 dpm et 10 000 dpm (80-170 Bq) et l'activité initiale minimale est de quelque 1 000 dpm. Le CO_2 doit être extrait après acidification à pH 2-3 avec une ou deux gouttes d'H_3PO_4 ou d'HCl concentrés. L'extraction du CO_2 peut se faire par barbotage à l'air durant une demi-heure à une heure. Sinon, les flacons peuvent être agités vigoureusement durant une à deux heures (par exemple, sur un agitateur à microplaque) ou plus doucement, mais jusqu'au lendemain. Il faut vérifier l'efficacité du procédé d'extraction du CO_2 (en prolongeant l'aération ou la durée de l'agitation). Ensuite, un liquide à scintillation approprié au comptage des échantillons aqueux est ajouté et l'échantillon est homogénéisé au moyen d'un mélangeur rotatif; on détermine la radioactivité par comptage en scintillation liquide en retranchant l'activité de fond relevée sur les témoins (F_B). À moins que l'eau d'essai ne soit très colorée ou renferme une concentration élevée de particules, les échantillons présentent normalement une extinction uniforme et il suffit de corriger l'extinction à l'aide d'un étalon externe. Si l'eau d'essai est très colorée, il peut être nécessaire de corriger l'extinction par ajout d'un étalon interne. Si la concentration des particules est élevée, il peut s'avérer impossible d'obtenir une solution ou un gel homogène, ou la variation d'extinction entre les échantillons risque d'être importante. Dans ce cas, la méthode de comptage décrite ci-après pour les boues d'essai peut être utilisée. Si l'essai est mené en suspension de sédiments, on peut mesurer le $^{14}CO_2$ indirectement en prenant un échantillon homogène de 10 ml de l'eau/suspension d'essai et en séparant les phases par centrifugation à une vitesse appropriée (par exemple à 40 000 m/s^2 durant 15 min). La phase aqueuse doit ensuite être traitée comme décrit plus haut. On détermine l'activité du ^{14}C de la phase particulaire (AOP) en suspendant de nouveau le sédiment dans un petit volume d'eau distillée, en le transférant dans des tubes à scintillation et en ajoutant un liquide à scintillation de façon à obtenir un gel (il existe des liquides à scintillation spécialement destinés à cet usage). Selon la nature des particules (par exemple, leur teneur en matières organiques), il peut être possible de faire digérer l'échantillon par un solubilisant pour tissus en le laissant agir jusqu'au lendemain et de l'homogénéiser ensuite avec un mélangeur rotatif, avant d'ajouter le liquide à scintillation. Sinon, l'AOP peut être déterminée par combustion en excès d'oxygène au moyen d'un dispositif oxydant l'échantillon. Des étalons internes doivent toujours être inclus lors du comptage, et il est parfois nécessaire de corriger l'extinction en ajoutant un étalon interne pour chaque échantillon.

Détermination directe du $^{14}CO_2$

Si le $^{14}CO_2$ dégagé est mesuré directement, il faut prévoir un plus grand nombre de flacons au début de l'essai, prélever les flacons d'essai à chaque moment de mesure, acidifier leur contenu à pH 2-3 et recueillir le $^{14}CO_2$ dans un absorbeur interne (disposé dans chaque flacon d'essai au début de l'essai) ou externe. Un milieu absorbant alcalin (par exemple, une solution 1 N de NaOH ou une pastille de NaOH), ou constitué d'éthanolamine ou à base d'éthanolamine, ainsi que les absorbeurs vendus dans le commerce peuvent être utilisés. Pour la mesure directe du $^{14}CO_2$, les flacons doivent être fermés au moyen de bouchons cloisonnés (septa) en caoutchouc butylique, par exemple.

▼**M1**

Figure 1a

Exemple d'un tracé arithmétique des résultats (activité résiduelle en fonction du temps)

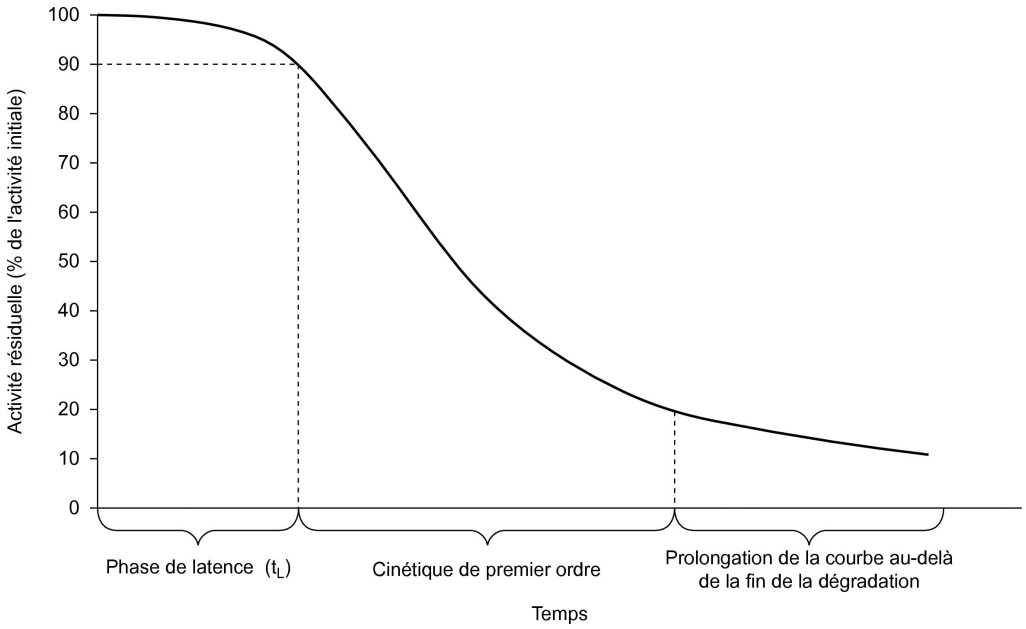
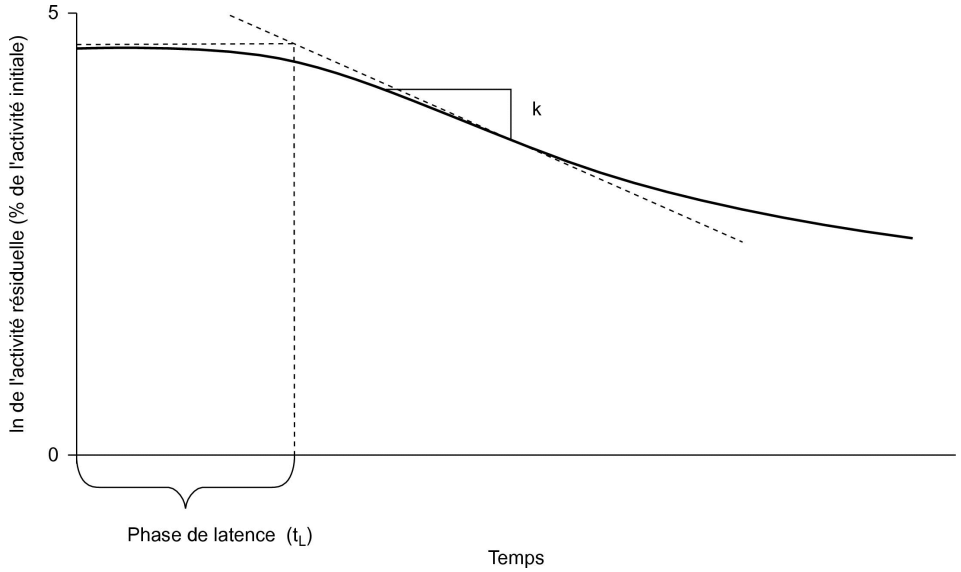


Figure 1b

Exemple de tracé semi-logarithmique des résultats (ln de l'activité résiduelle en fonction du temps)



▼M1

C.26. *LEMNA* SP. ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE

1. MÉTHODE

La présente méthode est équivalente à la ligne directrice TG 221 (2006) de l'OCDE (1). Il existe un vaste consensus des autorités de l'UE sur le fait que l'essai sur les Lemna constitue une solution de substitution acceptable à un essai sur les algues pour les substances fortement colorées (2) (3).

1.1. INTRODUCTION

Cette méthode d'essai est destinée à évaluer la toxicité de substances sur des plantes dulcicoles du genre *Lemna* (lentille d'eau). Conçue à partir de lignes directrices existantes (4)(5)(6)(7)(8)(9), elle a fait l'objet de modifications afin de tenir compte des dernières avancées en recherche et des consultations d'experts sur un certain nombre de points essentiels. La méthode proposée ici a été validée par un essai tournant international (10).

Cette méthode d'essai décrit des essais de toxicité sur *Lemna gibba* et *Lemna minor*, deux espèces abondamment étudiées et visées par les références susmentionnées. La taxonomie des espèces du genre *Lemna* est complexe, notamment à cause de l'existence des nombreux phénotypes. Bien qu'il puisse y avoir une variation génétique pour la réaction des espèces de *Lemna* aux toxiques, nous ne sommes pas encore en mesure de recommander l'usage d'un clone particulier pour cette méthode d'essai, faute de données suffisantes sur cette source de variabilité. Notons que cet essai n'est pas réalisé dans des conditions axéniques, mais qu'à différentes étapes du mode opératoire, il inclut des mesures permettant de limiter au minimum la contamination par d'autres organismes.

Les procédés avec renouvellement (semi-statique et à écoulement continu dit «dynamique») et sans renouvellement (statique) de la solution expérimentale sont décrits en détail. En fonction des objectifs de l'essai et des exigences réglementaires, on envisagera d'appliquer les méthodes semi-statique et dynamique, par exemple pour les substances qui disparaissent rapidement de la solution par volatilisation, photodégradation, précipitation ou biodégradation. Des orientations supplémentaires sont fournies dans la référence (11).

1.2. DÉFINITIONS

Les définitions et abréviations suivantes sont utilisées aux fins de la présente méthode d'essai:

Biomasse: poids sec de la matière vivante présente dans une population. Dans cet essai, la biomasse est mesurée indirectement, en général par le nombre de thalles et la superficie des thalles, si bien que le terme «biomasse» recouvre également ces paramètres.

Chlorose: jaunissement du tissu des thalles.

Clone: organisme ou cellule issu d'un seul individu par reproduction asexuée. D'où l'identité génétique entre les individus issus d'un même clone.

Colonie: agrégat de thalles mères et filles (généralement 2 à 4) attachés les uns aux autres. Quelquefois désignée par le terme «plante».

▼M1

CE_x: concentration de la substance d'essai dissoute dans le milieu d'essai entraînant une réduction de x % (par exemple 50 %) de la croissance de *Lemna* durant une période d'exposition définie (à mentionner explicitement si elle dépasse la durée normale ou totale de l'essai). Afin de distinguer les valeurs de la CE mesurées en fonction du taux de croissance de celles mesurées en fonction du rendement, on utilise les abréviations CE_t, s'agissant du taux de croissance, et CE_r, s'agissant du rendement, suivies par la mention de la variable utilisée, par exemple CE_t (nombre de thalles).

Dynamique: qualifie un essai dans lequel les solutions expérimentales sont renouvelées en continu.

Thalle: désigne l'appareil végétatif de la lentille d'eau réduit à une petite lame ovale individuelle. Il représente la plus petite unité (individu) capable de reproduction.

Gibbosité: bosse ou renflement apparaissant sur les thalles.

Croissance: augmentation de la variable mesurée, par exemple le nombre de thalles, le poids sec, le poids frais ou la superficie des thalles, au cours de l'essai.

Taux de croissance (taux de croissance spécifique moyen): accroissement logarithmique de la biomasse durant la période d'exposition.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration d'essai la plus faible à laquelle on observe que la substance exerce un effet statistiquement significatif de réduction de croissance (à $p < 0,05$) par comparaison avec le témoin, durant une période d'exposition donnée. Néanmoins, toutes les concentrations supérieures à la CMEO doivent avoir un effet néfaste supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Lorsque ces deux conditions ne peuvent pas être remplies, il faut expliquer en détail la façon dont la CMEO (et donc la CSEO) a été choisie.

Variable mesurée: tout type de variable mesurée pour exprimer l'effet étudié au cours de l'essai par une ou plusieurs variables étudiées. Dans cette méthode, le nombre de thalles, la superficie des thalles, le poids frais et le poids sec sont des variables mesurées.

Monoculture: culture monospécifique.

Nécrose: tissu (des thalles) mort (c'est-à-dire blanc ou gorgé d'eau).

Concentration sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

Phénotype: caractéristiques observables d'un organisme, déterminées par l'interaction de ses gènes avec l'environnement.

Variables étudiées: variables permettant d'estimer la toxicité à partir de n'importe quelle variable mesurée décrivant la biomasse, selon différentes méthodes de calcul. Dans cette méthode, les taux de croissance et le rendement représentent les variables étudiées déduites de variables mesurées telles que le nombre de thalles, la superficie des thalles, le poids frais ou le poids sec.

Essai semi-statique: essai dans lequel la solution d'essai est renouvelée périodiquement à intervalles définis durant l'essai.

Essai statique: essai sans renouvellement de la solution d'essai durant l'essai.

▼**M1**

Effet étudié: décrit le facteur général qui sera modifié, par rapport au témoin, par la substance d'essai. Dans cette méthode, l'effet étudié est l'inhibition de la croissance qui peut être exprimée par différentes variables étudiées déduites d'une ou de plusieurs variables mesurées.

Milieu expérimental: milieu de croissance synthétique complet dans lequel les plantes mises à l'épreuve se développent pendant qu'elles sont exposées à la substance d'essai. La substance d'essai sera normalement dissoute dans le milieu expérimental.

Rendement: valeur de la variable mesurée choisie pour exprimer la biomasse à la fin de la période d'exposition, moins la valeur de cette variable au début de la période d'exposition.

1.3. PRINCIPE DE L'ESSAI

Des monocultures du genre *Lemna*, en phase de croissance exponentielle, sont exposées à différentes concentrations de la substance d'essai sur une période de sept jours. Cet essai vise à quantifier les effets de la substance sur la multiplication végétative des lentilles d'eau durant cette période, d'après l'évaluation de plusieurs variables choisies. Le nombre de thalles représente la première variable mesurée, mais on en détermine au moins une autre (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) car certaines substances sont susceptibles d'avoir un impact beaucoup plus prononcé sur des variables autres que le nombre de thalles. Afin de quantifier les effets de la substance, la croissance des lentilles d'eau dans les solutions expérimentales est comparée à celle des témoins, et la concentration induisant un pourcentage défini x % d'inhibition de la croissance (par exemple, 50 %) est déterminée et exprimée sous la forme de CE_x (par exemple, CE_{50}).

Dans cet essai, l'effet observé est l'inhibition de la croissance, exprimé en termes d'accroissement logarithmique de la variable mesurée (taux de croissance spécifique moyen) durant la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage donné d'inhibition du taux de croissance (par exemple, 50 %) est déterminée en fonction des taux de croissance spécifiques moyens relevés dans une série de solutions expérimentales et exprimée sous la forme C_xE_t (par exemple, $C_{50}E_t$).

Cette méthode d'essai comporte également une variable étudiée supplémentaire, le rendement, requise par la réglementation de certains pays. Il est défini comme étant la différence entre la valeur des variables mesurées à la fin de la période d'exposition et la valeur des variables mesurées au début de la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage donné d'inhibition du rendement (par exemple, 50 %) est calculée à partir du rendement enregistré dans une série de solutions expérimentales et exprimée en termes de C_xE_r (par exemple, $C_{50}E_r$).

En outre, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la concentration sans effet observé (CSEO) peuvent être déterminées par un calcul statistique.

1.4. INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Il faudrait disposer d'une méthode analytique suffisamment sensible pour quantifier la substance d'essai dans le milieu expérimental.

▼M1

Les informations sur la substance d'essai pouvant être utiles à l'établissement des conditions expérimentales comprennent la formule structurale, la pureté, l'hydrosolubilité, la stabilité dans l'eau et à la lumière, le pK_a, le K_{oe}, la pression de vapeur et la biodégradabilité. L'hydrosolubilité et la pression de vapeur peuvent être utilisées pour calculer la constante de Henry, qui indiquera si des pertes appréciables de la substance d'essai risquent de se produire durant la période de l'essai. On saura ainsi s'il y a lieu de prendre des mesures particulières afin de limiter ces pertes. Si la solubilité et la stabilité de la substance d'essai ne sont pas connues avec certitude, il est recommandé de les évaluer dans les conditions de l'essai, c'est-à-dire dans le milieu expérimental ainsi qu'à la température et sous le régime d'éclairage appliqués durant l'essai.

Lorsque la maîtrise du pH du milieu expérimental est particulièrement importante, par exemple lorsqu'on teste des métaux ou des substances hydrolytiquement instables, il est recommandé d'ajouter un tampon au milieu de croissance (voir premier alinéa du paragraphe 1.7.4). D'autres indications sur le traitement des substances qui se prêtent difficilement à cet essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont données dans la référence (11).

1.5. SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Des substances de référence telles que le 3,5-dichlorophénol utilisé dans l'essai tournant international (10) peuvent servir à vérifier le procédé expérimental. Il est conseillé de tester la substance de référence au moins deux fois par an ou, si l'essai est mené moins fréquemment, parallèlement à la détermination de la toxicité de la substance d'essai.

1.6. VALIDITÉ DE L'ESSAI

Pour que l'essai soit valable, le temps de dédoublement du nombre de thalles chez les témoins doit être inférieur à 2,5 jours (60 heures), ce qui correspond approximativement à une multiplication par sept de ce nombre en sept jours et à un taux de croissance spécifique moyen de 0,275 par jour. Si l'on utilise le milieu et les conditions expérimentales décrits dans cette méthode d'essai, ce critère peut être atteint avec une méthode d'essai statique (8). Ce critère devrait aussi pouvoir être rempli dans des conditions semi-statiques et dynamiques. Le calcul du temps de dédoublement est exposé au paragraphe 2.1.

1.7. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.7.1. **Appareillage**

Tout le matériel entrant en contact avec le milieu expérimental doit être en verre ou fait d'un autre matériau chimiquement inerte. La verrerie destinée aux cultures et à l'essai doit être stérile et exempte de tous les contaminants chimiques risquant d'être lessivés dans le milieu d'essai. Les récipients d'essai doivent être suffisamment larges pour permettre aux thalles des différentes colonies dans les récipients témoins de croître sans se recouvrir à la fin de l'essai. Il importe peu que les racines touchent le fond des récipients d'essai, mais il est conseillé d'utiliser des récipients d'essai d'une profondeur minimale de 20 mm et d'un volume minimal de 100 ml. Tout récipient répondant à ces critères peut être utilisé. Des béchers en verre, des cristallisoirs et des boîtes de Petri en verre aux dimensions appropriées se sont avérés adéquats. Les récipients d'essai seront couverts pour minimiser l'évaporation et la contamination accidentelle, tout en autorisant les échanges nécessaires avec l'air. Les récipients d'essai, et en particulier leurs couvercles, ne doivent pas réduire l'intensité lumineuse ni modifier les caractéristiques spectrales de la lumière.

▼M1

Les récipients expérimentaux et ceux contenant les cultures ne doivent pas être conservés ensemble. Le meilleur moyen d'y parvenir consiste à les garder dans des enceintes de croissance, des incubateurs ou des pièces séparés. Il faut pouvoir régler l'éclairage et la température et les maintenir à un niveau constant (voir paragraphe 1.7.8).

1.7.2. **Organisme expérimental**

Cet essai se pratique sur *Lemna gibba* ou *Lemna minor*. L'appendice 1 fournit une brève description condensée des espèces de lentilles d'eau ayant servi à des essais de toxicité. Le matériel végétal peut être obtenu auprès d'une collection de cultures d'un autre laboratoire ou être récolté sur le terrain. Dans ce dernier cas, les plantes doivent être maintenues dans le même milieu que celui qui servira à l'essai durant au moins huit semaines avant leur utilisation. Les cultures de départ ne seront prélevées que sur des sites manifestement non contaminés. Si les cultures proviennent d'un autre laboratoire ou d'une collection de cultures, elles seront également maintenues dans le même milieu que celui de l'essai durant au moins trois semaines. La source du matériel végétal ainsi que l'espèce et le clone (s'il est connu) utilisés pour l'essai doivent toujours figurer sur le rapport.

Il convient d'utiliser des monocultures visiblement non contaminées par d'autres organismes tels que des algues et des protozoaires. Les représentants sains de *L. minor* forment des colonies de deux à cinq thalles tandis que les colonies saines de *L. gibba* peuvent comprendre jusqu'à sept thalles.

La qualité et l'uniformité des plantes utilisées pour l'essai sont susceptibles d'avoir une influence sensible sur le résultat de l'essai, et les plantes doivent par conséquent être choisies avec soin. On utilisera des plantes jeunes, en croissance rapide et dépourvues de lésions visibles ou de parties décolorées (chlorose). Une fréquence élevée de colonies comprenant au moins deux thalles atteste la bonne qualité des cultures. Un nombre important de thalles uniques indique que les plantes vivent dans des conditions de stress, telles que carence en éléments nutritifs, et le matériel végétal issu de ces cultures ne peut servir à l'essai.

1.7.3. **Culture**

Afin d'alléger le travail d'entretien des cultures (par exemple, lorsque aucun essai n'est prévu sur les *Lemna* durant un certain temps), les cultures peuvent être maintenues à une température et sous un éclairage réduits (4-10 °C). L'appendice 2 fournit des précisions sur la culture. En cas de contamination visible par des algues ou d'autres organismes, il faut stériliser en surface un sous-échantillon de thalles de *Lemna* et le transférer dans un milieu nouvellement préparé (voir appendice 2). Dans cette éventualité, le reste de la culture contaminée est à éliminer.

Au moins sept jours avant l'essai, un nombre suffisant de colonies est transféré aseptiquement dans un milieu frais stérile et cultivé durant sept à dix jours dans les conditions de l'essai.

1.7.4. **Milieu expérimental**

Les différents milieux recommandés pour *Lemna minor* et *Lemna gibba* sont décrits ci-après. La prudence sera de rigueur en ce qui concerne l'ajout d'un tampon au milieu d'essai (MOPS [acide 4-morpholinepropanesulfonique, numéro CAS: 1132-61-2; numéro EINECS: 214-478-5) au milieu de *L. minor*, et $NaHCO_3$ au milieu de *L. gibba*] si l'on soupçonne le tampon de réagir avec la substance d'essai et d'influencer l'expression de sa toxicité. Le milieu de Steinberg (12) est acceptable pour autant que les critères de validité soient respectés.

▼M1

On préconise de cultiver et de tester *L. minor* sur une version modifiée du milieu de croissance pour *Lemna* établi par la norme suédoise (SIS). La composition de cette version modifiée est indiquée à l'appendice 3.

Le milieu de croissance 20X — AAP, décrit à l'appendice 3, est recommandé pour la culture et l'essai de *L. gibba*.

Le milieu de Steinberg, décrit à l'appendice 3, convient à *L. minor*, mais peut aussi être employé pour *L. gibba*, à condition que les critères de validité soient respectés.

1.7.5. **Solutions expérimentales**

Les solutions expérimentales sont généralement préparées par dilution d'une solution mère, elle-même préparée par dissolution de la substance dans le milieu de croissance.

La plus haute concentration testée de la substance d'essai ne doit normalement pas dépasser l'hydrosolubilité de la substance dans les conditions de l'essai. Il est à noter toutefois que les espèces du genre *Lemna* flottent à la surface et risquent d'être exposées à des substances qui s'accumulent à l'interface eau-air (par exemple, des substances peu solubles dans l'eau ou hydrophobes ou des tensio-actifs). Dans ces circonstances, l'exposition résultera de substances autres que celles qui sont en solution, de sorte que les concentrations expérimentales pourraient, suivant les caractéristiques de la substance d'essai, dépasser la solubilité dans l'eau. Pour les substances d'essai peu solubles dans l'eau, il peut être nécessaire de préparer une solution mère concentrée ou une dispersion de la substance au moyen d'un solvant organique ou d'un dispersant, afin de faciliter l'ajout de quantités précises de substance d'essai au milieu expérimental et de favoriser sa dispersion et sa dissolution. Le recours à ces auxiliaires doit être évité dans toute la mesure du possible. Les solvants ou les dispersants auxiliaires ne doivent pas induire de phytotoxicité. L'acétone et le diméthylformamide sont des exemples de solvants courants qui n'engendrent aucune phytotoxicité à des concentrations allant jusqu'à 100 µl/l. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant, sa concentration finale doit être limitée et ne peut pas dépasser 100 µl/L; elle doit être identique dans tous les récipients traités et témoins et spécifiée dans le rapport. La référence (11) donne des indications supplémentaires sur l'utilisation des dispersants.

1.7.6. **Groupes traités et témoins**

Il est utile de cerner la toxicité de la substance d'essai à l'égard de *Lemna*, par exemple à l'aide d'un essai de détermination de l'ordre de grandeur, afin d'établir des concentrations expérimentales pertinentes. L'essai de toxicité proprement dit doit comprendre au moins cinq concentrations formant une série géométrique. Il est préférable que les concentrations expérimentales ne soient pas séparées par un facteur supérieur à 3,2, mais on peut appliquer un facteur plus élevé si la courbe concentration-effet a une pente nulle. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Il faut réaliser au moins trois expériences identiques à chaque concentration.

Le choix de la gamme des concentrations d'essai (de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur ou de l'essai de toxicité) doit tenir compte des aspects suivants:

▼M1

— pour déterminer la CE_x, les concentrations expérimentales doivent entourer la valeur de la CE_x afin que le niveau de confiance soit suffisant. Par exemple, s'il s'agit d'estimer la CE_{50}, la concentration expérimentale la plus élevée doit dépasser la valeur de la CE_{50}. Si la CE_{50} sort de la gamme des concentrations expérimentales, les intervalles de confiance seront larges et il risque d'être impossible d'évaluer correctement la validité de l'ajustement statistique du modèle,

— s'il s'agit d'estimer la CMEO et la CSEO, la plus petite concentration expérimentale doit être suffisamment basse pour que la croissance des lentilles d'eau ne soit pas ralentie de manière significative par rapport à celle des témoins. De plus, la concentration expérimentale la plus élevée doit être suffisamment élevée pour que la croissance soit sensiblement inférieure à celle des témoins. Si ce n'est pas le cas, l'essai devra être répété à une gamme de concentrations différente (à moins que la concentration la plus élevée n'atteigne la limite de solubilité ou la concentration limite supérieure autorisée, par exemple 100 mg/l).

Chaque essai doit inclure des témoins sans substance d'essai, mais identiques aux récipients traités pour ce qui est du milieu nutritif, du nombre de thalles et de colonies, des conditions environnementales et du procédé expérimental. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant auxiliaire, il faut inclure un témoin supplémentaire contenant le solvant ou le dispersant à la même concentration que dans les récipients contenant la substance d'essai. Le nombre de récipients témoins identiques (et de témoins contenant le solvant, le cas échéant) doit être au moins égal, et idéalement deux fois supérieur, au nombre de récipients d'essai utilisés à chaque concentration expérimentale.

Si la détermination de la CSEO n'est pas requise, la conception de l'essai peut être modifiée pour augmenter le nombre de concentrations et diminuer le nombre d'expériences identiques par concentration. Toutefois, le nombre de témoins identiques doit être au moins égal à trois.

1.7.7. **Exposition**

Des colonies formées de 2 à 4 thalles visibles sont prélevées dans la culture de l'inoculum et réparties au hasard dans les récipients d'essai dans des conditions d'asepsie. Chaque récipient d'essai doit contenir 9 à 12 thalles au total. Le nombre de thalles et de colonies doit être identique dans chaque récipient d'essai. L'expérience acquise avec cette méthode et l'essai tournant montrent que l'utilisation de trois expériences identiques par traitement, comprenant chacune 9 à 12 thalles au départ, suffit pour détecter des différences de croissance entre les traitements équivalant à environ 4 à 7 % d'inhibition, si celles-ci sont calculées d'après le taux de croissance, et de 10 à 15 % si elles sont calculées d'après le rendement (10).

L'emplacement des récipients expérimentaux dans l'incubateur doit être aléatoire, afin de réduire au minimum l'influence des différences spatiales d'intensité lumineuse ou de température. La disposition des récipients au moment d'effectuer les observations (ou plus souvent de remettre en place les récipients) est également régie par un plan en blocs ou une procédure aléatoire.

▼M1

Si un essai de stabilité préliminaire montre que la concentration de la substance d'essai ne peut être maintenue (la concentration mesurée tombe en dessous de 80 % de la concentration mesurée initialement) sur la durée de l'essai (sept jours), on recommande la méthode semi-statique. Dans ce cas, les colonies doivent être exposées au moins deux fois durant l'essai (par exemple, les troisième et cinquième jours) à des solutions d'essai et à des solutions témoins nouvellement préparées. La fréquence de l'exposition à un milieu renouvelé dépendra de la stabilité de la substance d'essai: une fréquence plus élevée peut s'avérer nécessaire pour maintenir des concentrations presque constantes dans le cas de substances très instables ou volatiles. Certaines circonstances appellent une méthode dynamique (11)-(13).

La voie d'exposition par application foliaire (pulvérisation) n'est pas reprise dans cette méthode d'essai, mais la référence (14) donne des informations à ce sujet.

1.7.8. **Conditions d'incubation**

On applique un éclairage continu à fluorescence blanche, chaude ou froide, afin d'obtenir une intensité lumineuse comprise entre 85 et 135 $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$ lorsqu'elle est mesurée dans le domaine de longueur d'onde autorisant la photosynthèse (400 à 700 nm) à des points situés à la même distance de la source lumineuse que les thalles de *Lemna* (équivalant à 6 500-10 000 lux). Tout écart par rapport à l'intensité lumineuse choisie ne doit pas dépasser ± 15 % dans la zone de l'essai. La méthode de détection et de mesure de la lumière, notamment le type de capteur, affectera la valeur mesurée. Les capteurs sphériques (qui détectent la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus et en dessous du plan de mesure) et les capteurs «cosinus» (qui détectent la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus du plan de mesure) sont préférables aux capteurs unidirectionnels et afficheront des valeurs plus élevées pour une source lumineuse multiple comme celle qui est décrite ici.

La température des récipients d'essai est maintenue à 24 ± 2 °C. Le pH du milieu témoin ne peut augmenter de plus de 1,5 unité au cours de l'essai. Toutefois, un écart supérieur à 1,5 unité n'invalidera pas l'essai, si le respect des critères de validité peut être démontré. Il faudra être particulièrement attentif aux variations du pH dans certains cas particuliers, notamment avec des substances instables et des métaux. La référence (11) fournit des indications supplémentaires à ce sujet.

1.7.9. **Durée**

L'essai prend fin sept jours après le transfert des plantes dans les récipients expérimentaux.

1.7.10. **Mesures et déterminations analytiques**

Au début de l'essai, on dénombre les thalles présents dans les récipients d'essai et on consigne ces valeurs en prenant soin de compter les thalles émergents bien visibles. Les nombres de thalles paraissant normaux ou anormaux sont déterminés au début de l'essai, au moins une fois tous les trois jours durant la période d'exposition (c'est-à-dire à au moins deux occasions au cours de la période de sept jours) et à la fin de l'essai. Il y a lieu de noter les changements affectant le développement des plantes, par exemple en ce qui concerne la taille et l'aspect des thalles, les signes de nécrose, de chlorose ou les gibbosités, la fragmentation des colonies ou la diminution de leur flottabilité ainsi que la longueur et l'aspect des racines. Les caractéristiques significatives du milieu d'essai (par exemple, la présence de matières non dissoutes, le développement d'algues dans les récipients d'essai) doivent également être rapportées.

▼**M1**

Durant l'essai, en plus de la détermination du nombre de thalles, on mesure aussi les effets de la substance d'essai sur une ou plusieurs des variables suivantes:

i) superficie totale des thalles;

ii) poids sec;

iii) poids frais.

La superficie totale des thalles présente l'avantage de pouvoir être déterminée pour chaque récipient traité et témoin au début, pendant et à la fin de l'essai. Le poids sec ou frais est déterminé au début de l'essai à partir d'un échantillon de la culture de l'inoculum représentatif du matériel utilisé pour entamer l'essai et à la fin de l'essai avec le matériel végétal de chaque récipient traité et de chaque récipient témoin. Si la superficie des thalles n'est pas mesurée, le poids sec est préférable au poids frais.

La superficie totale des thalles, le poids sec et le poids frais peuvent être déterminés comme suit:

i) *superficie totale des thalles*: la superficie totale des thalles de toutes les colonies peut être déterminée par analyse de l'image. On saisit la silhouette du récipient expérimental et des plantes avec une caméra vidéo (en plaçant le récipient sur une boîte lumineuse) et on numérise l'image obtenue. Un étalonnage réalisé avec des formes planes de superficie connue permet ensuite de déterminer la superficie totale des thalles dans un récipient d'essai. On veillera à éviter toute interférence avec le bord du récipient d'essai. Une autre méthode plus laborieuse consiste à photocopier les récipients d'essai contenant les plantes, à découper la silhouette résultant des colonies et à déterminer leur superficie à l'aide d'un analyseur de la surface foliaire ou de papier millimétré. D'autres techniques (par exemple, le quotient du poids de la silhouette découpée dans le papier par le poids d'un morceau de papier de superficie connue) conviennent également;

ii) *poids sec*: toutes les colonies sont prélevées dans chaque récipient d'essai et rincées avec de l'eau distillée ou désionisée. Elles sont déposées sur un buvard qui absorbe l'excès d'eau et séchées à 60 °C jusqu'à ce qu'elles atteignent un poids constant. Tous les fragments de racines doivent être inclus. Le poids sec doit être exprimé avec une précision d'au moins 0,1 mg;

iii) *poids frais*: toutes les colonies sont transférées dans des tubes de polystyrène (ou d'un autre matériau inerte) tarés et percés de petits trous (1 mm) dans leur fond arrondi. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3 000 tpm pendant 10 minutes à température ambiante. Les tubes contenant les colonies ainsi séchées sont repesés, et le poids frais est calculé par déduction de la tare du tube.

1.7.10.1. *Fréquence des mesures et des déterminations analytiques*

Avec le procédé statique, le pH de chaque récipient traité doit être mesuré au début et à la fin de l'essai. Si le procédé est semi-statique, le pH est mesuré dans chaque lot de «nouvelle» solution expérimentale avant chaque renouvellement ainsi que dans les solutions «utilisées» correspondantes.

▼M1

L'intensité lumineuse est mesurée dans l'enceinte de croissance, dans l'incubateur ou dans la pièce à des points situés à la même distance de la source de lumière que les thalles de *Lemna*, et ce au moins une fois au cours de l'essai. La température du milieu est mesurée au moins une fois par jour dans un récipient d'essai supplémentaire gardé dans les mêmes conditions que les autres dans l'enceinte de croissance, l'incubateur ou la pièce.

Durant l'essai, les concentrations de la substance d'essai sont déterminées à intervalles appropriés. Dans les essais statiques, il faut déterminer les concentrations au moins au début et à la fin de l'essai.

Dans les essais semi-statiques, où l'on s'attend à ce que la concentration de la substance d'essai ne reste pas dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale, il est nécessaire d'analyser toutes les solutions d'essai nouvellement préparées et les mêmes solutions à chaque renouvellement (voir troisième alinéa du paragraphe 1.7.7). Néanmoins, pour les essais où la concentration de la substance d'essai mesurée initialement ne se situe pas dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale, mais où suffisamment d'indices attestent que les concentrations initiales sont répétables et stables (c'est-à-dire dans l'intervalle de 80-120 % de la concentration initiale), les analyses chimiques peuvent n'être effectuées qu'aux concentrations expérimentales maximale et minimale. Dans tous les cas, la détermination des concentrations de la substance d'essai avant le renouvellement pourra n'être effectuée que dans un seul des récipients identiques de chaque concentration expérimentale (ou dans un récipient dans lequel on aura mélangé le contenu de tous les récipients traités de manière identique).

Un régime de prélèvement identique à celui décrit pour les essais semi-statiques pourra être appliqué aux essais dynamiques, avec une analyse au début, au milieu et à la fin de l'essai, mais sans l'analyse des solutions «utilisées» qui ne se justifie pas dans ce cas. Dans ce type d'essai, le débit du diluant et de la substance d'essai ou de la solution mère de la substance d'essai doit être contrôlé quotidiennement.

S'il s'avère que la concentration de la substance d'essai a pu se maintenir tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale ou mesurée initialement, l'analyse des résultats peut s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement. Si l'écart par rapport à la concentration nominale ou mesurée initialement est supérieur à ± 20 %, l'analyse des résultats devra reposer sur la moyenne géométrique de la concentration relevée durant l'exposition ou sur des modèles décrivant le déclin de la concentration de la substance d'essai (11).

1.7.11. **Essai limite**

Dans certaines circonstances, par exemple lorsqu'un essai préliminaire indique que la substance d'essai n'exerce aucun effet toxique à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/l ou à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (suivant celle qui est la plus basse), on peut effectuer un essai limite afin de comparer les réactions d'un groupe témoin avec celles d'un groupe traité (à 100 mg/l ou à une concentration égale à la limite de solubilité). Il est fortement recommandé d'étayer cet essai par une analyse de la concentration d'exposition. Tous les critères de validité et conditions expérimentales décrits précédemment s'appliquent à l'essai limite, si ce n'est que le nombre de récipients traités de manière identique doit être doublé. La croissance des lentilles d'eau dans le groupe témoin et dans le groupe traité peut être analysée au moyen d'un test statistique permettant de comparer les moyennes, par exemple un test t de Student.

▼M1

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1. TEMPS DE DOUBLEMENT

La formule suivante, appliquée avec les données provenant des récipients témoins, permet de déterminer le temps de doublement (T_d) du nombre de thalles et de vérifier si l'étude respecte ce critère de validité (paragraphe 1.6):

$$T_d = \ln 2/\mu$$

où μ est le taux de croissance spécifique moyen calculé suivant les indications des deux premiers alinéas du paragraphe 2.2.1.

2.2. VARIABLES ÉTUDIÉES

Cet essai est destiné à déterminer les effets de la substance d'essai sur la multiplication végétative de *Lemna*. Cette méthode d'essai décrit deux variables, de manière à répondre aux différentes préférences et exigences réglementaires des pays membres. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables dans tous les pays membres, les effets doivent être évalués en fonction des deux variables étudiées a) et b) définies ci-dessous.

a) taux de croissance spécifique moyen: cette variable étudiée est calculée d'après les changements affectant, d'une part, les logarithmes du nombre de thalles et, d'autre part, les logarithmes d'un autre paramètre mesuré (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) en fonction du temps (exprimé en jours), chez les témoins et dans chaque groupe traité. Elle est quelquefois appelée «taux de croissance relatif» (15).

b) rendement: cette variable étudiée est calculée d'après les modifications du nombre de thalles et d'un autre paramètre mesuré (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) chez les témoins et dans chaque groupe traité, jusqu'à la fin de l'essai.

Notons que les valeurs de toxicité calculées avec ces deux variables étudiées ne sont pas comparables et qu'il faut tenir compte de cette différence lorsqu'on utilise les résultats de l'essai. Les valeurs de la CE_x fondées sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) seront généralement supérieures à celles fondées sur le rendement (C_xE_r), si les conditions expérimentales de cette méthode d'essai sont appliquées, en raison du fondement mathématique de chacune de ces approches. Cette différence n'est due qu'au calcul mathématique, il ne s'agit pas d'une différence de sensibilité entre les deux variables étudiées. Le concept du taux de croissance spécifique moyen repose sur le schéma général de croissance exponentielle des lentilles d'eau dans des cultures non limitées, où la toxicité est estimée d'après les effets sur le taux de croissance, sans tenir compte du niveau absolu du taux de croissance spécifique du témoin, de la pente de la courbe concentration-effet, ni de la durée de l'essai. En revanche, les résultats fondés sur la variable de rendement dépendent de toutes ces autres variables. La C_xE_r dépend du taux de croissance spécifique de l'espèce de lentille d'eau utilisée dans chaque essai et du taux de croissance spécifique maximal, susceptible de varier d'une espèce à une autre, voire d'un clone à l'autre. Cette variable ne doit pas être utilisée pour comparer la sensibilité de différentes espèces, voire de différents clones de lentilles d'eau. S'il est préférable, du point de vue scientifique, d'estimer la toxicité d'après le taux de croissance spécifique moyen, la présente méthode d'essai propose également des estimations fondées sur le rendement afin de satisfaire à la réglementation en vigueur dans certains pays

▼M1

Les estimations de la toxicité doivent reposer sur le nombre de thalles ainsi que sur une autre variable mesurée (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais), parce que certaines substances peuvent avoir un effet bien plus prononcé sur une variable autre que le nombre de thalles, qui pourrait ne pas être détecté par le seul calcul du nombre de thalles.

On dresse un tableau réunissant le nombre de thalles et toute autre variable mesurée (c'est à dire superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) ainsi que les concentrations de la substance d'essai relevées à chaque mesure. Les analyses ultérieures, par exemple pour estimer la CMEO, la CSEO ou la CE_x, doivent s'appuyer sur les valeurs de chaque expérience identique d'un même essai et non sur les moyennes calculées pour chaque groupe traité.

2.2.1. **Taux de croissance spécifique moyen**

Le taux de croissance spécifique moyen durant une période donnée est calculé en fonction de l'accroissement logarithmique des variables de la croissance — nombre de thalles et une autre variable mesurée (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) — au moyen de la formule ci-dessous pour chaque expérience identique des groupes traités et témoins:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

où:

— μ_{i-j}: taux de croissance spécifique moyen du temps i au temps j,

— N_i: variable mesurée dans le récipient témoin ou traité au temps i,

— N_j: variable mesurée dans le récipient témoin ou traité au temps j,

— t: période de temps comprise entre i et j.

Pour chaque groupe traité et témoin, calculer un taux de croissance moyen et les estimations de la variance.

On calcule le taux de croissance spécifique moyen sur l'ensemble de la période d'essai (le temps «i» mentionné dans la formule ci-dessus correspond au début de l'essai et le temps «j» à la fin de l'essai). Pour chaque concentration des groupes traités et des témoins, calculer la valeur moyenne du taux de croissance spécifique ainsi que les estimations de la variance. Évaluer également le taux de croissance section par section, afin d'apprécier les effets de la substance d'essai durant la période d'exposition (par exemple, en analysant les courbes de croissance log-transformées). Un taux de croissance section par section sensiblement différent du taux de croissance moyen montre qu'il y a un écart par rapport à la croissance exponentielle constante, écart qui réclame un examen attentif des courbes de croissance. Dans ce cas, une approche prudente consisterait à comparer les taux de croissance spécifiques des cultures traitées durant la période d'inhibition maximale avec ceux des témoins au cours de la même période.

▼M1

Le pourcentage d'inhibition du taux de croissance (I_t) peut ensuite être calculé pour chaque concentration expérimentale (groupe traité) selon la formule suivante:

$$\% I_t = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

où:

— $\% I_t$: pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique moyen,

— μ_C: valeur moyenne de μ dans le groupe témoin,

— μ_T: valeur moyenne de μ dans le groupe traité.

2.2.2. **Rendement**

Les effets sur le rendement sont déterminés en fonction de deux variables mesurées: le nombre de thalles et une autre variable (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) mesurées dans chaque récipient d'essai au début et à la fin de l'essai. En ce qui concerne le poids frais ou sec, la biomasse de départ est déterminée à partir d'un échantillon de thalles prélevé dans le lot qui a servi à ensemencer les récipients d'essai (voir deuxième alinéa du paragraphe 1.7.3). Pour chaque concentration expérimentale et le témoin, calculer un rendement moyen ainsi que les estimations de la variance. Le pourcentage moyen d'inhibition du rendement ($\%I_r$) peut être calculé pour chaque groupe traité d'après la formule suivante:

$$\% I_r = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

où:

— $\% I_r$: pourcentage de réduction du rendement,

— b_C: biomasse finale moins la biomasse de départ dans le groupe témoin,

— b_T: biomasse finale moins la biomasse de départ dans le groupe traité.

2.2.3. **Tracé des courbes concentration-effet**

On trace des courbes concentration-effet décrivant le pourcentage d'inhibition moyen de la variable étudiée (I_t ou I_r calculées comme indiqué au dernier alinéa des paragraphes 2.2.1 ou 2.2.2) en fonction du logarithme de la concentration de la substance d'essai.

2.2.4. **Estimation de la CE_x**

Les estimations de la CE_x (par exemple, la CE_{50}) s'appuient à la fois sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) et sur le rendement (C_xE_r), qui doivent, à leur tour, reposer sur le nombre de thalles et sur une variable mesurée supplémentaire (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) puisque certaines substances n'exercent pas le même effet sur le nombre de thalles que sur d'autres variables mesurées. Les paramètres de toxicité souhaités sont donc quatre valeurs de CE_x pour chaque niveau d'inhibition x calculé: C_xE_t (nombre de thalles); C_xE_t (superficie totale des thalles, poids sec ou frais); C_xE_r (nombre de thalles); et C_xE_r (superficie totale des thalles, poids sec ou frais).

▼**M1**

2.3. MÉTHODES STATISTIQUES

L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de la régression. Il est possible d'utiliser une régression linéaire pondérée après avoir effectué une transformation linéarisant les valeurs décrivant l'effet observé — par exemple en unités probit ou logit ou Weibull (16), mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression non linéaire, celles-ci traitant mieux les irrégularités inévitables des valeurs et les écarts par rapport aux distributions régulières. Proches de zéro ou de l'inhibition totale, ces irrégularités risquent d'être amplifiées par la transformation et d'interférer avec l'analyse (16). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull sont destinées à être utilisées avec des effets par tout ou rien (mortalité ou survie, par exemple) et doivent être modifiées pour pouvoir être utilisées avec les valeurs du taux de croissance ou du rendement. Les références (17)(18) et (19) décrivent des procédures permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues.

Pour chaque variable étudiée à analyser, utiliser la relation concentration-effet pour calculer des estimations ponctuelles des valeurs de CE_x. Déterminer, si possible, les limites de confiance à 95 % pour chaque estimation. La validité de l'ajustement des données décrivant les effets au modèle de régression est à évaluer par un procédé statistique ou graphique. L'analyse de la régression doit s'appuyer sur les effets relevés dans chaque récipient traité de manière identique et non sur les moyennes des groupes traités.

Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec *bootstrap* (rééchantillonnage) (20), si les modèles ou méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.

Afin d'estimer la CMEO, et par conséquent la CSEO, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par une analyse de la variance (ANOVA). La moyenne de chaque concentration doit ensuite être comparée avec la moyenne du témoin à l'aide d'un test approprié à comparaisons multiples ou de tendance. Les essais de Dunnett ou de William peuvent être utiles (21)(22)(23)(24). Il est nécessaire de vérifier si l'hypothèse de l'ANOVA de l'homogénéité de la variance se confirme. Cette vérification peut être pratiquée par un procédé graphique ou par un test formel (25), notamment les tests de Levene ou de Bartlett. L'infirmation de l'hypothèse de l'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance est extrême et ne peut être rectifiée par une transformation, on envisagera des méthodes d'analyse telles que les tests de tendance régressifs de Jonkheere. La référence (19) livre des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.

Des découvertes récentes conduisent les scientifiques à préconiser l'abandon de la notion de CSEO au profit d'estimations ponctuelles de la CE_x fondées sur la régression. Aucune valeur appropriée de x n'a encore été établie pour cet essai sur les *Lemna*. Néanmoins, une gamme de 10 à 20 % semble convenir (suivant la variable étudiée sélectionnée) et il est préférable de mentionner à la fois la CE_{10} et la CE_{20} dans le rapport.

3. **RAPPORT**

3.1. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique et propriétés physico-chimiques, notamment la limite de solubilité dans l'eau,

▼M1

— données d'identification chimique (par exemple, numéro CAS), y compris la pureté.

Espèce soumise à l'essai:

— nom scientifique, clone (s'il est connu) et source.

Conditions expérimentales:

— procédé expérimental appliqué (statique, semi-statique ou dynamique),

— date du début de l'essai et durée de l'essai,

— milieu expérimental,

— description de la conception de l'essai (récipients d'essai et couvercles, volumes des solutions, nombre de colonies et de thalles par récipient au début de l'essai),

— concentrations expérimentales (nominales et mesurées selon les besoins) et nombre d'expériences identiques par concentration,

— méthodes de préparation des solutions mères et des solutions d'essai, y compris l'utilisation d'un solvant ou d'un dispersant, le cas échéant,

— température appliquée durant l'essai,

— source, intensité et homogénéité lumineuses,

— valeurs du pH des milieux traités et des milieux témoins,

— concentrations de la substance d'essai, méthode d'analyse et données permettant d'évaluer la qualité (études de validation, écarts-types ou limites de confiance des analyses),

— méthodes de détermination du nombre de thalles et des autres variables mesurées, par exemple le poids sec, le poids frais ou la superficie des thalles,

— tous les écarts par rapport à cette méthode d'essai.

Résultats:

— données brutes: nombre de thalles et autres variables mesurées dans chaque récipient traité et témoin à chaque observation et à chaque analyse,

— moyennes et écarts-types de chaque variable mesurée,

— courbes de croissance à chaque concentration (il est recommandé d'ajouter la transformation logarithmique de la variable mesurée, voir deuxième alinéa du paragraphe 2.2.1),

— temps de doublement/taux de croissance chez le témoin d'après le nombre de thalles,

— calcul des variables étudiées pour chaque expérience identique à chaque concentration, avec valeurs moyennes et coefficient de variation des expériences identiques,

— représentation graphique de la relation concentration-effet,

— estimation des effets toxiques pour les variables étudiées, par exemple CE_{50}, CE_{20}, CE_{10} et intervalles de confiance associés; si elles ont été calculées, la CMEO et/ou la CSEO ainsi que les méthodes statistiques utilisées pour les déterminer,

▼M1

— si on a pratiqué une analyse de la variance, la puissance de l'effet détectable (par exemple, la différence la moins significative),

— toute stimulation de la croissance, le cas échéant, dans un groupe traité,

— tout signe visuel de phytotoxicité et observations des solutions d'essai,

— analyse des résultats, y compris l'influence d'un éventuel écart par rapport à cette méthode d'essai.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

1) OCDE LD 221 (2006) *Lemna* sp. Essais d'inhibition de la croissance.

2) L'utilisation des études sur les *lemna* pour les substances colorées est détaillée au point 13.5.3 du Manuel des décisions de l'UE daté de juillet 2006, disponible à l'adresse http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals

3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment — Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, disponible à l'adresse

   i. http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1234958685#A

4) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

5) USEPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8pp.

6) AFNOR — Association française de normalisation. (1996). XP T 90-337: détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 pages.

7) Institut suédois de normalisation (SIS). (1995). Qualité de l'eau — détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, lentille d'eau, sur sept jours. SS 02 82 13. 15 pages (en suédois).

8) Environment Canada. (1999). Méthode d'essai biologique: essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37-120 pages.

9) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

10) Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23.

12) ISO DIS 20079. Qualité de l'eau — détermination de l'effet toxique des constituants de l'eau et des eaux résiduaires vis-à-vis des lentilles d'eau (*Lemna minor*) — essai d'inhibition de la croissance des lentilles d'eau.

▼**M1**

13) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

14) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, 353-359.

15) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 481-483.

16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

17) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.

18) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 1485-1494.

19) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

20) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

21) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

22) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

23) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

24) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

25) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.

▼M1

Appendice 1

Description de *Lemna* spp.

La plante aquatique communément appelée «lentille d'eau», *Lemna* spp., appartient à la famille des *Lemnaceae* représentée par quatre genres répartis dans le monde. Leur taxonomie et leur aspect ont été décrits de façon complète (1)(2). *Lemna gibba* et *Lemna minor* sont des espèces représentatives des zones tempérées et sont couramment utilisées dans les essais de toxicité. Ces deux espèces se caractérisent par une tige discoïde (thalle) flottante ou submergée, et une racine très fine partant du centre de la face inférieure de chaque thalle. Les *Lemna* spp. produisent rarement des fleurs et se reproduisent par voie végétative en engendrant de nouveaux thalles (3). Comparativement aux sujets âgés, les jeunes plantes ont tendance à être plus pâles, à avoir des racines plus courtes et à comporter deux ou trois thalles de différentes tailles. De par leur petite taille, leur structure simple, leur reproduction asexuée et la brièveté du temps séparant deux générations, les plantes du genre *Lemna* se prêtent remarquablement bien aux essais en laboratoire (4)(5).

La sensibilité étant susceptible de varier d'une espèce à l'autre, seules les comparaisons de sensibilités intraspécifiques sont valables.

Exemples d'espèces de *Lemna* ayant servi à des essais: références bibliographiques des espèces

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8 pages.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 pages.

Institut suédois de normalisation (SIS). (1995). Qualité de l'eau — détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, lentille d'eau, sur sept jours. SS 02 82 13. 15 pages (en suédois).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481-483.

▼M1

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Sources d'espèces de *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, CANADA, M5S 3 B2
Tél. + 1-416-978-3641
Fax + 1-416-978-5878
courriel: jacreman@botany.utoronto.ca
http://www.botany.utoronto.ca/utcc

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE
Tél. 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91 Stockholm
SUÈDE
Tél: + 46 86747240
Fax + 46 86747636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
ALLEMAGNE
courriel: lemna@uba.de
http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

Bibliographie

1) Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

▼**M1**

Appendice 2

Entretien d'une culture mère

Les cultures mères peuvent être conservées à basse température (4-10 °C) durant de longues périodes sans qu'il soit nécessaire de les rétablir. Le milieu de croissance des *Lemna* peut être identique à celui utilisé pour les essais, mais d'autres milieux riches en nutriments conviennent également aux cultures mères.

Régulièrement, plusieurs jeunes plantes vert clair sont prélevées et transférées aseptiquement dans de nouveaux récipients de culture contenant un milieu frais. Aux basses températures proposées ici, les sous-cultures peuvent être lancées à des intervalles allant jusqu'à trois mois.

Il convient d'utiliser des récipients de culture en verre stériles et chimiquement propres (lavés à l'acide), et d'employer des techniques de manipulation aseptiques. Si la culture mère est contaminée, par des algues ou des champignons par exemple, on prendra les mesures nécessaires pour éliminer les organismes contaminants. S'agissant des algues et de la plupart des autres organismes contaminants, une stérilisation en surface peut suffire. Pour ce faire, on prélève un échantillon des plantes contaminées et on leur coupe les racines. On agite ensuite les plantes vigoureusement dans de l'eau propre, avant de les immerger dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % (v/v) durant 30 secondes à 5 minutes. Après quoi, on rince les plantes à l'eau stérile et on les transfère en plusieurs lots dans des récipients de culture contenant du milieu de croissance frais. Ce traitement détruit beaucoup de thalles, surtout si les périodes d'exposition sont plus longues, mais certaines des plantes survivantes ne sont généralement plus contaminées. Celles-ci peuvent alors être utilisées pour ensemencer de nouvelles cultures.

▼M1

Appendice 3

Milieux

Différents milieux de croissance sont recommandés pour *L. minor* et *L. gibba*, à savoir une version modifiée du milieu établi par l'Institut suédois de normalisation (SIS) pour *L. minor*, et le milieu 20X AAP pour *L. gibba*. Ces deux milieux, dont les compositions sont données ci-dessous, doivent être préparés avec des réactifs et des produits de qualité «réactifs» ou «pour analyse» et de l'eau désionisée.

Milieu de croissance pour Lemna établi d'après celui de l'Institut suédois de normalisation

— Les solutions mères I-V sont stérilisées à l'autoclave (120 °C, 15 minutes) ou par filtration sur une membrane (à pores d'environ 0,2 μm).

— La solution mère VI (et, si on le souhaite, la solution mère VII) ne sont stérilisées que par filtration sur membrane; elles ne doivent pas être autoclavées.

— Les solutions mères stériles doivent être entreposées au frais et à l'obscurité. Les solutions mères I-V doivent être éliminées après six mois, tandis que la solution mère VI et, le cas échéant, la solution mère VII, sont périmées après 1 mois.

Solution mère n°	Substance	Concentration dans la solution mère (g/l)	Concentration dans le milieu préparé (mg/l)	Milieu préparé	
				Élément	Concentration (mg/l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA·$2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (tampon)	490	490	—	—

— Pour préparer un litre de milieu SIS, ajouter les ingrédients suivants à 900 ml d'eau désionisée:

— 10 ml de solution mère I,

— 5 ml de solution mère II,

— 5 ml de solution mère III,

— 5 ml de solution mère IV,

▼M1

— 1 ml de solution mère V,

— 5 ml de solution mère VI,

— 1 ml de solution mère VII (facultatif).

Note: la solution mère VII (tampon MOPS) peut être nécessaire pour certaines substances d'essai (voir dernier alinéa du paragraphe 1.4).

— Le pH est ajusté à 6,5± 0,2 avec du HCl ou du NaOH 0,1 ou 1 M, et le volume est porté à un litre avec de l'eau désionisée.

Milieu de croissance 20X AAP

Les solutions mères sont préparées dans de l'eau stérile distillée ou désionisée.

Les solutions mères stériles doivent être entreposées au frais et à l'obscurité. Dans ces conditions, les solutions mères se conservent au moins 6 à 8 semaines.

Cinq solutions mères nutritives (A1, A2, A3, B et C) sont préparées pour le milieu 20X AAP, avec des produits de qualité «réactifs». Le milieu de croissance se compose de 20 ml de chaque solution mère nutritive ajoutés à environ 850 ml d'eau désionisée. Le pH est ajusté à 7,5 ± 0,1 avec du HCl ou du NaOH 0,1 ou 1 M, et le volume est porté à un litre avec de l'eau désionisée. Le milieu est ensuite filtré sur une membrane à pores d'environ 0,2 µm dans un récipient stérile.

Le milieu de croissance destiné aux essais doit être préparé un à deux jours avant son utilisation pour que le pH ait le temps de se stabiliser. On vérifie le pH du milieu de croissance avant utilisation et on le rajuste si nécessaire par l'ajout d'une solution de HCl ou de NaOH 0,1 ou 1 M, comme décrit ci-dessus.

Solution mère n°	Substance	Concentration dans la solution mère (g/l) (1)	Concentration dans le milieu préparé (mg/l) (*)	Milieu préparé	
				Élément	Concentration (mg/l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 $mg \cdot l^{-1}$	66 $\mu g \cdot l^{-1}$	Zn	31 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 $mg \cdot l^{-1}$	29 $\mu g \cdot l^{-1}$	Co	7,1 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 $mg \cdot l^{-1}$	145 $\mu g \cdot l^{-1}$	Mo	58 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 $mg \cdot l^{-1}$	0,24 $\mu g \cdot l^{-1}$	Cu	0,080 $\mu g \cdot l^{-1}$
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Sauf mention contraire.

▼M1

Note: la concentration finale de bicarbonate théoriquement appropriée (permettant d'éviter un ajustement appréciable du pH) est de 15 mg/l et non de 300 mg/l. Toutefois, le milieu 20X-AAP a jusqu'à présent été utilisé avec une concentration de 300 mg/l de bicarbonate, y compris dans l'essai tournant réalisé pour cette méthode [I. Sims, P. Whitehouse et R. Lacey (1999) The OECD Lemna Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency].

Milieu de Steinberg (d'après la norme ISO 20079)

Concentrations et solutions mères

— Dans la norme ISO 20079, le milieu modifié de Steinberg n'est utilisé que pour *Lemna minor* (puisque seule *Lemna minor* est autorisée dans les essais relevant de cette norme), mais des essais ont montré que *Lemna gibba* pouvait également donner de bons résultats.

— Ce milieu doit être préparé avec des produits de qualité «réactifs» ou «pour analyse» et de l'eau désionisée.

— Préparer le milieu nutritif à partir de solutions mères ou du milieu dix fois plus concentré (permettant d'atteindre une concentration maximale sans précipitation).

Tableau 1

Milieu de Steinberg À pH stabilisé (modifié par Altenburger)

Substance		Milieu nutritif	
Macroéléments	poids molaire	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Microéléments	poids molaire	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA dihydrate de sodium	372,24	1 500,00	4,03

▼M1

Tableau 2

Solutions mères (macroéléments)

1. **Macroéléments (concentrés cinquante fois)**	g/l
Solution mère 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Solution mère 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Solution mère 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tableau 3

Solutions mères (microéléments)

2. **Microéléments (concentrés mille fois)**	mg/l
Solution mère 4:	
H_3BO_3	120,0
Solution mère 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Solution mère 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Solution mère 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Solution mère 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA dihydrate de sodium	1 500,00

— Les solutions mères 2 et 3 peuvent être réunies, de même que les solutions mères 4 et 7 (en tenant compte des concentrations requises).

— Pour augmenter la durée de conservation des solutions mères, stériliser celles-ci en les laissant 20 minutes dans l'autoclave à 121 °C ou en les filtrant de manière stérile sur une membrane à pores de 0,2 μm. La stérilisation par filtration (0,2 μm) est fortement recommandée pour la solution mère 8.

Préparation du milieu de Steinberg (modifié) à la concentration finale

— Ajouter 20 ml des solutions mères 1, 2 et 3 (voir tableau 2) à environ 900 ml d'eau désionisée afin d'éviter une précipitation.

— Ajouter 1,0 ml des solutions mères 4, 5, 6, 7 et 8 (voir tableau 3).

— Le pH doit être à 5,5 ± 0,2 (ajuster par ajout d'un volume minime de solution de NaOH ou de HCl).

▼**M1**

— Porter à 1 000 ml avec de l'eau.

— Si les solutions mères sont stérilisées et que l'on utilise une eau appropriée, aucune stérilisation supplémentaire n'est nécessaire. Si le milieu final est stérilisé, la solution mère 8 doit être ajoutée après l'autoclavage (à 121 °C pendant 20 minutes).

Préparation du milieu de Steinberg (modifié) concentré dix fois pour stockage intermédiaire

— Ajouter 20 ml des solutions mères 1, 2 et 3 (voir tableau 2) à environ 30 ml d'eau afin d'éviter une précipitation.

— Ajouter 1,0 ml des solutions mères 4, 5, 6, 7 et 8 (voir tableau 3). Porter à 100 ml avec de l'eau.

— Si les solutions mères sont stérilisées et que l'on utilise une eau appropriée, aucune stérilisation supplémentaire n'est nécessaire. Si le milieu final est stérilisé, la solution mère 8 doit être ajoutée après l'autoclavage (à 121 °C pendant 20 minutes).

— Le pH du milieu (concentration finale) doit être à 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27 ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES CHIRONOMES DANS UN SYSTÉME EAU-SÉDIMENT DOPÉ

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 218 (2004) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Cette méthode d'essai est conçue pour évaluer les effets d'une exposition prolongée à des substances chimiques sur des larves de *Chironomus* sp., un diptère vivant dans les sédiments d'eau douce. Elle s'appuie sur des protocoles d'essais de toxicité sur *Chironomus riparius* et *Chironomus tentans*, mis au point en Europe (1) (2) (3) et en Amérique du Nord (4) (5) (6) (7) (8), et soumis à des essais circulaires (1) (6) (9). D'autres espèces de chironomes bien documentées peuvent aussi être employées, par exemple *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Le scénario d'exposition appliqué dans cette méthode d'essai consiste à introduire la substance d'essai dans le sédiment. La sélection du mode d'exposition dépend de la finalité de l'essai. Le dopage du sédiment vise à simuler l'accumulation de produits chimiques persistants dans le sédiment. Ce chargement s'effectue dans un système expérimental eau-sédiment.

3. En général, les substances à tester sur des organismes vivant dans les sédiments subsistent longtemps dans ce compartiment. Ces organismes peuvent être exposés par diverses voies. L'importance relative de chaque voie d'exposition et le temps pris par chacune d'entre elles pour contribuer à l'effet toxique global dépendent des propriétés physico-chimiques de chaque substance chimique. Dans le cas des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un log K_{oe}> 5) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, l'ingestion d'aliments contaminés peut constituer une voie d'exposition non négligeable. Afin de ne pas sous-estimer la toxicité des substances fortement lipophiles, on envisagera d'ajouter de la nourriture au sédiment avant l'application de la substance d'essai. La présente méthode d'essai est axée sur l'exposition à long terme, de façon à couvrir toutes les voies d'exposition potentielles. L'essai dure de 20 à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et de 28 à 65 jours pour *C. tentans*. Si l'on a besoin de données à court terme pour un motif précis, par exemple pour étudier les effets d'une substance chimique instable, des récipients supplémentaires, ajoutés au dispositif expérimental, peuvent être retirés après 10 jours d'essai.

4. Les effets observés sont le nombre total d'adultes émergés et temps écoulé jusqu'à l'émergence. Si l'on a besoin de données à court terme, il est recommandé de ne mesurer la survie et la croissance des larves qu'après 10 jours, en ajoutant le nombre nécessaire de récipients supplémentaires.

5. L'utilisation d'un sédiment reconstitué est recommandée en raison de ses avantages par rapport aux sédiments naturels:

   — la variabilité expérimentale est réduite parce que le sédiment reconstitué forme une «matrice normalisée» reproductible; en outre, il n'est plus nécessaire de trouver des sources de sédiments non contaminés et non pollués,

   — les essais peuvent être effectués à n'importe quel moment de l'année, la variabilité saisonnière n'intervenant plus, et il n'est pas nécessaire de traiter préalablement le sédiment afin d'éliminer la faune indigène; l'utilisation de sédiments reconstitués diminue aussi le coût associé à la collecte sur le terrain d'une quantité suffisante de sédiments pour les essais systématiques,

   — les sédiments reconstitués permettent de comparer la toxicité des substances et de les classer en conséquence.

6. L'appendice 1 contient les définitions employées dans la présente méthode d'essai.

▼M4

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des chironomes au premier stade larvaire sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dans un système sédiment-eau. Une fois la substance d'essai incorporée au sédiment, des larves au premier stade sont introduites dans des béchers où les concentrations d'eau et de sédiment ont été stabilisées. L'émergence des chironomes et leur vitesse de développement sont mesurées à la fin de l'essai. La survie des larves et leur poids peuvent aussi être mesurés après 10 jours si nécessaire (en ajoutant le nombre d'expériences identiques requis). Ces données sont analysées, soit à l'aide d'un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x % de l'émergence ou de la survie des larves ou de leur croissance (par exemple CE_{15}, CE_{50}, etc.), soit par la vérification d'une hypothèse statistique afin de déterminer une CSEO/CMEO. Cette dernière nécessite une comparaison entre les valeurs efficaces et les valeurs des témoins à l'aide de tests statistiques.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

8. Il faudrait connaître l'hydrosolubilité de la substance d'essai, sa pression de vapeur, son coefficient de partage mesuré ou calculé dans le sédiment et sa stabilité dans l'eau et le sédiment. Il convient de disposer d'une méthode d'analyse fiable pour quantifier la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, dans l'eau des pores et dans le sédiment, et pour laquelle la précision et le seuil de détection sont connus. Il est également utile de connaître la formule structurale et la pureté de la substance d'essai ainsi que son devenir chimique (par exemple sa dissipation, sa dégradation abiotique et biotique, etc.). Des indications complémentaires pour tester les substances se prêtant difficilement à l'essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont fournies à la référence (12).

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

9. Des substances de référence pourront être testées régulièrement afin de démontrer, la fiabilité du protocole et des conditions de l'essai. Voici quelques exemples de toxiques de référence ayant fait leurs preuves dans des essais circulaires et des études de validation: lindane, trifluraline, pentachlorophénol, chlorure de cadmium et chlorure de potassium (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. Pour que l'essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies:

— l'émergence chez les témoins doit atteindre au moins 70 % à la fin de l'essai (1) (6),

— s'agissant de *C. riparius* et C. *yoshimatsui*, l'émergence au stade adulte dans les récipients témoins doit avoir lieu entre 12 et 23 jours après leur introduction dans les récipients expérimentaux; *C. tentans* nécessite une période de 20 à 65 jours,

— à la fin de l'essai, le pH et la concentration d'oxygène dissous seront mesurés dans chaque récipient. La concentration d'oxygène devrait atteindre au moins 60 % de la valeur de saturation en air (VSA) à la température appliquée et le pH de l'eau sus-jacente devrait être compris entre 6 et 9 dans tous les récipients expérimentaux,

— la température de l'eau ne devrait pas varier de plus de ± 1,0 °C et pourrait être contrôlée grâce à une chambre isotherme, auquel cas la température de la chambre devra être confirmée à intervalles appropriés.

▼M4

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Récipients expérimentaux

11. L'essai se déroule dans des béchers en verre de 600 ml, mesurant 8 cm de diamètre. D'autres récipients peuvent être utilisés à condition qu'ils permettent de garantir une profondeur adéquate d'eau et de sédiment. Le sédiment doit offrir une superficie de 2 à 3 cm^2 par larve. Le quotient de la profondeur de la couche de sédiment par la profondeur de la couche d'eau sus-jacente doit être égal à 1/4. Les récipients et les autres appareils qui entreront en contact avec le système d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte (par exemple du Téflon).

Sélection des espèces

12. *Chironomus riparius* est l'espèce qui convient le mieux. *Chironomus tentans* peut aussi être utilisé, mais il est plus difficile à manipuler et nécessite une période d'essai plus longue. *Chironomus yoshimatsui* convient également. La méthode de culture de *Chironomus riparius* est détaillée à l'appendice 2. D'autres documents décrivent les conditions de culture des autres espèces: *Chironomus tentans* (4) et *Chironomus yoshimatsui* (11). L'identification de l'espèce est à confirmer avant l'essai, mais n'est pas requise avant chaque essai si les organismes proviennent d'un élevage interne.

Sédiment

13. Il est préférable d'employer un sédiment reconstitué (également dénommé sédiment artificiel ou synthétique). Néanmoins, si l'on opte pour un sédiment naturel, il faudrait le caractériser, au moins quant au pH et à la teneur en carbone organique, (la détermination d'autres paramètres, tels que le rapport C/N et la granulométrie est aussi recommandée) et s'assurer qu'il n'est pas contaminé et n'abrite pas d'autres organismes qui pourraient entrer en compétition avec les chironomes ou les consommer. Avant d'utiliser un sédiment naturel dans un essai de toxicité sur les chironomes, il est également recommandé de le maintenir durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui seront appliquées durant l'essai (conditionnement). Le sédiment reconstitué décrit ci-dessous, basé sur le sol artificiel utilisé dans la méthode d'essai C.8, est recommandé (14) (1) (15) (16):

    a) 4-5 % (poids sec) de tourbe, avec un pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0; il est important d'utiliser une tourbe sous forme de poudre, finement broyée (dimension des particules ≤ 1 mm) et séchée uniquement à l'air;

    b) 20 % (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %);

    c) 75-76 % (poids sec) de sable quartzique (composé en majorité de sable fin, plus de 50 % des particules mesurant entre 50 et 200 μm);

    d) ajouter de l'eau désionisée jusqu'à ce que la teneur en humidité du mélange final atteigne 30 à 50 %;

    e) ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure ($CaCO_3$) pour ajuster le pH du mélange final composant le sédiment à 7,0 ± 0,5. Il convient d'obtenir 2 % (± 0,5 %) de carbone organique dans le mélange final en y ajoutant les quantités appropriées de tourbe et de sable, comme indiqué en a) et en c).

14. Les sources de tourbe, de kaolin et de sable doivent être connues. On vérifiera que les composants du sédiment ne sont pas contaminés par des substances chimiques (par exemple des métaux lourds, des composés organochlorés, des composés organophosphorés, etc.). Un exemple de préparation de sédiment reconstitué est décrit à l'appendice 3. Les composants peuvent aussi être mélangés à l'état sec, à condition de démontrer qu'après l'ajout de l'eau sus-jacente, les composants du sédiment ne se séparent pas (flottement de particules de tourbe, par exemple) et que la tourbe ou le sédiment sont suffisamment conditionnés.

▼M4

Eau

15. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable selon les critères spécifiés aux appendices 2 et 4 peut servir à l'essai. Toute eau appropriée, naturelle (eau superficielle ou souterraine), reconstituée (voir appendice 2) ou eau du robinet déchlorée, est acceptable comme eau pour l'élevage et les essais si les chironomes y survivent sur toute la durée de l'élevage et de l'essai sans manifester de signes de stress. Au début de l'essai, le pH de l'eau d'essai se situera entre 6 et 9 et sa dureté totale ne dépassera pas 400 mg/l en $CaCO_3$. Néanmoins, si l'on suspecte une interaction entre les ions qui provoquent la dureté et la substance d'essai, il faudra utiliser une eau moins dure (et ne pas employer le milieu Elendt M4 dans ce cas). Le même type d'eau doit être utilisé tout au long de l'étude. Les caractéristiques de la qualité de l'eau énumérées à l'appendice 4 sont à mesurer au moins deux fois par an ou chaque fois que ses caractéristiques sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées.

Solutions mères – sédiments dopés

16. Les sédiments dopés sont généralement préparés à la concentration souhaitée en ajoutant directement une solution de la substance d'essai au sédiment. Une solution mère de la substance d'essai dissoute dans de l'eau désionisée est mélangée au sédiment reconstitué à l'aide d'un agitateur à rouleaux, d'un mélangeur pour aliments ou mélangée à la main. Si la substance d'essai est peu soluble dans l'eau, elle peut être dissoute dans un volume aussi petit que possible d'un solvant organique adéquat (hexane, acétone ou chloroforme, par exemple). Cette solution est ensuite mélangée à 10 g de sable quartzique fin par récipient d'essai. Il faut attendre que le solvant s'évapore jusqu'à ce qu'il soit totalement éliminé du sable; le sable est ensuite mélangé avec la quantité appropriée de sédiment par bécher. Seuls des agents très volatils peuvent être utilisés pour solubiliser, disperser ou émulsifier la substance d'essai. On n'oubliera pas de tenir compte de la quantité de sable apportée avec le mélange de la substance d'essai et du sable lors de la préparation du sédiment (ce dernier sera préparé avec moins de sable). Il faudra veiller à mélanger complètement la substance d'essai au sédiment et à l'y répartir uniformément. Si nécessaire, on analysera des sous-échantillons afin de déterminer le degré d'homogénéité.

CONCEPTION DE L'ESSAI

17. La conception de l'essai définit le nombre et l'espacement des concentrations expérimentales, le nombre de récipients à chaque concentration et le nombre de larves par récipient. La marche à suivre pour estimer une valeur de CE, la CSEO et mener un essai limite est décrite.

Conduite d'une analyse de régression

18. La concentration efficace (par exemple, CE_{15}, CE_{50}) et la gamme de concentrations dans laquelle l'effet produit par la substance d'essai est d'intérêt doivent être couvertes par les concentrations incluses dans l'essai. Généralement, l'exactitude, et plus particulièrement la validité, de l'estimation des concentrations efficaces (CE_x) s'accroissent lorsque la concentration efficace se situe dans la gamme des concentrations testées. Il faut éviter d'extrapoler des résultats très en dessous de la concentration efficace la plus faible ou au-dessus de la concentration maximale. Il est utile de conduire un essai préliminaire pour déterminer la gamme des concentrations à utiliser (voir paragraphe 27).

▼M4

19. S'il faut estimer la CE_x, au moins cinq concentrations et trois répétitions par concentration doivent être mises à l'essai. En tout état de cause, il est recommandé de tester suffisamment de concentrations pour obtenir une bonne estimation du modèle. Le facteur séparant les concentrations ne doit pas excéder deux (sauf dans les cas où la courbe dose-effet présente une pente faible). Le nombre de répétitions par traitement peut être diminué si le nombre de concentrations expérimentales entraînant différents effets est augmenté. L'augmentation du nombre de répétitions ou la contraction des intervalles entre les concentrations expérimentales tend à réduire les intervalles de confiance pour l'essai. Le nombre de répétitions sera augmenté s'il y a lieu d'estimer le taux de survie et la croissance des larves après dix jours.

Procédure d'estimation d'une CSEO/CMEO

20. S'il faut estimer la CMEO ou la CSEO, il convient de tester cinq concentrations expérimentales et au moins quatre répétitions par concentration, le facteur séparant les concentrations n'excédant pas deux. Le nombre d'expériences identiques doit être tel qu'il fournit une puissance statistique permettant de détecter une différence de 20 % avec le témoin, au seuil de signification statistique de 5 % (p = 0,05). S'agissant de la vitesse de développement, une analyse de la variance (ANOVA) convient généralement, telle que le test de Dunnett ou le test de Williams (17) (18) (19) (20). S'agissant du taux d'émergence, le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haenszel peuvent être utilisés.

Essai limite

21. Si l'essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations n'a engendré aucun effet, un essai limite peut être conduit (une concentration expérimentale et un témoin). L'essai limite se pratique avec une concentration suffisamment élevée pour permettre aux décideurs d'exclure tout effet toxique possible de la substance d'essai et la limite est fixée à une concentration censée ne jamais être atteinte dans les conditions réelles. Une concentration de 1 000 mg/kg (poids sec) est recommandée. Il est généralement nécessaire de mener au moins six répétitions pour les organismes traités et les témoins. Il y a lieu de démontrer que la puissance statistique est suffisante pour détecter une différence de 20 % avec les témoins, au seuil de signification statistique de 5 % (p = 0,05). En ce qui concerne l'effet sur la vitesse de développement et sur le poids, le test t constitue une méthode statistique appropriée, si les données respectent les conditions exigées par ce test (normalité, variances homogènes). On pourra recourir au test t à variance inégale ou à un test non paramétrique, tel que le test de Wilcoxon-Mann-Whitney si ces conditions ne sont pas remplies. S'agissant du taux d'émergence, le test exact de Fisher convient.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition

Préparation du système sédiment dopé – eau

22. La procédure de mélange de la substance d'essai au sédiment décrite dans la méthode d'essai C.8, Toxicité pour les vers de terre, est recommandée pour cet essai (14). Les sédiments dopés sont placés au fond des récipients avant d'y verser l'eau, de façon à obtenir un ratio volumique sédiment-eau de 1/4 (voir paragraphes 11 et 15). La profondeur de la couche de sédiment doit être comprise entre 1,5 et 3 cm. Afin d'éviter la séparation des constituants du sédiment et la resuspension des particules fines pendant le remplissage de la colonne d'eau, on peut recouvrir le sédiment d'un disque en plastique durant cette opération et retirer le disque juste après. D'autres dispositifs conviennent également.

23. Les récipients expérimentaux doivent être couverts (par des plaques de verre, par exemple). On prendra soin de remplacer les volumes d'eau évaporée durant l'étude, le cas échéant, et ce avec de l'eau distillée ou désionisée afin d'empêcher l'accumulation de sels.

▼M4

Stabilisation

24. Une fois que le sédiment dopé surmonté d'une couche d'eau a été préparé, il est souhaitable de laisser la substance d'essai se répartir entre la phase aqueuse et le sédiment (3) (4) (6) (13), et ce, de préférence, dans les mêmes conditions de température et d'aération que durant l'essai. L'équilibre met de quelques heures à quelques jours à s'établir, voire 4-5 semaines dans de rares cas, selon le sédiment et la substance chimique. Il ne faut pas attendre que l'équilibre soit atteint, car beaucoup de substances risquent de se dégrader durant cette période, mais un temps d'attente de 48 heures est recommandé. Au terme de cette période d'équilibrage, on mesure la concentration de la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, les pores et le sédiment, au moins pour la concentration la plus élevée et la plus faible (voir paragraphe 38). Ces déterminations analytiques de la substance d'essai permettent de calculer le bilan massique et d'exprimer les résultats en fonction des concentrations mesurées.

Introduction des organismes d'essai

25. Quatre à cinq jours avant d'introduire les organismes d'essai dans les récipients, des amas d'œufs sont prélevés dans les cultures et déposés dans de petits flacons contenant du milieu de culture. Un milieu plus ancien issu de la culture mère tout comme un milieu fraîchement préparé peuvent être utilisés. Si ce dernier est utilisé, on ajoutera une petite quantité de nourriture, par exemple des algues vertes et/ou quelques gouttes du filtrat d'une suspension de paillettes pour poissons finement broyées, au milieu de culture (voir appendice 2). Seuls des amas d'œufs fraîchement pondus peuvent être utilisés. Normalement, les larves commencent à éclore quelques jours après la ponte (2 à 3 jours pour *Chironomus riparius* à 20 °C et 1 à 4 jours pour *Chironomus tentans* à 23 °C et *Chironomus yoshimatsui* à 25 °C) et le développement des larves se déroule en quatre stades, dont chacun dure 4 à 8 jours. Cet essai se pratique au premier stade larvaire (2-3 ou 1-4 jours après l'éclosion). Il est possible de vérifier le stade de développement des moucherons d'après la largeur de la capsule céphalique (6).

26. Vingt larves au premier stade, choisies au hasard, sont déposées dans chaque récipient contenant le sédiment dopé et l'eau, à l'aide d'une pipette émoussée. L'aération de l'eau doit être interrompue dès qu'on introduit les larves dans les récipients expérimentaux, et ce durant 24 heures après l'ajout des larves (voir paragraphes 25 et 32). Selon le protocole expérimental suivi (voir paragraphes 19 et 20), le nombre de larves utilisées par concentration s'élève au moins à 60 pour l'estimation d'une valeur de concentration efficace (CE) et à 80 pour la détermination de la CSEO.

Concentrations d'essai

27. Il peut être utile de conduire un essai de détermination de l'ordre de grandeur pour délimiter la gamme de concentrations à appliquer dans l'essai proprement dit. À cet effet, on utilise une série de concentrations largement espacées de la substance d'essai. Afin de reproduire la même densité de surface par chironome que dans l'essai proprement dit, les chironomes sont exposés à chaque concentration de la substance d'essai durant une période permettant d'estimer les concentrations expérimentales appropriées et aucune expérience identique n'est nécessaire.

28. Les concentrations pour l'essai définitif sont choisies en fonction des résultats de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur. Au moins cinq concentrations doivent être appliquées et sélectionnées comme décrit aux paragraphes 18 à 20.

▼M4

Témoins

29. L'essai inclura le nombre nécessaire de récipients témoins pourvus du sédiment mais exempts de toute substance d'essai (voir paragraphes 19-20). Si la substance d'essai a été appliquée à l'aide d'un solvant (voir paragraphe 16), il convient d'ajouter un témoin dont le sédiment contient également le solvant.

Système expérimental

30. Des systèmes statiques sont utilisés. Des systèmes semi-statiques ou à écoulement continu avec renouvellement intermittent ou continu de l'eau sus-jacente peuvent être utilisés dans des cas exceptionnels, par exemple si les spécifications de la qualité de l'eau deviennent inappropriées pour l'organisme d'expérience ou affectent l'équilibre chimique (si, par exemple, la concentration d'oxygène dissous devient trop basse, la concentration des excréta augmente de façon trop importante ou si des minéraux lessivés à partir du sédiment affectent le pH et/ou la dureté de l'eau). Néanmoins, d'autres méthodes d'amélioration de la qualité de l'eau sus-jacente, telles que l'aération, seront normalement suffisantes et préférables.

Alimentation

31. Les larves ont besoin d'être nourries, de préférence quotidiennement Tetra-Phyll; ou au moins trois fois par semaine. Durant les dix premiers jours, chaque jeune larve recevra quotidiennement 0,25 à 0,5 mg (0,35-0,5 mg pour *C. yoshimatsui*) de nourriture pour poissons (suspendue dans l'eau ou finement moulue, par exemple TetraMin ou TetraPhyll; voir les détails à l'appendice 2). Il peut être nécessaire d'augmenter légèrement cette quantité pour les larves plus âgées: 0,5-1 mg par larve et par jour devrait suffire pour le reste de l'essai. On diminuera la ration alimentaire de tous les organismes traités et témoins si des champignons se développent ou si des organismes témoins meurent. Si la croissance fongique s'avère impossible à enrayer, l'essai doit être renouvelé. Si l'essai porte sur des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un log K_{oe} > 5) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, la quantité de nourriture nécessaire à la survie et à la croissance naturelle des organismes peut être ajoutée au sédiment reconstitué avant la période de stabilisation. Dans ce cas, la nourriture pour poissons est remplacée par une ration végétale, par exemple 0,5 % (poids sec) de feuilles finement broyées d'ortie (*Urtica dioica*), de mûrier (*Morus alba*), de trèfle blanc ou rampant (*Trifolium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*), par exemple, ou d'un autre matériau végétal (*Cerophyl* ou alpha-cellulose).

Conditions d'incubation

32. L'eau sus-jacente est soumise à une légère aération, mise en route de préférence 24 heures après l'introduction des larves et maintenue jusqu'à la fin de l'essai (il faut veiller à ce que la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 60 % de la valeur de saturation en air). L'air est insufflé à travers une pipette Pasteur en verre fixée 2 à 3 cm au-dessus de la couche de sédiment (une ou quelques bulles par seconde). Si la substance d'essai est volatile, il faudra éventuellement supprimer l'aération.

33. L'essai est mené à température constante (20 °C ± 2 °C). Pour *C. tentans* et *C. yoshimatsui*, les températures recommandées s'élèvent respectivement à 23 °C et 25 °C (± 2 °C). La photopériode est de 16 heures et l'éclairement compris entre 500 et 1 000 lux.

▼M4

Durée de l'exposition

34. L'exposition débute avec l'introduction des larves dans les récipients traités et témoins. La durée maximale de l'exposition s'élève à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et à 65 jours pour *C. tentans*. Si les moucherons émergent plus tôt, l'essai peut s'achever au moins cinq jours après l'émergence du dernier adulte témoin.

Observations

Émergence

35. La durée du développement et le nombre total de moucherons mâles et femelles adultes totalement émergés sont à déterminer. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses.

36. Au moins trois fois par semaine, on vérifiera que les organismes des récipients expérimentaux ne manifestent aucun comportement anormal (sortie du sédiment, nage inhabituelle par exemple) par rapport aux témoins. Chaque jour, durant la période supposée de l'émergence, on comptera le nombre de moucherons émergés et on consignera le sexe et le nombre de moucherons complètement émergés. Après identification, les moucherons sont retirés des récipients. Tout amas d'œufs déposé avant la fin de l'essai doit être recensé puis enlevé afin d'empêcher la réintroduction de larves dans le sédiment. Le nombre de pupes visibles n'ayant pas réussi à émerger est aussi enregistré. Des indications sur la façon de mesurer l'émergence sont données à l'appendice 5.

Croissance et survie

37. S'il faut fournir des données sur la survie et la croissance des larves après 10 jours, des récipients d'essai supplémentaires seront ajoutés dès le début de l'essai, pour pouvoir être utilisés ultérieurement. Le sédiment de ces récipients supplémentaires sera tamisé à travers des mailles de 250 μm pour retenir les larves. La mort est déterminée par deux critères: l'immobilité et l'absence de réaction à un stimulus mécanique. Les larves non récupérées doivent aussi être comptabilisées parmi les mortes (les larves qui sont mortes au début de l'essai ont pu être dégradées par des microbes). Après avoir déterminé le poids sec (sans cendres) des larves survivantes par récipient expérimental, on calcule le poids sec individuel moyen par récipient. Il est utile d'établir à quel stade se trouvent les larves survivantes, et ce d'après la largeur de la capsule céphalique de chaque individu.

Mesures analytiques

Concentration de la substance d'essai

38. Avant le début de l'essai (c'est-à-dire avant l'introduction des larves), on prélève des échantillons du sédiment d'au moins un récipient par traitement, afin de déterminer analytiquement la concentration de la substance d'essai dans le sédiment. Il est recommandé d'analyser, au minimum, des échantillons de l'eau sus-jacente, de l'eau des pores, et du sédiment, au début (voir paragraphe 24) et à la fin de l'essai, et ce de la concentration la plus élevée et d'une concentration plus basse. Les concentrations de la substance d'essai nous renseignent sur le comportement et la répartition de la substance d'essai dans le système eau-sédiment.

39. Lorsqu'on effectue des mesures intermédiaires (par exemple au septième jour) et si l'analyse requiert des échantillons volumineux qui ne peuvent être prélevés des récipients sans influencer le système expérimental, les analyses seront pratiquées sur des échantillons provenant de récipients expérimentaux supplémentaires traités de la même façon (y compris par la présence des organismes d'essai), mais non utilisés pour des observations biologiques.

▼M4

40. Pour isoler l'eau interstitielle, on recommande de centrifuger les échantillons à 10 000 g et à 4 °C durant 30 minutes. Cependant, s'il est démontré que la substance d'essai ne s'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Avec des échantillons trop petits, il arrive que les concentrations dans l'eau des pores soient impossibles à analyser.

Paramètres physico-chimiques

41. Le pH de l'eau et la température des récipients d'essai doivent être mesurés de façon appropriée (voir paragraphe 10). La dureté de l'eau et la teneur en ammoniac sont mesurées dans les récipients témoins et dans un récipient traité à la concentration la plus élevée, au début et à la fin de l'essai.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

42. Cet essai vise à déterminer l'effet de la substance d'essai sur la vitesse de développement et le nombre total de moucherons mâles et femelles totalement émergés ou, dans le cas de l'essai de 10 jours, les effets sur la survie et le poids des larves. Si rien n'indique que les deux sexes présentent des différences statistiques de sensibilité, les résultats obtenus sur les mâles et les femelles peuvent être regroupés pour l'analyse statistique. Les différences de sensibilité entre les sexes peuvent être jugées statistiquement par un test (de tableau) χ^2 - r × 2, par exemple. La survie des larves et le poids sec individuel moyen par récipient doivent être déterminés après dix jours, le cas échéant.

43. Il est préférable de calculer les concentrations efficaces, exprimées en fonction du poids sec, à partir des concentrations mesurées dans le sédiment au début de l'essai (voir paragraphe 38).

44. Pour estimer ponctuellement la CE_{50} ou une quelconque CE_x, les statistiques par récipient peuvent être utilisées comme des expériences identiques proprement dites. Lorsqu'on calcule un intervalle de confiance pour une quelconque CE_x, il faut tenir compte de la variabilité entre les récipients ou montrer que celle-ci est négligeable. Si le modèle est ajusté par la méthode des moindres carrés, il convient d'appliquer une transformation des données pour les statistiques par récipient afin d'accroître l'homogénéité de la variance. Toutefois, les valeurs de la CE_x sont à calculer après que les résultats ont été «retransformés» de façon à recouvrer leur valeur originale.

45. Si l'analyse statistique vise à déterminer la CSEO/CMEO par la vérification d'une hypothèse, la variabilité entre les récipients doit être prise en compte, par exemple à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) «emboîtée». Par contre, des tests plus robustes (21) peuvent être utilisés au cas où les hypothèses habituelles de l'analyse de la variance ne se vérifient pas.

Taux d'émergence

46. Le taux d'émergence donne une réponse par tout ou rien et peut être analysé par le test de Cochran-Armitage appliqué de façon régressive si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Dans le cas contraire, un test exact de Fisher ou un test de Mantel-Haenszel avec des valeurs de p corrigées selon Bonferroni-Holm peuvent être employés. S'il s'avère que la variabilité entre expériences identiques à la même concentration est supérieure à ce qu'une distribution binomiale indiquerait (variation souvent qualifiée d'«extra-binomiale»), on appliquera un test plus robuste (Cochran-Armitage ou test exact de Fisher) comme proposé à la référence (21).

▼M4

La somme des moucherons émergés par récipient, n_e, est déterminée et divisée par le nombre de larves introduites, n_a:

$$TE = \frac{n_e}{n_a}$$

où:

TE = taux d'émergence

n_e = nombre de moucherons émergés par récipient

n_a = nombre de larves introduites par récipient

47. Une variante plus appropriée aux échantillons de grande taille, lorsque la variance est extra-binomiale, consiste à traiter le taux d'émergence comme une réponse continue et à appliquer une méthode telle que le test de William si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Le test de Dunnett convient dans le cas où la relation ne s'avère pas monotone. Ici, on considère qu'un échantillon est de grande taille lorsque le nombre de moucherons émergés et le nombre de chironomes non émergés dépassent chacun cinq, par récipient expérimental.

48. Pour réaliser l'analyse de la variance (ANOVA), il convient d'appliquer aux valeurs de TE une transformation «arcsinus-racine carrée» ou «Freeman-Tukey» afin d'obtenir une distribution proche de la normale et d'égaliser les variances. Le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction de Bonferroni) ou le test de Mantel-Haenszel peuvent être employés lorsqu'on utilise des fréquences absolues. La transformation arcsinus-racine carrée consiste à calculer l'inverse du sinus ($sinus^{-1}$) de la racine carrée du TE.

49. Pour les taux d'émergence, les valeurs de la CE_x sont calculées par une analyse de régression [ou par probit (22), logit, Weibull, des logiciels commerciaux appropriés, etc.]. Si l'analyse de la régression échoue (par exemple, lorsqu'il y a moins de deux réponses partielles), on fait appel à d'autres méthodes non paramétriques telles que la moyenne mobile ou une simple interpolation.

Vitesse de développement

50. La période de développement moyenne représente le temps moyen écoulé entre l'introduction des larves (jour 0 de l'essai) et l'émergence de la cohorte expérimentale de moucherons (pour calculer la période de développement réelle, il faut tenir compte de l'âge des larves au moment de l'introduction). La vitesse de développement est l'inverse de la période de développement (unité: 1/jour) et représente la partie du développement larvaire qui s'effectue par jour. Pour évaluer la toxicité dans les sédiments, il est préférable de choisir la vitesse de développement, car sa variance est plus faible et ses valeurs sont plus homogènes et plus proches d'une distribution normale, en comparaison avec la période de développement. C'est pourquoi les tests paramétriques puissants conviennent mieux à la vitesse de développement qu'à la période de développement. Si la vitesse de développement est traitée comme une réponse continue, les valeurs de la CE_x peuvent être estimées par l'analyse de la régression, par exemple (23), (24).

51. Pour les tests statistiques suivants, le nombre de moucherons observés le jour × sont considérés comme ayant émergé au milieu de l'intervalle de temps compris entre le jour x et le jour x - 1 (1 = longueur de l'intervalle d'observation, habituellement 1 jour). La vitesse de développement moyenne par récipient (x) est calculée comme suit:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

où:

$\bar{x}$: vitesse de développement moyenne par récipient

i: indice de l'intervalle d'observation

m: nombre maximal d'intervalles d'observation

f_i: nombre de moucherons émergés durant l'intervalle d'observation i

n_e: nombre total de moucherons émergés à la fin de l'expérience ($=\sum f_i$)

x_i: vitesse de développement des moucherons émergés durant l'intervalle i

$$x_i = \frac{1}{\left(jour_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

où:

$jour_i$: jour d'observation (compté depuis l'application)

l_i: durée de l'intervalle d'observation I (exprimé en jours, habituellement 1 jour)

Rapport d'essai

52. Le rapport d'essai doit fournir au moins les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (hydrosolubilité, pression de vapeur, coefficient de partage dans le sol (ou dans le sédiment s'il est connu), stabilité dans l'eau, etc.),

— identification chimique (nom courant, nom chimique, formule structurale, numéro CAS, etc.), pureté et méthode d'analyse pour la quantification de la substance d'essai.

Espèce d'essai:

— animal d'essai utilisé: espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage,

— informations sur la manipulation des amas d'œufs et des larves,

— âge des animaux d'expérience au moment où ils ont été déposés dans les récipients expérimentaux.

Conditions expérimentales:

— sédiment utilisé, c'est-à-dire naturel ou reconstitué,

— pour les sédiments naturels: localisation et description du site de prélèvement et notamment, si possible, son histoire en matière de contamination; caractéristiques: pH, teneur en carbone organique, quotient C/N et granulométrie, le cas échéant,

— préparation du sédiment reconstitué: ingrédients et caractéristiques (teneur en carbone organique, pH, humidité, etc. au début de l'essai),

— préparation de l'eau d'essai (si l'eau est reconstituée) et caractéristiques (concentration d'oxygène, pH, conductivité, dureté, etc. au début de l'essai),

— profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente,

— volume de l'eau sus-jacente et de l'eau des pores; poids du sédiment humide avec et sans eau des pores,

▼M4

— récipients expérimentaux (matériau et dimension),

— méthode de chargement du sédiment: concentrations expérimentales appliquées, nombre d'expériences identiques et utilisation d'un solvant, le cas échéant,

— phase de stabilisation du système sédiment dopé-eau: durée et conditions,

— conditions d'incubation: température, cycle et intensité de lumière, aération (fréquence et intensité),

— informations détaillées sur la nourriture: type, préparation, quantité et régime d'administration.

Résultats:

— concentrations d'essai nominales, concentrations d'essai mesurées et résultats de toutes les analyses conduites pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans le récipient expérimental,

— qualité de l'eau dans les récipients expérimentaux: pH, température, oxygène dissous, dureté et teneur en ammoniac,

— remplacement de l'eau d'essai évaporée, le cas échéant,

— nombre de moucherons mâles et femelles émergés par récipient et par jour,

— nombre de larves non émergées sous la forme de moucherons par récipient,

— poids sec individuel moyen des larves par récipient, et par stade larvaire, s'il y a lieu,

— pourcentage d'émergence par expérience identique et concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucherons mâles et femelles),

— vitesse de développement moyenne des moucherons totalement émergés par expérience identique et concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucherons mâles et femelles),

— estimation des effets toxiques observés, par exemple CE_x (et intervalles de confiance associés), CSEO et/ou CMEO, et méthodes statistiques employées pour les déterminer,

— analyse des résultats, y compris les répercussions sur les résultats d'un écart éventuel à la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R. *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼**M4**

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., and Kirby R.S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations, n° 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Méthode d'essai C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre.

(15) Suedel B.C. and J.H. Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C. and C. Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491.

(19) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(20) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(21) Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.

(22) Christensen E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.

(24) Slob W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai:

Le **sédiment reconstitué**, ou artificiel ou synthétique, désigne le mélange de matériaux utilisés pour reproduire au mieux les composants physiques d'un sédiment naturel.

L'**eau sus-jacente** est l'eau surmontant le sédiment dans le récipient expérimental.

L'**eau interstitielle**, ou l'eau des pores, se réfère à l'eau qui occupe les vides laissés entre le sédiment et les particules de sol.

Le **sédiment dopé** est un sédiment auquel on a ajouté la substance d'essai.

Une **substance d'essai** est toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M4

Appendice 2

Recommandations pour la culture de *Chironomus riparius*

1. Les larves de *Chironomus* peuvent être élevées dans des cristallisoirs ou de grands récipients. Du sable quartzique fin est déposé en couche mince (environ 5 à 10 mm d'épaisseur) sur le fond du récipient. Le Kieselguhr (par exemple l'art. 8117 de Merck) convient aussi comme substrat (une couche encore plus mince de quelques millimètres à peine suffit). Une eau de qualité appropriée, profonde de plusieurs centimètres, vient ensuite recouvrir le substrat. En cas d'évaporation, le niveau d'eau doit toujours être ramené à sa hauteur initiale, afin de prévenir toute dessiccation. L'eau peut être remplacée, si nécessaire. Une légère aération est fournie. Les récipients d'élevage des larves doivent être placés dans des cages appropriées, afin d'empêcher la fuite des adultes émergeant. La cage sera suffisamment grande pour permettre aux adultes émergés d'essaimer, sans quoi la copulation risque de ne pas avoir lieu (dimensions minimales: 30 × 30 × 30 cm).

2. Les cages doivent être gardées à température ambiante, ou à 20 ± 2 °C si elles sont installées dans une chambre à ambiance constante, avec une photopériode de 16 heures de lumière (intensité: environ 1 000 lux) et 8 heures d'obscurité. Une humidité relative de l'air inférieure à 60 % serait susceptible d'empêcher la reproduction.

Eau de dilution

3. Toute eau naturelle ou reconstituée appropriée peut être utilisée. L'eau d'un puits, de l'eau du robinet déchlorée et un milieu artificiel (Elendt «M4» ou «M7», voir ci-après) sont souvent utilisés. L'eau doit être aérée avant emploi. Si nécessaire, on peut renouveler l'eau de culture en versant ou en siphonnant soigneusement l'eau usée des récipients expérimentaux, sans détruire les tubes des larves.

Alimentation des larves

4. Les larves de *Chironomus* reçoivent des paillettes pour poissons (Tetra-Min®, TetraPhyll® ou une autre marque déposée équivalente), à raison d'environ 250 mg par récipient et par jour. Cette nourriture peut être administrée sous la forme d'une poudre moulue à sec ou d'une suspension dans l'eau: 1,0 g de paillettes ajoutées à 20 ml d'eau de dilution et agitées de façon à obtenir un mélange homogène. Cette préparation peut être administrée à raison d'environ 5 ml par récipient et par jour (agiter avant emploi). Les larves plus âgées peuvent en recevoir plus.

5. La nourriture est ajustée en fonction de la qualité de l'eau. Si le milieu de culture devient trouble, il convient de réduire la ration. Les quantités de nourriture données sont soigneusement notées. Un manque de nourriture fera émigrer les larves vers la colonne d'eau, tandis qu'un excès de nourriture intensifiera l'activité microbienne et abaissera la concentration d'oxygène. Ces deux conditions sont susceptibles de ralentir la croissance des organismes.

6. Certaines cellules d'algues vertes (*Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*) peuvent aussi être ajoutées lors de la préparation de nouveaux récipients de culture.

Alimentation des adultes émergents

7. Certains expérimentateurs ont suggéré de nourrir les adultes émergés au moyen d'un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucrose saturée.

▼M4

Émergence

8. À 20 ± 2 °C, les adultes commencent à émerger des récipients d'élevage des larves après environ 13 à 15 jours. Il est facile de distinguer les mâles d'après leurs antennes plumeuses.

Amas d'œufs

9. Dès que des adultes sont présents dans la cage d'élevage, il faut vérifier trois fois par semaine, dans tous les récipients d'élevage de larves, si des amas d'œufs gélatineux n'ont pas été déposés. Le cas échéant, les amas d'œufs doivent être soigneusement enlevés et transférés dans un petit récipient contenant un échantillon de l'eau d'élevage. Les amas d'œufs servent à préparer un nouveau récipient de culture (2 à 4 amas d'œufs par récipient, par exemple) ou à pratiquer des essais de toxicité.

10. Les larves au premier stade devraient éclore après 2-3 jours.

Préparation de nouveaux récipients de culture

11. Une fois que les cultures ont été lancées, il devrait être possible de préparer un nouveau récipient de culture de larves, une fois par semaine ou moins souvent, suivant les besoins de l'essai, et de retirer les récipients plus anciens après que les moucherons adultes ont émergé. Ce système permet d'obtenir régulièrement un contingent d'adultes, avec une organisation minimale.

Préparation des solutions d'essai «M4» et «M7»

12. Elendt (1990) a décrit le milieu «M4». Le milieu «M7» est préparé comme le milieu «M4», sauf pour les substances reprises au tableau 1, dont les concentrations sont quatre fois plus faibles dans le milieu «M7» que dans le milieu «M4». Une publication sur le milieu «M7» est en préparation (Elendt, communication personnelle). La solution d'essai ne doit pas être préparée selon les instructions d'Elendt et Bias (1990), car les concentrations de $NaSiO_35H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 et K_2HPO_4 indiquées pour la préparation des solutions mères ne conviennent pas.

Préparation du milieu «M7»

13. Chaque solution mère (I) est préparée séparément et une solution mère combinée (II) est préparée à partir de ces solutions mères (I) (voir tableau 1). Cinquante millilitres de la solution mère combinée (II) additionnés de la quantité de chaque solution mère de macronutriments indiquée au tableau 2 sont amenés à 1 litre avec de l'eau désionisée pour préparer le milieu «M7». On prépare une solution mère de vitamines en ajoutant trois vitamines à de l'eau désionisée, comme indiqué au tableau 3 et on verse 0,1 ml de la solution mère combinée de vitamines au milieu «M7» final, peu avant l'emploi (la solution mère de vitamines est stockée congelée par petites aliquotes). Le milieu est aéré et stabilisé.

BIBLIOGRAPHIE:

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

Tableau 1

Solutions mères d'éléments en traces pour les milieux M4 et M7

Solutions mères (I)	Quantité (mg) pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée	Pour préparer la solution mère combinée (II): mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions mères (I) et compléter à 1 litre avec de l'eau désionisée		Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Ces substances sont dosées différemment en M4 et M7, comme indiqué plus haut.
(2) Ces solutions sont préparées séparément, puis mélangées et autoclavées immédiatement après.

Tableau 2

Solutions mères de macronutriments pour les milieux M4 et M7

	Quantité (mg) pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée	Quantités de solutions mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions expérimentales M4 et M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tableau 3

Solution mère de vitamines pour les milieux M4 et M7. Les trois solutions de vitamines seront mélangées de façon à ne former qu'une solution mère de vitamines

	Quantité pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantité de solution mère de vitamines ajoutée pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions d'essai M4 et M7 (mg/l)
Hydrochlorure de thiamine	750	0,1	0,075
Cyanocobalamine (B12)	10	0,1	0,0010
Biotine	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAPHIE:

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Appendice 3

PRÉPARATION DU SÉDIMENT RECONSTITUÉ

Composition du sédiment

Le sédiment sera reconstitué comme suit:

Ingrédient	Caractéristiques	% du sédiment poids sec
Tourbe	Tourbe de sphaigne, pH aussi proche que possible de 5,5-6,0, pas de résidus de plantes visibles, finement broyée, particules (≤ 1 mm) et séchée à l'air	4 - 5
Sable quartzique	Dimension des particules: > 50 % des particules doivent mesurer entre 50 et 200 µm	75 - 76
Argile kaolinique	Taux de kaolinite ≥ 30 %	20
Carbone organique	Ajusté par l'addition de tourbe et de sable	2 (± 0,5)
Carbonate de calcium	$CaCO_3$, pulvérisé, chimiquement pur	0,05 - 0,1
Eau	Conductivité ≤ 10 µS/cm	30 - 50

Préparation

La tourbe est séchée à l'air et broyée en poudre fine. Une suspension de la quantité requise de poudre de tourbe dans de l'eau désionisée est préparée à l'aide d'un homogénéisateur à haute performance. Le pH de cette suspension est ajusté à 5,5 ± 0,5 avec du $CaCO_3$. La suspension est conditionnée durant au moins deux jours en l'agitant doucement à 20 ± 2 °C, afin de stabiliser le pH et d'établir une flore microbienne stable. Le pH est vérifié à nouveau; il devrait atteindre 6,0 ± 0,5. Ensuite la suspension de tourbe est mélangée avec les autres ingrédients (sable et argile kaolinique) et de l'eau désionisée pour former un sédiment homogène avec une teneur en eau de 30 à 50 % du poids sec du sédiment. Le pH du mélange final est encore mesuré et ajusté à 6,5-7,5 avec du $CaCO_3$, si nécessaire. On prélève des échantillons de sédiment afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Ensuite, avant d'utiliser le sédiment reconstitué dans l'essai de toxicité sur les chironomes, il est recommandé de le conditionner durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui seront appliquées durant l'essai subséquent.

Stockage

Les ingrédients secs destinés à la préparation du sédiment artificiel peuvent être entreposés dans un endroit sec et frais, à température ambiante. Le sédiment reconstitué (humide) ne doit pas être stocké avant son utilisation dans l'essai. Il doit être utilisé immédiatement après la période de conditionnement de sept jours qui achève sa préparation.

BIBLIOGRAPHIE:

Chapitre C.8 de la présente annexe: Toxicité pour les vers de terre.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼M4

Appendice 4

Caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable

Substance	Concentrations
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Dureté en $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Totalité des pesticides organophosphorés	< 50 ng/l
Totalité des pesticides organochlorés et des biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

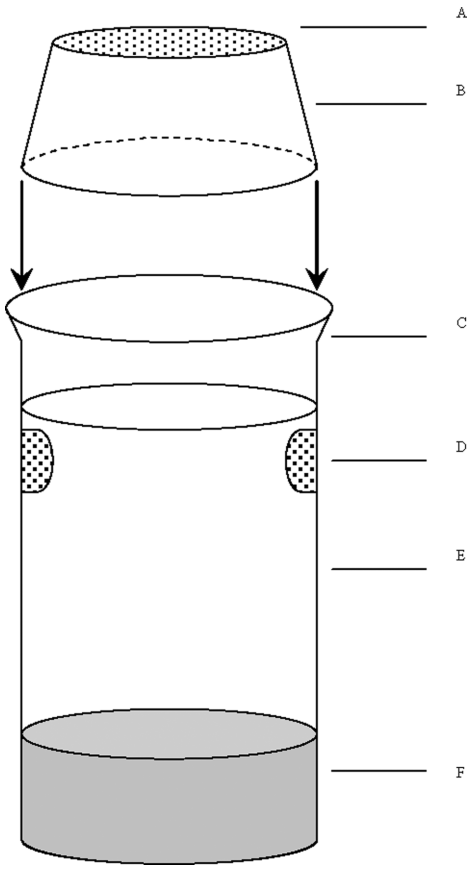
(*) S'il risque d'y avoir une interaction entre les ions qui provoquent la dureté de l'eau et la substance d'essai, il convient d'utiliser une eau moins dure (auquel cas, le milieu Elendt M4 ne pourra pas être utilisé).

▼M4

Appendice 5

Conseils pour suivre l'émergence des larves de chironomes

Les béchers expérimentaux sont coiffés par des pièges à émergence, du 20e jour jusqu'à la fin de l'essai. Le schéma ci-dessous illustre un exemple de piège:



A: toile de nylon.

B: coupelles en plastique renversées.

C: bécher expérimental sans bec.

D: ouvertures recouvertes de toile par où s'effectuent les échanges.

E: eau.

F: sédiment.

▼M4

C. 28. ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES CHIRONOMES DANS UN SYSTÈME EAU CHARGÉE-SÉDIMENT

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 219 de l'OCDE (2004) pour les essais de produits chimiques. Elles est conçue pour évaluer les effets d'une exposition prolongée à des substances chimiques sur des larves de *Chironomus* sp., un diptère vivant dans les sédiments d'eau douce. Elle s'inspire principalement de la ligne directrice du BBA, dans laquelle l'exposition s'effectue à l'aide d'un système expérimental sédiment-eau, composé de sol artificiel et d'une colonne d'eau (1). Elle tient compte également des protocoles d'essais de toxicité sur *Chironomus riparius* et *Chironomus tentans*, mis au point en Europe et en Amérique du Nord (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) et soumis à des essais circulaires (1) (6) (9). D'autres espèces de chironomes bien documentées peuvent aussi être employées, par exemple *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Le scénario d'exposition appliqué dans la présente méthode d'essai consiste à introduire la substance d'essai dans l'eau. La sélection du scénario d'exposition dépend de la finalité de l'essai. Le scénario d'exposition qui consiste à doper la colonne d'eau, vise à simuler des pertes par dispersion lors de l'épandage de pesticides et couvre le pic de concentrations initial dans l'eau interstitielle. Il s'applique également à d'autres types d'exposition (notamment des fuites de produits chimiques), à l'exclusion des processus d'accumulation d'une durée supérieure à celle de l'essai.

3. En général, les substances à tester sur des organismes vivant dans les sédiments subsistent longtemps dans ce compartiment. Ces organismes peuvent être exposés par diverses voies. L'importance relative de chaque voie d'exposition et le temps pris par chacune d'entre elles pour contribuer à l'effet toxique global dépendent des propriétés physico-chimiques de chaque substance chimique. Dans le cas des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un log K_{oe} > 5) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, l'ingestion d'aliments contaminés peut constituer une voie d'exposition non négligeable. Afin de ne pas sous-estimer la toxicité des substances fortement lipophiles, on envisagera d'ajouter de la nourriture au sédiment avant l'application de la substance d'essai. La présente méthode d'essai est axée sur l'exposition à long terme, de façon à couvrir toutes les voies d'exposition potentielles. L'essai dure de 20 à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et de 28 à 65 jours pour *C. tentans*. Si l'on a besoin de données à court terme pour un motif précis, par exemple pour étudier les effets de substances chimiques instables, des récipients supplémentaires, ajoutés au dispositif expérimental, peuvent être retirés après 10 jours d'essai.

4. Les effets mesurés sont le nombre total d'adultes émergés et temps écoulé jusqu'à l'émergence. Si l'on a besoin de données à court terme, il est recommandé de ne mesurer la survie et la croissance des larves qu'après 10 jours, en ajoutant le nombre nécessaire de récipients supplémentaires.

5. L'utilisation d'un sédiment reconstitué est recommandée en raison de ses avantages par rapport aux sédiments naturels:

   — la variabilité expérimentale est réduite parce que le sédiment reconstitué forme une «matrice normalisée» reproductible; en outre, il n'est plus nécessaire de trouver des sources de sédiments non contaminés et non pollués,

   — les essais peuvent être effectués à n'importe quel moment de l'année, la variabilité saisonnière n'intervenant plus et il n'est pas nécessaire de traiter préalablement le sédiment afin d'éliminer la faune indigène; l'utilisation de sédiments reconstitués diminue aussi le coût associé à la collecte sur le terrain d'une quantité suffisante de sédiments pour les essais systématiques,

▼M4

— les sédiments reconstitués permettent de comparer la toxicité des substances et de les classer en conséquence; les essais pratiqués sur des sédiments naturels et artificiels ont fourni des données de toxicité comparables pour plusieurs substances chimiques (2).

6. L'appendice 1 contient les définitions applicables à la présente méthode d'essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des chironomes au premier stade larvaire sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dans un système sédiment-eau. L'essai débute par l'introduction de larves au premier stade dans les béchers expérimentaux contenant le système sédiment-eau et l'ajout de la substance d'essai à l'eau. L'émergence des chironomes et leur vitesse de développement sont mesurées à la fin de l'essai. La survie des larves et leur poids peuvent aussi être mesurés après 10 jours si nécessaire (en ajoutant le nombre d'expériences identiques requis). Ces données sont analysées, soit à l'aide d'un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x % de l'émergence ou de la survie des larves ou de leur croissance (par exemple CE_{15}, CE_{50}, etc.), soit par la vérification d'une hypothèse statistique afin de déterminer une CSEO/CMEO. Cette dernière requiert une comparaison entre les valeurs efficaces et les valeurs des témoins à l'aide de tests statistiques.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

8. Il faudrait connaître l'hydrosolubilité de la substance d'essai, sa pression de vapeur, son coefficient de partage mesuré ou calculé dans le sédiment et sa stabilité dans l'eau et le sédiment. Il convient de disposer d'une méthode d'analyse fiable pour quantifier la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, l'eau interstitielle et le sédiment, et pour laquelle la précision et le seuil de détection sont connus. Il est également utile de connaître la formule structurale et la pureté de la substance d'essai ainsi que son devenir chimique (par exemple dissipation, dégradation abiotique et biotique, etc.). Des indications complémentaires pour tester les substances se prêtant difficilement à l'essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont fournies à la référence (12).

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

9. Des substances de référence pourront être testées régulièrement pour démontrer la fiabilité du protocole et des conditions de l'essai. Voici quelques exemples de toxiques de référence ayant fait leurs preuves dans des essais circulaires et des études de validation: lindane, trifluraline, pentachlorophénol, chlorure de cadmium et chlorure de potassium (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. Pour que l'essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies:

— l'émergence chez les témoins doit atteindre au moins 70 % à la fin de l'essai (1) (6),

— s'agissant de *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, l'émergence au stade adulte dans les récipients témoins doit avoir lieu entre 12 et 23 jours après leur introduction dans les récipients expérimentaux; *C. tentans* nécessite une période de 20 à 65 jours,

— à la fin de l'essai, le pH et la concentration d'oxygène dissous seront mesurés dans chaque récipient. La concentration d'oxygène devrait atteindre au moins 60 % de la valeur de saturation en air (VSA) à la température appliquée et le pH de l'eau sus-jacente devrait être compris entre 6 et 9 dans tous les récipients expérimentaux,

▼M4

— la température de l'eau ne devrait pas varier de plus de ± 1,0 °C et pourrait être contrôlée grâce à une chambre isotherme, auquel cas la température de la chambre devra être confirmée à intervalles appropriés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Récipients expérimentaux

11. L'essai se déroule dans des béchers en verre de 600 ml, mesurant 8 cm de diamètre. D'autres récipients peuvent être utilisés à condition qu'ils permettent de garantir une profondeur adéquate d'eau et de sédiment. Le sédiment doit offrir une superficie de 2 à 3 cm^2 par larve. Le quotient de la profondeur de la couche de sédiment par la profondeur de la couche d'eau sus-jacente doit être égal à 1/4. Les récipients et les autres appareils qui entreront en contact avec le système d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte (par exemple du Téflon).

Sélection des espèces

12. *Chironomus riparius* est l'espèce qui convient le mieux. *Chironomus tentans* peut aussi être utilisé, mais il est plus difficile à manipuler et nécessite une période d'essai plus longue. *Chironomus yoshimatsui* convient également. La méthode de culture de *Chironomus riparius* est détaillée à l'appendice 2. D'autres documents décrivent les conditions de culture des autres espèces: *Chironomus tentans* (4) et *Chironomus yoshimatsui* (11). L'identification des espèces est à confirmer avant l'essai, mais n'est pas requise avant chaque essai si les organismes proviennent d'un élevage interne.

Sédiment

13. Il est préférable d'employer un sédiment reconstitué (également dénommé sédiment artificiel ou synthétique). Néanmoins, si l'on opte pour un sédiment naturel, il faudrait le caractériser, au moins quant au pH et à la teneur en carbone organique (la détermination d'autres paramètres, tels que le rapport C/N et la granulométrie est aussi recommandée), et s'assurer qu'il n'est pas contaminé et n'abrite pas d'autres organismes qui pourraient entrer en compétition avec les chironomes ou les consommer. Avant d'utiliser un sédiment naturel dans un essai de toxicité sur les chironomes, il est également recommandé de le maintenir durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui seront appliquées durant l'essai (conditionnement). Le sédiment reconstitué décrit ci-dessous, basé sur le sol artificiel utilisé dans la méthode d'essai C.8 est recommandé (14) (1) (15) (16):

a) 4-5 % (poids sec) de tourbe, avec un pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0; il est important d'utiliser une tourbe sous forme de poudre, finement broyée (dimension des particules ≤ 1 mm) et séchée uniquement à l'air;

b) 20 % (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %);

c) 75-76 % (poids sec) de sable quartzique (composé en majorité de sable fin, plus de 50 % des particules mesurant entre 50 et 200 μm);

d) ajouter de l'eau désionisée jusqu'à ce que la teneur en humidité du mélange final atteigne 30 à 50 %;

e) ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure ($CaCO_3$) pour ajuster le pH du mélange final de sédiments à 7,0 ± 0,5;

f) il convient d'obtenir 2 % (± 0,5 %) de carbone organique dans le mélange final en y ajoutant les quantités appropriées de tourbe et de sable, comme indiqué en a) et en c).

▼M4

14. Les sources de tourbe, d'argile kaolinique et de sable doivent être connues. On vérifiera que les composants du sédiment ne sont pas contaminés par des substances chimiques (par exemple des métaux lourds, des composés organochlorés, organophosphorés, etc.). Un exemple de préparation de sédiment reconstitué est décrit à l'appendice 3. Les composants peuvent aussi être mélangés à l'état sec, à condition de démontrer qu'après l'ajout de l'eau sus-jacente, les composants du sédiment ne se séparent pas (flottement de particules de tourbe, par exemple) et que la tourbe ou le sédiment sont suffisamment conditionnés.

Eau

15. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable selon les critères spécifiés aux appendices 2 et 4 convient à l'essai. Toute eau appropriée, naturelle (eau superficielle ou souterraine), reconstituée (voir appendice 2) ou eau du robinet déchlorée, est acceptable comme eau pour l'élevage et les essais si les chironomes y survivent sur toute la durée de l'élevage et de l'essai sans manifester de signes de stress. Au début de l'essai, le pH de l'eau d'essai se situera entre 6 et 9 et sa dureté totale ne dépassera pas 400 mg/l en $CaCO_3$. Néanmoins, si l'on suspecte une interaction entre les ions qui provoquent la dureté et la substance d'essai, il faudra utiliser une eau moins dure (et ne pas employer le milieu Elendt M4 dans ce cas). Le même type d'eau doit être utilisé tout au long de l'étude. Les caractéristiques de la qualité de l'eau énumérées à l'appendice 4 sont à mesurer au moins deux fois par an ou chaque fois que ses caractéristiques sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées.

Solutions mères – eau chargée

16. Les concentrations expérimentales sont calculées en fonction des concentrations dans la colonne d'eau recouvrant le sédiment. Les solutions d'essai sont généralement préparées aux concentrations choisies par dilution d'une solution mère. Il est préférable de préparer les solutions mères en dissolvant la substance d'essai dans le milieu d'essai. Dans certains cas, il sera nécessaire d'utiliser des solvants ou des dispersants pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Voici quelques exemples de solvants appropriés: acétone, éthanol, méthanol, éthylèneglycol, monoéthyléther, diméthyléther d'éthylèneglycol, diméthylformamide et triéthylèneglycol. Les dispersants qui peuvent être utilisés sont le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 % et l'HCO-40. La concentration de l'agent solubilisant dans le milieu d'essai final doit être minimale ($\leq$ 0,1 ml/l) et identique dans tous les traitements. L'agent solubilisant, s'il est utilisé, ne doit pas avoir d'effets significatifs sur la survie, ni d'effet nocif visible sur les larves de chironomes, et ce d'après l'observation des organismes du récipient témoin traité uniquement au solvant. Néanmoins, l'utilisation de ces substances est à éviter dans la mesure du possible.

CONCEPTION DE L'ESSAI

17. La conception de l'essai définit le nombre et l'espacement des concentrations expérimentales, le nombre de récipients à chaque concentration et le nombre de larves par récipient. La marche à suivre pour estimer une valeur de CE, la CSEO et effectuer un essai limite est décrite. L'analyse de régression est préférable à une approche par vérification d'hypothèses.

Conduite d'une analyse de régression

18. La concentration efficace (par exemple, CE_{15}, CE_{50}) et la gamme de concentrations dans laquelle l'effet de la substance d'essai est d'intérêt doivent être couvertes par les concentrations incluses dans l'essai. Généralement, l'exactitude, et plus particulièrement la validité, de l'estimation des concentrations efficaces (CE_x) s'accroissent lorsque la concentration efficace se situe dans la gamme des concentrations testées. Il faut éviter d'extrapoler

▼M4

des résultats très en dessous de la concentration efficace la plus faible ou au-dessus de la concentration maximale. Il est utile de conduire un essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur afin de délimiter la gamme des concentrations à appliquer (voir paragraphe 27).

19. S'il faut estimer la CE_x, au moins cinq concentrations et trois répétitions par concentration doivent être testées. En tout état de cause, il est recommandé de tester suffisamment de concentrations pour obtenir une bonne estimation du modèle. Le facteur séparant les concentrations ne doit pas excéder deux (sauf dans les cas où la courbe dose-effet présente une pente faible). Le nombre de répétitions par traitement peut être diminué si le nombre de concentrations expérimentales entraînant différents effets est augmenté. L'augmentation du nombre de répétitions ou la contraction des intervalles entre les concentrations expérimentales tend à réduire les intervalles de confiance pour l'essai. Le nombre de répétitions sera augmenté s'il y a lieu d'estimer le taux de survie et la croissance des larves après dix jours.

Procédure d'estimation d'une CSEO/CMEO

20. S'il faut estimer la CMEO ou la CSEO, il convient de tester cinq concentrations expérimentales et au moins quatre répétitions par concentration, le facteur séparant les concentrations n'excédant pas deux. Le nombre d'expériences identiques doit être tel qu'il fournit une puissance statistique permettant de détecter une différence de 20 % avec le témoin, au seuil de signification statistique de 5 % ($p = 0,05$). S'agissant de la vitesse de développement, une analyse de la variance (ANOVA) convient généralement, telle que le test de Dunnett ou le test de Williams (17) (18) (19) (20). S'agissant du taux d'émergence, le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haenszel peuvent être utilisés.

Essai limite

21. Si l'essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations n'a engendré aucun effet, un essai limite peut être conduit (une concentration expérimentale et un témoin). L'essai limite vise à montrer que la concentration toxique de la substance d'essai est supérieure à la concentration limite testée. Aucune concentration ne peut être recommandée pour cette méthode d'essai; cela est laissé à l'appréciation des instances réglementaires. Généralement, il est nécessaire de mener au moins six répétitions pour les organismes traités et les témoins. Il y a lieu de démontrer que la puissance statistique est suffisante pour révéler une différence de 20 % avec les témoins, au seuil de signification statistique de 5 % ($p = 0,05$). En ce qui concerne l'effet sur la vitesse de développement et sur le poids, le test t constitue une méthode statistique appropriée, si les données respectent les conditions exigées par ce test (normalité, variances homogènes). On pourra recourir au test t à variance inégale ou à un test non paramétrique, tel que le test de Wilcoxon-Mann-Whitney si ces conditions ne sont pas remplies. S'agissant du taux d'émergence, le test exact de Fisher est approprié.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition

Préparation du système eau chargée-sédiment

22. Une quantité appropriée de sédiment reconstitué (voir paragraphes 13-14 et appendice 3) est déposée dans les récipients expérimentaux, de façon à former une couche d'au moins 1,5 cm. La profondeur de l'eau versée sur ce sédiment atteindra 6 cm (voir paragraphe 15). Le ratio entre la profondeur du sédiment et la profondeur de l'eau n'excédera pas 1/4 et la couche de sédiment ne dépassera pas 3 cm. Le système sédiment-eau sera laissé sous aération légère pendant 7 jours avant l'ajout des organismes d'essai (voir paragraphe 14 et appendice 3). Afin d'éviter la séparation des constituants du sédiment et la resuspension des particules fines durant le remplissage de la colonne d'eau, on peut recouvrir le sédiment d'un disque en plastique et retirer le disque juste après le remplissage. D'autres dispositifs conviennent également.

▼M4

23. Les récipients expérimentaux doivent être couverts (par des plaques de verre, par exemple). On prendra soin de remplacer les volumes d'eau évaporée durant l'étude, le cas échéant, et ce avec de l'eau distillée ou désionisée afin d'empêcher l'accumulation de sels.

Introduction des organismes d'essai

24. Quatre à cinq jours avant d'introduire les organismes d'essai dans les récipients, des amas d'œufs sont prélevés dans les cultures et déposés dans de petits flacons contenant du milieu de culture. Un milieu plus ancien issu de la culture mère tout comme un milieu fraîchement préparé peuvent être utilisés. Si ce dernier est utilisé, on ajoutera une petite quantité de nourriture, par exemple des algues vertes et/ou quelques gouttes du filtrat d'une suspension de paillettes pour poissons finement broyées, au milieu de culture (voir appendice 2). Seuls des amas d'œufs fraîchement pondus peuvent être utilisés. Normalement, les larves commencent à éclore quelques jours après la ponte (2 à 3 jours pour *Chironomus riparius* à 20 °C et 1 à 4 jours pour *Chironomus tentans* à 23 °C et *Chironomus yoshimatsui* à 25 °C) et le développement des larves se déroule en quatre stades, dont chacun dure 4 à 8 jours. Cet essai se pratique au premier stade larvaire (2-3 ou 1-4 jours après l'éclosion). Il est possible de vérifier le stade de développement des moucherons d'après la largeur de la capsule céphalique (6).

25. Vingt larves au premier stade, choisies au hasard, sont déposées dans chaque récipient contenant le sédiment chargé et l'eau, à l'aide d'une pipette émoussée. L'aération de l'eau doit être interrompue dès qu'on introduit les larves dans les récipients expérimentaux, et ce durant 24 heures après l'ajout des larves (voir paragraphes 24 et 32). Selon le protocole expérimental suivi (voir paragraphes 19 et 20), le nombre de larves utilisées par concentration s'élève au moins à 60 pour l'estimation d'une valeur de concentration efficace (CE) et à 80 pour la détermination de la CSEO.

26. Vingt-quatre heures après l'introduction des larves dans les récipients expérimentaux, la substance d'essai est ajoutée à la colonne d'eau sus-jacente et une légère aération est à nouveau dispensée. De petits volumes de la solution contenant la substance d'essai sont injectés en dessous de la surface de la colonne d'eau à l'aide d'une pipette. Ensuite, il convient de mélanger l'eau sus-jacente en prenant soin de ne pas remuer le sédiment.

Concentrations d'essai

27. Il peut être utile de conduire un essai de détermination de l'ordre de grandeur pour délimiter la gamme de concentrations à appliquer dans l'essai proprement dit. À cet effet, on utilise une série de concentrations largement espacées de la substance d'essai. Afin de reproduire la même densité de surface par chironome que dans l'essai proprement dit, les chironomes sont exposés à chaque concentration de la substance d'essai durant une période permettant d'estimer les concentrations expérimentales appropriées et aucune expérience identique n'est nécessaire.

28. Les concentrations expérimentales pour l'essai définitif sont choisies en fonction des résultats de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur. Au moins cinq concentrations doivent être appliquées et sélectionnées comme indiqué aux paragraphes 18 à 20.

Témoins

29. L'essai comportera le nombre nécessaire de récipients témoins pourvus du sédiment mais exempts de toute substance d'essai (voir paragraphes 19-20). Si la substance d'essai a été appliquée à l'aide d'un solvant (voir paragraphe 16), il convient d'ajouter un témoin dont le sédiment contient également le solvant.

▼M4

Système expérimental

30. Des systèmes statiques sont utilisés. Des systèmes semi-statiques ou à écoulement continu avec renouvellement intermittent ou continu de l'eau sus-jacente peuvent être utilisés dans des cas exceptionnels, par exemple si les spécifications de la qualité de l'eau deviennent inappropriées pour l'organisme d'expérience ou affectent l'équilibre chimique (si, par exemple, la concentration d'oxygène dissous devient trop basse, la concentration des excréta augmente de façon trop importante ou si des minéraux lessivés à partir du sédiment affectent le pH et/ou la dureté de l'eau). Néanmoins, d'autres méthodes d'amélioration de la qualité de l'eau sus-jacente, telles que l'aération, seront normalement suffisantes et préférables.

Alimentation

31. Les larves ont besoin d'être nourries, de préférence quotidiennement ou au moins trois fois par semaine. Durant les dix premiers jours, chaque jeune larve recevra quotidiennement 0,25 à 0,5 mg (0,35-0,5 mg pour *C. yoshimatsui*) de nourriture pour poissons (suspendue dans l'eau ou finement broyée, par exemple TetraMin ou TetraPhyll; voir les détails à l'appendice 2). Il peut être nécessaire d'augmenter légèrement cette quantité pour les larves plus âgées: 0,5-1 mg par larve et par jour devrait suffire pour le reste de l'essai. On diminuera la ration alimentaire de tous les organismes traités et témoins si des champignons se développent ou si des organismes témoins meurent. Si la croissance fongique s'avère impossible à enrayer, l'essai doit être renouvelé. Si l'essai porte sur des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un log K_{oe} > 5) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, la quantité de nourriture nécessaire à la survie et à la croissance naturelle des organismes peut être incorporée au sédiment reconstitué avant la période de stabilisation. Dans ce cas, la nourriture pour poissons est remplacée par une ration végétale, par exemple 0,5 % (poids sec) de feuilles finement broyées d'ortie (*Urtica dioica*), de mûrier (*Morus alba*), de trèfle blanc ou rampant (*Trifolium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*) ou d'un autre matériau végétal (*Cerophyl* ou alpha-cellulose).

Conditions d'incubation

32. L'eau sus-jacente est soumise à une légère aération, mise en œuvre de préférence 24 heures après l'introduction des larves et maintenue jusqu'à la fin de l'essai (il faut veiller à ce que la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 60 % de la valeur de saturation en air). L'air est insufflé à travers une pipette Pasteur en verre fixée 2 à 3 cm au-dessus de la couche de sédiment (une ou quelques bulles par seconde). Si la substance d'essai est volatile, il faudra éventuellement supprimer l'aération.

33. L'essai est mené à température constante (20 °C ± 2 °C). Pour *C. tentans* et *C. yoshimatsui*, les températures recommandées s'élèvent respectivement à 23 °C et 25 °C (± 2 °C). La photopériode est de 16 heures et l'éclairement compris entre 500 et 1 000 lux.

Durée de l'exposition

34. L'exposition débute avec l'introduction des larves dans les récipients traités et témoins. La durée maximale d'exposition atteint 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et 65 jours pour *C. tentans*. Si les moucherons émergent plus tôt, l'essai peut s'achever au moins cinq jours après l'émergence du dernier adulte témoin.

OBSERVATIONS

Émergence

35. La durée du développement et le nombre total de moucherons mâles et femelles adultes totalement émergés sont à déterminer. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses.

▼M4

36. Au moins trois fois par semaine, on vérifiera que les organismes des récipients d'essai ne manifestent aucun comportement anormal (sortie du sédiment, nage inhabituelle, par exemple) par rapport aux témoins. Chaque jour, durant la période supposée de l'émergence, il faut compter le nombre de moucherons émergés et consigner le sexe et le nombre de moucherons complètement émergés. Une fois identifiés, les moucherons sont retirés des récipients. Tout amas d'œufs déposé avant la fin de l'essai doit être recensé puis enlevé afin d'empêcher la réintroduction de larves dans le sédiment. Le nombre de pupes visibles n'ayant pas réussi à émerger est aussi enregistré. Des indications sur la façon de mesurer l'émergence sont données à l'appendice 5.

Croissance et survie

37. S'il faut fournir des données sur la survie et la croissance des larves après 10 jours, des récipients expérimentaux supplémentaires seront inclus dès le début de l'essai, pour pouvoir être utilisés ultérieurement. Le sédiment de ces récipients supplémentaires est tamisé à travers des mailles de 250 μm pour retenir les larves. La mort est déterminée par deux critères: l'immobilité et l'absence de réaction à un stimulus mécanique. Les larves non récupérées doivent aussi être comptabilisées parmi les mortes (les larves qui sont mortes au début de l'essai ont pu être dégradées par des microbes). Après avoir déterminé le poids sec (sans cendres) des larves survivantes par récipient expérimental, on calcule le poids sec individuel moyen par récipient. Il est utile d'établir à quel stade se trouvent les larves survivantes, et ce d'après la largeur de la capsule céphalique de chaque individu.

Mesures analytiques

Concentration de la substance d'essai

38. Il est recommandé d'analyser, au minimum, des échantillons de l'eau sus-jacente, de l'eau interstitielle, et du sédiment, au début (de préférence une heure après l'application de la substance d'essai) et à la fin de l'essai, et ce pour la concentration la plus élevée et pour une concentration plus faible. La concentration de la substance d'essai nous renseigne sur le comportement et la répartition de la substance d'essai dans le système eau-sédiment. Le prélèvement d'échantillons de sédiment au début de l'essai risque de perturber le système d'essai (enlèvement de larves, par exemple), il faut donc inclure des récipients expérimentaux supplémentaires pour effectuer des déterminations analytiques au début de l'essai et, s'il y a lieu, au cours de l'essai (voir paragraphe 39). Il n'est pas forcément nécessaire d'analyser le sédiment si la répartition de la substance d'essai entre l'eau et le sédiment a été clairement déterminée par une étude eau/sédiment menée dans des conditions comparables (par exemple, quotient sédiment/eau, type d'application, teneur en carbone organique du sédiment).

39. Lorsqu'on effectue des mesures intermédiaires (par exemple au septième jour) et si l'analyse requiert des échantillons volumineux qui ne peuvent être prélevés des récipients sans influencer le système expérimental, les analyses seront pratiquées sur des échantillons provenant de récipients expérimentaux supplémentaires traités de la même façon (y compris par la présence des organismes d'essai), mais non utilisés pour les observations biologiques.

40. Pour isoler l'eau interstitielle, on recommande de centrifuger des échantillons à 10 000 g et à 4 °C durant 30 minutes. Cependant, s'il est démontré que la substance d'essai ne s'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Avec des échantillons trop petits, il arrive que les concentrations dans l'eau interstitielle soient impossibles à analyser.

▼M4

Paramètres physico-chimiques

41. Le pH, l'oxygène dissous dans l'eau d'essai et la température des récipients expérimentaux doivent être mesurés de façon appropriée (voir paragraphe 10). La dureté de l'eau et la teneur en ammoniac sont mesurées dans les récipients témoins et dans un récipient traité à la concentration la plus élevée, au début et à la fin de l'essai.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

42. Cet essai vise à déterminer l'effet de la substance d'essai sur la vitesse de développement et le nombre total de moucherons mâles et femelles totalement émergés ou, dans le cas de l'essai de 10 jours, les effets sur la survie et le poids des larves. Si rien n'indique que les deux sexes présentent des différences statistiques de sensibilité, les résultats obtenus sur les mâles et les femelles peuvent être regroupés pour l'analyse statistique. Les différences de sensibilité entre les sexes peuvent être appréciées statistiquement par un test (de tableau) a χ^2 - r x 2, par exemple. La survie des larves et le poids sec individuel moyen par récipient doivent être déterminés après dix jours, le cas échéant.

43. Il est préférable de calculer les concentrations efficaces, exprimées en concentrations dans l'eau sus-jacente, en fonction des concentrations mesurées au début de l'essai (voir paragraphe 38).

44. Pour estimer ponctuellement la CE_{50} ou une quelconque CE_x, les statistiques par récipient peuvent être utilisées comme des expériences identiques proprement dites. Lorsqu'on calcule un intervalle de confiance pour une quelconque CE_x, il faut tenir compte de la variabilité entre les récipients ou montrer que celle-ci est négligeable. Si le modèle est ajusté par la méthode des moindres carrés, il convient d'appliquer une transformation des données pour les statistiques par récipient afin d'accroître l'homogénéité de la variance. Toutefois, les valeurs de la CE_x sont à calculer après que les résultats ont été «retransformés» de façon à recouvrer leur valeur originale.

45. Si l'analyse statistique vise à déterminer la CSEO/CMEO par la vérification d'hypothèses, la variabilité entre les récipients doit être prise en compte, par exemple à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) «emboîtée». Par contre, des tests plus robustes (21) peuvent être utilisés au cas où les hypothèses habituelles de l'analyse de la variance ne se vérifient pas.

Taux d'émergence

46. Le taux d'émergence donne une réponse par tout ou rien et peut être analysé par le test de Cochran-Armitage appliqué de façon régressive si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Dans le cas contraire, un test exact de Fisher ou un test de Mantel-Haenszel avec des valeurs de p corrigées selon Bonferroni-Holm peuvent être employés. S'il s'avère que la variabilité entre expériences identiques à la même concentration est supérieure à ce qu'une distribution binomiale indiquerait (variation souvent qualifiée d'«extra-binomiale»), on appliquera un test plus robuste (Cochran-Armitage ou test exact de Fisher) comme proposé à la référence (21).

47. La somme des moucherons émergés par récipient, n_e, est déterminée et divisée par le nombre de larves introduites, n_a:

$$TE = \frac{n_e}{n_a}$$

▼**M4**

où:

TE = taux d'émergence

n_e = nombre de moucherons émergés par récipient

n_e = nombre de larves introduites par récipient

48. Une variante plus appropriée aux échantillons de grande taille, lorsque la variance est extra-binomiale, consiste à traiter le taux d'émergence comme une réponse continue et à appliquer une méthode telle que le test de Williams, si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les résultats du taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Le test de Dunnett convient dans le cas où la relation ne s'avère pas monotone. Ici, on considère qu'un échantillon est de grande taille lorsque le nombre de moucherons émergés et le nombre de chironomes non émergés dépassent chacun cinq, par récipient d'essai.

49. Pour appliquer l'analyse de la variance (ANOVA), il convient d'appliquer aux valeurs de TE une transformation «arcsinus-racine carrée» ou «Freeman-Tukey» afin d'obtenir une distribution proche de la normale et d'égaliser les variances. Le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction de Bonferroni) ou le test de Mantel-Haenszel peuvent être employés lorsqu'on utilise des fréquences absolues. La transformation arcsinus-racine carrée consiste à calculer l'inverse du sinus ($sinus^{-1}$) de la racine carrée du TE.

50. Pour les taux d'émergence, les valeurs de la CE_x sont calculées par une analyse de régression [ou par probit (22), logit, Weibull, des logiciels commerciaux appropriés, etc.]. Si l'analyse de la régression échoue (par exemple, lorsqu'il y a moins de deux réponses partielles), on fait appel à d'autres méthodes non paramétriques telles que la moyenne mobile ou une simple interpolation.

Vitesse de développement

51. La période moyenne de développement représente le temps moyen écoulé entre l'introduction des larves (jour 0 de l'essai) et l'émergence de la cohorte expérimentale de moucherons (pour calculer la période réelle de développement, il faut tenir compte de l'âge des larves au moment de l'introduction). La vitesse de développement est l'inverse de la période de développement (unité: 1/jour) et représente la partie du développement larvaire qui s'effectue par jour. Pour évaluer la toxicité dans les sédiments, il est préférable de choisir la vitesse de développement car sa variance est plus faible et ses valeurs sont plus homogènes et plus proches d'une distribution normale, en comparaison avec la période de développement. C'est pourquoi les tests paramétriques puissants conviennent mieux à la vitesse de développement qu'à la période de développement. Si la vitesse de développement est traitée comme une réponse continue, les valeurs de la CE_x peuvent être estimées par l'analyse de la régression, par exemple (23), (24).

52. Pour les tests statistiques suivants, le nombre de moucherons observés le jour x sont considérés comme ayant émergé au milieu de l'intervalle de temps compris entre le jour x et le jour x - 1 (1 = longueur de l'intervalle d'observation, habituellement 1 jour). La vitesse de développement moyenne par récipient (x) est calculée comme suit:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

où:

$\bar{x}$: vitesse de développement moyenne par récipient

i: indice de l'intervalle d'observation

m: nombre maximal d'intervalles d'observation

▼M4

f_i: nombre de moucherons émergés durant l'intervalle d'observation i

n_e: nombre total de moucherons émergés à la fin de l'expérience ($=\sum f_i$)

x_i: vitesse de développement des moucherons émergés durant l'intervalle i

$$x_i = 1/\left(\text{jour}_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

où:

jour_i: jour d'observation (compté à partir de l'application)

l_i: durée de l'intervalle d'observation i (exprimée en jours, habituellement 1 jour)

Rapport d'essai

53. Le rapport d'essai doit fournir au moins les informations suivantes:

Substance d'essai:

— état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (hydrosolubilité, pression de vapeur, coefficient de partage dans le sol (ou dans le sédiment s'il est connu), stabilité dans l'eau, etc.),

— identification chimique (nom courant, nom chimique, formule structurale, numéro CAS, etc.), pureté et méthode d'analyse pour la quantification de la substance d'essai.

Espèce d'essai:

— animal d'essai utilisé: espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage,

— informations sur la manipulation des amas d'œufs et des larves,

— âge des animaux d'expérience au moment où ils ont été déposés dans les récipients d'essai.

Conditions expérimentales:

— sédiment utilisé, c'est-à-dire naturel ou reconstitué,

— pour les sédiments naturels: localisation et description du site de prélèvement et notamment, si possible, son histoire en matière de contamination; caractéristiques: pH, teneur en carbone organique, quotient C/N et granulométrie, le cas échéant,

— préparation du sédiment reconstitué: ingrédients et caractéristiques (teneur en carbone organique, pH, humidité, etc. au début de l'essai),

— préparation de l'eau d'essai (si l'eau est reconstituée) et caractéristiques (concentration d'oxygène, pH, conductivité, dureté, etc. au début de l'essai),

— profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente,

— volume de l'eau sus-jacente et de l'eau interstitielle; poids du sédiment humide avec et sans eau interstitielle,

— récipients expérimentaux (matériau et dimension),

— méthode de préparation des solutions mères et des concentrations expérimentales,

▼M4

— application de la substance d'essai: concentrations expérimentales utilisées, nombre d'expériences identiques et utilisation d'un solvant, le cas échéant,

— conditions d'incubation: température, cycle et intensité de lumière, aération (fréquence et intensité),

— informations détaillées sur la nourriture: type de nourriture, préparation, quantité et régime d'administration.

Résultats:

— concentrations d'essai nominales, concentrations d'essai mesurées et résultats de toutes les analyses conduites pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans le récipient expérimental,

— qualité de l'eau dans les récipients expérimentaux: pH, température, oxygène dissous, dureté et teneur en ammoniac,

— remplacement de l'eau d'essai évaporée, le cas échéant,

— nombre de moucherons mâles et femelles émergés par récipient et par jour,

— nombre de larves non émergées sous la forme de moucherons par récipient,

— poids sec individuel moyen des larves par récipient, et par stade larvaire, s'il y a lieu,

— pourcentage d'émergence par expérience identique et par concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucherons mâles et femelles),

— vitesse de développement moyenne des moucherons totalement émergés par expérience identique et par concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucherons mâles et femelles),

— estimation des effets toxiques observés, par exemple CE_x (et intervalles de confiance associés), CSEO et/ou CMEO, et méthodes statistiques employées pour les déterminer,

— analyse des résultats, y compris les répercussions sur les résultats d'un écart éventuel à la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R. *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environnement Canada (1997). Essai de croissance et de survie de larves de moucherons d'eau douce (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*). Méthode d'essai biologique. Rapport SPE 1/RM/32. Décembre 1997.

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼**M4**

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., Kirby R.S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OCDE Publications Hygiène et sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations, n° 23.

(13) Environnement Canada (1995). Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité au moyen de sédiments de contrôle dopés avec un produit toxique de référence. Rapport SPE 1/RM/30. Septembre 1995.

(14) Chapitre C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre.

(15) Suedel B.C. and Rodgers J.H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C. and Rodrigues C. (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(19) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(20) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

(21) Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.

(22) Christensen E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.

(24) Slob W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Appendice 1

DÉFINITIONS

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai:

Le **sédiment reconstitué**, ou artificiel ou synthétique, désigne le mélange de matériaux utilisés pour reproduire au mieux les composants physiques d'un sédiment naturel.

L'**eau sus-jacente** est l'eau recouvrant le sédiment dans le récipient d'essai.

L'**eau interstitielle**, ou l'eau des pores, se réfère à l'eau qui occupe les vides laissés entre le sédiment et les particules de sol.

L'**eau chargée** est l'eau d'essai à laquelle on a ajouté la substance d'essai.

Une **substance d'essai** est toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M4

Appendice 2

Recommandations pour la culture de *Chironomus riparius*

1. Les larves de *Chironomus* peuvent être élevées dans des cristallisoirs ou de grands récipients. Du sable quartzique fin est déposé en couche mince (environ 5 à 10 mm d'épaisseur) sur le fond du récipient. Le Kieselguhr (par exemple l'art. 8117 de Merck) convient aussi comme substrat (une couche encore plus mince de quelques millimètres à peine suffit). Une eau de qualité appropriée, profonde de plusieurs centimètres, vient ensuite recouvrir le substrat. En cas d'évaporation, le niveau d'eau doit toujours être ramené à sa hauteur initiale, afin de prévenir toute dessiccation. L'eau peut être remplacée, si nécessaire. Une légère aération est fournie. Les récipients d'élevage des larves doivent être placés dans des cages appropriées, afin d'empêcher la fuite des adultes émergeant. La cage sera suffisamment grande pour permettre aux adultes émergés d'essaimer, sans quoi la copulation risque de ne pas avoir lieu (dimensions minimales: 30 × 30 × 30 cm).

2. Les cages doivent être gardées à température ambiante, ou à 20 ± 2 °C si elles sont placées dans une chambre à ambiance constante, avec une photopériode de 16 heures de lumière (intensité: environ 1 000 lux) et 8 heures d'obscurité. Une humidité relative de l'air inférieure à 60 % pourrait empêcher la reproduction.

Eau de dilution

3. Toute eau naturelle ou reconstituée appropriée peut être utilisée. L'eau d'un puits, de l'eau du robinet déchlorée et un milieu artificiel (Elendt «M4» ou «M7», voir ci-après) sont souvent utilisés. L'eau doit être aérée avant l'emploi. Si nécessaire, on peut renouveler l'eau de culture en versant ou en siphonnant soigneusement l'eau usée des récipients expérimentaux, sans détruire les tubes des larves.

Alimentation des larves

4. Les larves de *Chironomus* reçoivent des paillettes pour poissons (Tetra Min®, Tetra Phyll® ou une autre marque déposée équivalente), à raison d'environ 250 mg par récipient et par jour. Cette nourriture peut être administrée sous la forme d'une poudre moulue à sec ou d'une suspension dans l'eau: 1,0 g de paillettes ajoutées à 20 ml d'eau de dilution et agitées de façon à obtenir un mélange homogène. Cette préparation peut être administrée à raison d'environ 5 ml par récipient et par jour (agiter avant emploi). Les larves plus âgées peuvent en recevoir plus.

5. La nourriture est ajustée en fonction de la qualité de l'eau. Si le milieu de culture devient trouble, il convient de réduire la ration. Les quantités de nourriture données sont soigneusement notées. Un manque de nourriture fera émigrer les larves vers la colonne d'eau, tandis qu'un excès de nourriture intensifiera l'activité microbienne et abaissera la concentration d'oxygène. Ces deux conditions sont susceptibles de ralentir la croissance des organismes.

6. Certaines cellules d'algues vertes (*Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*) peuvent aussi être ajoutées lors de la préparation de nouveaux récipients de culture.

Alimentation des adultes émergeant

7. Certains expérimentateurs ont suggéré de nourrir les adultes émergés au moyen d'un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucrose saturée.

▼M4

Émergence

8. À 20 ± 2 °C, les adultes commencent à émerger des récipients d'élevage des larves après environ 13 à 15 jours. Il est facile de distinguer les mâles d'après leurs antennes plumeuses.

Amas d'œufs

9. Dès que des adultes sont présents dans la cage d'élevage, il faut vérifier trois fois par semaine, dans tous les récipients d'élevage de larves, si des amas d'œufs gélatineux n'ont pas été déposés. Le cas échéant, les amas d'œufs doivent être soigneusement enlevés et transférés dans un petit récipient contenant un échantillon de l'eau d'élevage. Les amas d'œufs sont utilisés pour préparer un nouveau récipient de culture (2 à 4 amas d'œufs par récipient, par exemple) ou pratiquer des essais de toxicité.

10. Les larves au premier stade devraient éclore après 2-3 jours.

Préparation de nouveaux récipients de culture

11. Une fois que les cultures ont été lancées, il devrait être possible de préparer un nouveau récipient de culture de larves, une fois par semaine ou moins souvent, suivant les besoins de l'essai, et de retirer les récipients plus anciens après que les moucherons adultes ont émergé. Ce système permet d'obtenir régulièrement un contingent d'adultes, avec une organisation minimale.

Préparation des solutions d'essai «M4» et «M7»

12. Elendt (1990) a décrit le milieu «M4». Le milieu «M7» est préparé comme le milieu «M4», sauf pour les substances reprises au tableau 1, dont les concentrations sont quatre fois plus faibles dans le milieu «M7» que dans le milieu «M4». Une publication sur le milieu «M7» est en préparation (Elendt, communication personnelle). La solution d'essai ne doit pas être préparée selon les instructions d'Elendt et Bias (1990), car les concentrations de $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 et K_2HPO_4 indiquées pour la préparation des solutions mères ne conviennent pas.

Préparation du milieu «M7»

13. Chaque solution mère (I) est préparée séparément et une solution mère combinée (II) est préparée à partir de ces solutions mères (I) (voir tableau 1). 50 ml de la solution mère combinée (II) additionnés de la quantité de chaque solution mère de macronutriments indiquée au tableau 2 sont amenés à 1 l avec de l'eau désionisée pour composer le milieu «M7». On prépare une solution mère de vitamines en ajoutant trois vitamines à de l'eau désionisée, comme indiqué au tableau 3 et on verse 0,1 ml de la solution mère combinée de vitamines au milieu «M7» final, peu avant l'emploi (la solution mère de vitamines est stockée congelée par petites aliquotes). Le milieu est aéré et stabilisé

Tableau 1

Solutions mères d'éléments en traces pour les milieux M4 et M7

Solutions mères (I)	Quantité (mg) pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée	Pour préparer la solution mère combinée (II): mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions mères (I) et compléter à un litre avec de l'eau désionisée		Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Solutions mères (I)	Quantité (mg) pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée	Pour préparer la solution mère combinée (II): mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions mères (I) et compléter à un litre avec de l'eau désionisée		Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Ces substances sont dosées différemment dans M4 et M7, comme indiqué plus haut.
(2) Ces solutions sont préparées séparément, puis mélangées et autoclavées immédiatement après.

Tableau 2

Solutions mères de macronutriments pour les milieux M4 et M7

	Quantité pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantités de solutions mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions expérimentales M4 et M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tableau 3

Solution mère de vitamines pour les milieux M4 et M7

Les trois solutions de vitamines sont mélangées de façon à ne former qu'une solution mère de vitamines.

	Quantité pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantités de solutions mères de vitamines ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions d'essai M4 et M7 (mg/l)
Hydrochlorure de thiamine	750	0,1	0,075
Cyanocobalamine (B12)	10	0,1	0,0010
Biotine	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAPHIE:

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P. and Bias W.-R. (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Appendice 3

PRÉPARATION DU SÉDIMENT RECONSTITUÉ

Composition du sédiment

Le sédiment sera reconstitué comme suit:

Ingrédient	Caractéristiques	% du sédiment poids sec
Tourbe	Tourbe de sphaigne, pH aussi proche que possible de 5,5-6,0, pas de résidus de plantes visibles, finement broyée, particules (≤ 1 mm) et séchée à l'air	4-5
Sable quartzique	Dimension des particules: > 50 % des particules doivent mesurer entre 50 et 200 µm	75-76
Argile kaolinique	Taux de kaolinite ≥ 30 %	20
Carbone organique	Ajusté par l'addition de tourbe et de sable	2 (± 0,5)
Carbonate de calcium	$CaCO_3$, pulvérisé, chimiquement pur	0,05 - 0,1
Eau	Conductivité ≤ 10 µS/cm	30 - 50

Préparation

La tourbe est séchée à l'air et broyée en poudre fine. Une suspension de la quantité requise de poudre de tourbe dans de l'eau désionisée est préparée à l'aide d'un homogénéisateur à haute performance. Le pH de cette suspension est ajusté à 5,5 ± 0,5 avec du $CaCO_3$. La suspension est conditionnée durant au moins deux jours en l'agitant doucement à 20 ± 2 °C, afin de stabiliser le pH et d'établir une flore microbienne stable. Le pH est vérifié à nouveau; il devrait atteindre 6,0 ± 0,5. Ensuite la suspension de tourbe est mélangée avec les autres ingrédients (sable et argile kaolinique) et de l'eau désionisée pour former un sédiment homogène avec une teneur en eau de 30 à 50 % du poids sec du sédiment. Le pH du mélange final est encore mesuré et ajusté à 6,5-7,5 avec du $CaCO_3$, si nécessaire. On prélève des échantillons de sédiment afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Ensuite, avant d'utiliser le sédiment reconstitué dans l'essai de toxicité sur les chironomes, il est recommandé de le conditionner durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui seront appliquées durant l'essai subséquent.

Stockage

Les ingrédients secs destinés à la préparation du sédiment artificiel peuvent être entreposés dans un endroit sec et frais, à température ambiante. Le sédiment reconstitué (humide) ne doit pas être stocké avant son utilisation dans l'essai. Il doit être utilisé immédiatement après la période de conditionnement de sept jours qui achève sa préparation.

BIBLIOGRAPHIE:

Chapitre C.8 de la présente annexe: Toxicité pour les vers de terre.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼**M4**

Appendice 4

Caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable

Substance	Concentrations
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Dureté en $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Totalité des pesticides organophosphorés	< 50 ng/l
Totalité des pesticides organochlorés et des biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

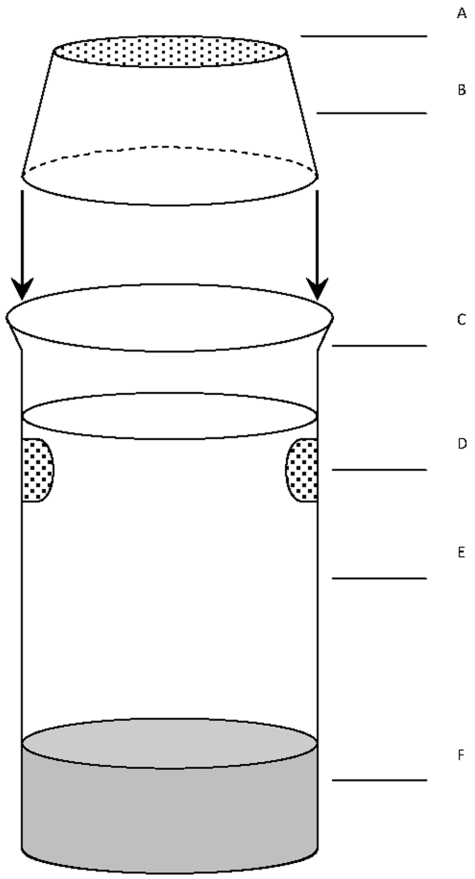
(*) S'il risque d'y avoir une interaction entre les ions qui provoquent la dureté de l'eau et la substance d'essai, il convient d'utiliser une eau moins dure (auquel cas, le milieu Elendt M4 ne pourra pas être utilisé).

▼M4

Appendice 5

Conseils pour suivre l'émergence des larves de chironomes

Les béchers expérimentaux sont coiffés par des pièges à émergence, du 20e jour jusqu'à la fin de l'essai. Le schéma ci-dessous illustre un exemple de piège:



A: toile de nylon.

B: coupelles en plastique renversées.

C: bécher expérimental sans bec.

D: ouvertures recouvertes de toile par où s'effectuent les échanges d'eau.

E: eau.

F: sédiment.

▼M4

C.29. BIODÉGRADABILITÉ FACILE – DÉGAGEMENT DE CO_2 DANS DES FLACONS HERMÉTIQUEMENT CLOS (ESSAI DE L'ESPACE DE TÊTE AU-DESSUS DU LIQUIDE)

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 310 (2006) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Cette méthode de criblage permet de classer les substances chimiques en fonction de leur biodégradabilité facile et fournit des informations semblables à celles exposées dans les six méthodes d'essai (A à F) décrites au chapitre C.4 de la présente annexe. Par conséquent, une substance chimique livrant un résultat positif pour cet essai de l'espace de tête peut être considérée comme facilement biodégradable et donc rapidement dégradable dans l'environnement.

2. L'essai, désormais bien mis au point, de dégagement de CO_2 (1), basé sur l'essai original de Sturm (2), qui permet d'évaluer la biodégradabilité des produits chimiques organiques d'après la mesure du dioxyde de carbone produit par l'activité microbiologique, est normalement celui qui se prête le mieux à l'essai des substances chimiques peu solubles et celles fortement adsorbantes. Il est également choisi pour les substances solubles (mais non volatiles) puisque beaucoup considèrent que le dégagement de dioxyde de carbone constitue la seule preuve irréfutable de l'activité microbiologique. La disparition du carbone organique dissous peut faire intervenir des processus physico-chimiques (adsorption, volatilisation, précipitation, hydrolyse) ainsi que l'action microbiologique et de nombreuses réactions non-biologiques consommant de l'oxygène; il est rare que le CO_2 soit produit à partir de produits chimiques organiques par un processus abiotique. Dans les essais original et modifié de Sturm (1) (2), le CO_2 est extrait de la phase liquide et envoyé dans des récipients absorbants par barbotage (passage bulle à bulle d'air traité à travers le milieu liquide pour éliminer le CO_2), alors que dans la version de Larson (3) (4), lors de son transfert du réacteur vers l'absorbeur, le CO_2 traverse un espace de tête contenant de l'air exempt de CO_2, tandis que le réacteur est agité en continu. Le réacteur n'est agité que dans la version de Larson modifiée; l'agitation n'est prescrite que pour les substances insolubles dans la norme ISO 9439 (5) et dans la version originale des États-Unis (6), qui prescrivent toutes deux le barbotage plutôt que le remplacement de l'espace de tête. Dans une autre méthode officielle (7) de l'Agence des États-Unis pour la protection de l'environnement (US EPA), basée sur la méthode de Gledhill (8), le réacteur agité est fermé à l'atmosphère et le CO_2 produit est directement recueilli de la phase gazeuse dans un piège alcalin interne, comme dans les respiromètres classiques de Warburg/Barcroft.

3. Il a toutefois été démontré que le carbone inorganique s'accumule dans le milieu durant l'application de l'essai standard modifié de Sturm à plusieurs substances chimiques (9). La dégradation de l'aniline à 20 mg C/l a produit une concentration assez élevée de carbone inorganique, à savoir 8 mg/l. Autrement dit, la collecte de CO_2 dans les pièges alcalins n'a pas reflété la quantité réelle de CO_2 produite par des processus microbiologiques à des moments intermédiaires au cours de la dégradation. Par conséquent, la prescription selon laquelle une production de CO_2 supérieure à 60 % de la production maximale théorique ($ThCO_2$) doit être atteinte dans un intervalle de 10 jours (les dix jours suivant immédiatement le franchissement du seuil de 10 % de biodégradation) pour une substance d'essai à classer comme facilement biodégradable, ne pourra être respectée pour certaines substances qui rentreraient dans cette classification d'après la disparition du carbone organique dissous.

4. Lorsque le pourcentage de dégradation est inférieur au niveau attendu, il est probable que du carbone inorganique se soit accumulé dans la solution expérimentale. À ce moment-là, la dégradabilité peut être évaluée avec les autres essais de biodégradabilité facile.

▼M4

5. D'autres inconvénients de la méthode de Sturm (laborieuse, longue, davantage sujette à des erreurs expérimentales et non applicable aux substances volatiles) avaient déjà incité les chercheurs à s'orienter vers une technique en flacon hermétiquement clos, autre que celle de Gledhill, plutôt que d'utiliser un écoulement gazeux continu (10) (11). Boatman *et al.* (12) ont réexaminé les méthodes précédentes et adopté un système d'espace de tête fermé dans lequel le CO_2 est libéré dans l'espace de tête à la fin de l'incubation moyennant une acidification du milieu. Le CO_2 était mesuré par chromatographie gazeuse (carbone inorganique) dans des échantillons prélevés automatiquement de l'espace de tête, mais le carbone inorganique dissous dans la phase liquide n'était pas pris en compte. En outre, les récipients utilisés étaient très petits (20 ml) et ne contenaient que 10 ml de milieu, ce qui engendrait des problèmes, par exemple lorsqu'on ajoutait des quantités forcément très petites de substances d'essai insolubles, et/ou du fait que le milieu inoculé risquait de ne pas renfermer (suffisamment) de micro-organismes capables de dégrader les substances d'essai.

6. Ces problèmes ont été résolus par les études indépendantes de Struijs et Stoltenkamp (13) et de Birch et Fletcher (14), ces derniers s'étant inspirés de leur expérience avec les appareils utilisés dans l'essai de biodégradation anaérobie (15). Dans la première méthode (13), le CO_2 est mesuré dans l'espace de tête après acidification et équilibrage, tandis que dans la seconde (14), le carbone inorganique dissous est mesuré dans les phases gazeuse et liquide, sans traitement; plus de 90 % du carbone inorganique formé était présent dans la phase liquide. Ces deux méthodes présentent des avantages sur l'essai de Sturm du fait que le système expérimental est plus compact et maniable, qu'elles s'appliquent aussi aux substances volatiles et que le risque de retard dans la mesure du CO_2 produit est écarté.

7. Ces deux approches ont été combinées dans la norme ISO (essai au CO_2 – espace de tête) (16) qui a fait l'objet d'un essai circulaire (17) et qui forme la base de la présente méthode d'essai. Ces deux approches ont également été appliquées dans la méthode de l'US EPA (18). Deux méthodes de mesure du CO_2 ont été recommandées, à savoir le CO_2 dans l'espace de tête après acidification (13) et le carbone inorganique dans la phase liquide après l'ajout d'un excès de base. Cette dernière méthode a été introduite par Peterson au cours de l'essai circulaire, conduit par le CONCAWE (19), de cette méthode de l'espace de tête modifiée pour mesurer la biodégradabilité intrinsèque. Les changements apportés par la révision effectuée en 1992 (20) des méthodes contenues dans le chapitre C.4 de la présente annexe pour les essais de biodégradabilité facile ont été incorporés dans la présente méthode d'essai, si bien que les conditions (milieu, durée, etc.) sont par ailleurs identiques à celles de l'essai modifié de Sturm (20). Birch et Fletcher (14) ont montré que, sur les mêmes substances, l'essai de l'espace de tête livrait des résultats très proches de ceux de l'essai circulaire organisé par l'OCDE des méthodes d'essai révisées (21).

PRINCIPE DE L'ESSAI

8. Une population mixte de micro-organismes est ensemencée dans un milieu tampon composé de sels minéraux, où la substance d'essai, généralement à une concentration de 20 mg C/l, représente la seule source de carbone et d'énergie. L'essai est conduit dans des flacons hermétiquement clos comportant un espace de tête d'air, qui sert de réserve d'oxygène pour la biodégradation aérobie. On détermine le CO_2 dégagé par la biodégradation aérobie finale de la substance d'essai en mesurant l'excédent de carbone inorganique produit dans les flacons d'essai par rapport au carbone inorganique produit dans les flacons témoins à blanc ne renfermant que le milieu ensemencé. Le degré de biodégradation est exprimé en pourcentage de la production maximale théorique de carbone inorganique (ThCI), d'après la quantité de substance d'essai (en carbone organique) ajoutée au départ.

9. La disparition de carbone organique dissous et/ou le niveau de la biodégradation primaire de la substance d'essai peuvent aussi être mesurés (20).

▼M4

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

10. Il faut connaître la teneur (% poids) en carbone organique de la substance d'essai, d'après sa structure chimique ou par une mesure, de façon à pouvoir calculer le pourcentage de dégradation. Dans le cas des substances d'essai volatiles, il est utile de mesurer ou de calculer la constante de Henry afin de déterminer un rapport volumique espace de tête/liquide approprié. Les informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes permettent de choisir une concentration d'essai appropriée et facilitent l'interprétation des résultats lorsque la biodégradabilité est faible: on recommande d'inclure un témoin d'inhibition, sauf si l'on sait que la substance d'essai n'inhibe pas l'activité des micro-organismes (voir paragraphe 24).

CHAMP D'APPLICATION DE LA MÉTHODE

11. Cet essai convient aux substances insolubles et solubles dans l'eau, cependant la substance d'essai doit être bien dispersée. Si l'on applique le rapport volumique espace de tête/liquide recommandé de 1/2, les substances volatiles dont la constante de Henry ne dépasse pas 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ peuvent être testées puisque la proportion de la substance d'essai dans l'espace de tête n'excèdera pas 1 % (13). Un volume plus petit d'espace de tête peut être utilisé pour tester des substances plus volatiles, mais dont la biodisponibilité risque d'être limitante, surtout si elles sont peu solubles dans l'eau. Toutefois, les expérimentateurs doivent s'assurer que le rapport volumique espace de tête/liquide et la concentration de la substance d'essai laissent suffisamment d'oxygène disponible pour permettre à la biodégradation aérobie d'être complète (en évitant, par exemple, d'utiliser un substrat très concentré et un petit espace de tête). Des orientations sur ce point figurent dans les références (13) et (23).

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

12. Il faut vérifier le procédé expérimental en testant en parallèle une substance de référence de biodégradabilité connue. À cet effet, l'aniline, le benzoate de sodium ou l'éthylèneglycol peuvent être utilisés pour les substances d'essai solubles dans l'eau et le 1-octanol pour les substances d'essai peu solubles (13). La biodégradation de ces substances doit être supérieure à 60 % de la ThCI au bout de 14 jours.

REPRODUCTIBILITÉ

13. L'essai circulaire réalisé par l'ISO de la méthode (17) a produit les résultats suivants, pour les conditions recommandées, notamment une concentration de la substance d'essai de 20 mg C/l:

Substance d'essai	Pourcentage moyen de biodégradation (28 jours)	Coefficient de variation (%)	Nombre de laboratoires
Aniline	90	16	17
1-octanol	85	12	14

Avec l'aniline, la variabilité interne de l'essai était faible, les coefficients de variabilité ne dépassant pas 5 % dans presque tous les essais. Dans les deux cas où la répétabilité a été moins bonne, la plus grande variabilité a probablement été due à une production élevée de carbone inorganique dans les témoins à blanc. Le 1-octanol a donné lieu à une moins bonne répétabilité, mais avec une variabilité néanmoins inférieure à 10 % dans 79 % des essais. Cette plus grande variabilité interne de l'essai pourrait résulter d'erreurs de dosage, le volume de 1-octanol à injecter dans les flacons expérimentaux hermétiquement clos étant faible (3 à 4 µl). Des concentrations plus faibles de la substance d'essai engendreraient des coefficients de variation plus élevés, en particulier aux concentrations inférieures à 10 mg C/l. Ce problème pourrait être en partie résolu par la diminution de la concentration du carbone inorganique total dans l'inoculum.

▼M4

14. Un essai circulaire de cinq agents tensioactifs à 10 mg C/L, organisé par l'Union européenne (24), a livré les résultats suivants:

Substance d'essai	Pourcentage moyen de biodégradation (28 jours)	Coefficient de variation (%)	Nombre de laboratoires
Benzènesulfonate de tétrapropylène	17	45	10
Diisooctylsulfosuccinate (anionique)	72	22	9
Chlorure d'ammonium hexadécyl-triméthyique (*) (cationique)	75	13	10
(éthoxylate d')$_9$ isononylphénol (non ionique)	41	32	10
Cocoamidepropyl-diméthylhydroxy-sulfobétaïne (amphotère)	60	23	11

(*) Le SiO_2 a été ajouté pour neutraliser la toxicité.

Les résultats montrent qu'en général, les agents tensioactifs les moins bien dégradés présentent une plus grande variabilité. La variabilité interne de l'essai, qui était inférieure à 15 % dans plus de 90 % des cas, n'a pas dépassé 30-40 %.

Note: la plupart des agents tensioactifs ne se composent pas d'une seule espèce moléculaire, mais sont des mélanges d'isomères, d'homologues, etc. qui se dégradent à l'issue de différentes périodes de latence et à différentes vitesses, et qui génèrent des courbes «brouillées», atténuées, de sorte que le seuil de 60 % risque de n'être pas atteint dans la fenêtre de dix jours, même si chaque espèce moléculaire atteindrait plus de 60 % en l'espace de dix jours si elle avait été testée isolément. Ce phénomène peut aussi s'observer avec d'autres mélanges complexes.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

15. Appareils courants de laboratoire et:

a) flacons à sérum en verre fermés avec des bouchons en caoutchouc butylique sertis de surcapsules en aluminium. La capacité recommandée est de 125 ml, soit un volume total d'environ 160 ml (dans ce cas, le volume de chaque flacon doit atteindre 160 ml avec une précision de 1 ml). Des flacons plus petits peuvent être utilisés si les résultats remplissent les conditions décrites aux paragraphes 66 et 67;

b) analyseur de carbone ou autre instrument (chromatographe en phase gazeuse, par exemple) pour mesurer le carbone inorganique;

▼M4

c) seringues à haute précision pour les échantillons gazeux et liquides;

d) agitateur orbital dans un environnement thermostaté;

e) source d'air exempt de CO_2 – on peut la préparer en faisant passer l'air à travers des granules de chaux sodée ou en utilisant un mélange gazeux à 80 % de N_2 et 20 % d'O_2 (facultatif) (voir paragraphe 28);

f) appareil à membrane filtrante à pores de 0,20 à 0,45 µm (facultatif);

g) analyseur de carbone organique (facultatif).

Réactifs

16. Tous les réactifs doivent être de qualité pour analyse.

Eau

17. On utilise de l'eau distillée ou désionisée dont la teneur en carbone organique total est ≤ 1 mg/l. Cela représente une quantité ≤ 5 % de la teneur initiale en carbone organique introduite par la dose recommandée de substance d'essai.

Solutions mères pour le milieu composé de sels minéraux

18. Les solutions mères et le milieu minéral sont similaires à ceux de la norme ISO 14593 (16) et des essais de «biodégradabilité facile» du chapitre C.4 (20). L'utilisation d'une concentration plus élevée de chlorure d'ammonium (2,0 g/l au lieu de 0,5 g/l) ne devrait être nécessaire que dans des cas très exceptionnels, par exemple lorsque la concentration de la substance d'essai est > 40 mg C/l. Les solutions mères doivent être gardées au froid et éliminées après six mois, ou avant si l'on remarque une précipitation ou une prolifération bactérienne. Préparer les solutions mères suivantes:

a) Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) 8,50 g

Hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4) 21,75 g

Hydrogénophosphate de sodium dihydraté ($Na_2HPO_4.2H_20$) 33,40 g

Chlorure d'ammonium (NH_4Cl) 0,50 g

Dissoudre dans l'eau et porter le volume à 1 litre. Le pH de la solution doit être égal à 7,4 (± 0,2). Si ce n'est pas le cas, préparer une autre solution;

b) Chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Dissoudre dans l'eau et porter le volume à 1 litre;

c) Sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Dissoudre dans l'eau et porter le volume à 1 litre;

d) Chlorure de fer (III) hexahydraté ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Dissoudre dans l'eau, porter le volume à 1 litre et ajouter une goutte de HCl concentré.

Préparation du milieu minéral

19. Mélanger 10 ml de la solution a) avec environ 800 ml d'eau (paragraphe 17), puis ajouter 1 ml des solutions b), c) et d) et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau (paragraphe 17).

Autres réactifs

20. Acide phosphorique concentré (H_3PO_4) (> 85 % masse par volume).

▼M4

Solution d'hydroxyde de sodium 7M

21. Dissoudre 280 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) dans 1 litre d'eau (paragraphe 17). Déterminer la teneur en carbone inorganique dissous de cette solution et tenir compte de cette valeur dans le calcul du résultat de l'essai (voir paragraphes 55 et 61), notamment en fonction du critère de validité mentionné au paragraphe 66 b). Préparer une nouvelle solution si la concentration en carbone inorganique dissous est trop élevée.

Substance d'essai

22. Préparer une solution mère d'une substance d'essai suffisamment hydrosoluble, dans l'eau (paragraphe 17) ou dans le milieu d'essai (paragraphe 19), à une concentration de préférence 100 fois supérieure à la concentration finale à utiliser dans l'essai; il peut être nécessaire d'ajuster le pH de la solution mère. La solution mère doit être ajoutée au milieu minéral de telle sorte que la concentration finale de carbone organique atteigne entre 2 et 40 mg C/l, de préférence 20 mg C/l. Des concentrations plus faibles que celles mentionnées ci-dessus risquent de diminuer la précision. Les substances liquides solubles et insolubles peuvent être introduites directement dans les récipients à l'aide de seringues à haute précision. Les substances d'essai peu solubles et insolubles peuvent requérir un traitement spécial (25), à choisir parmi les suivants:

a) ajout direct de quantités de poids connu;

b) dispersion aux ultrasons avant l'ajout;

c) dispersion à l'aide d'agents émulsifiants dont il y a lieu d'établir, avant d'ajouter la substance d'essai, s'ils exercent une action inhibitrice ou stimulante sur l'activité microbiologique;

d) adsorption des substances d'essai liquides, ou d'une solution de la substance d'essai dans un solvant volatil approprié, sur un milieu ou un support inerte (par exemple un filtre en fibres de verre), suivie par l'évaporation du solvant, le cas échéant, et ajout direct de quantités connues;

e) ajout d'un volume connu d'une solution de la substance d'essai dans un solvant suffisamment volatil pour qu'il s'évapore complètement du récipient, suivi par l'évaporation du solvant.

Il faut vérifier par un essai si les agents ou les solvants utilisés aux points c), d) et e) ont un effet stimulant ou inhibiteur sur l'activité microbiologique [voir paragraphe 42 b)].

Substance de référence

23. Préparer une solution mère de la substance de référence (soluble) dans l'eau (paragraphe 17) à une concentration de préférence 100 fois supérieure à la concentration finale (20 mg C/l) à utiliser dans l'essai.

Vérification de l'inhibition

24. Il arrive souvent que les substances d'essai ne se dégradent pas de façon significative dans les conditions appliquées aux évaluations de la biodégradation immédiate. Cela peut résulter du fait que la substance d'essai exerce un effet inhibiteur sur l'inoculum à la concentration à laquelle elle est testée. Une vérification de l'effet inhibiteur peut être incluse dans la conception de l'essai pour faciliter l'identification (rétrospective) de l'inhibition comme l'une des causes possibles ou l'un des facteurs contributifs, soit, au contraire, pour éliminer cette possibilité d'interférences, ce qui démontrerait que la dégradation faible ou nulle n'est imputable qu'au fait que les micro-organismes n'attaquent pas la substance dans les conditions de l'essai. Afin d'obtenir des informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes (aérobies), on prépare une solution contenant la substance d'essai et la substance de référence dans le milieu d'essai (paragraphe 19), chacune à la même concentration que celle à laquelle elles ont été ajoutées dans le milieu d'essai lors de l'essai (voir paragraphes 22 et 23).

▼M4

Inoculum

25. L'inoculum peut provenir de différentes sources: boues activées, effluents d'eaux usées (non chlorés); eaux de surface et sols; ou d'un mélange de ces milieux (20). Il convient de vérifier l'activité biodégradante de la source à l'aide d'une substance de référence. Quelle que soit la source, il ne faut pas utiliser de micro-organismes ayant déjà été exposés à la substance d'essai pour l'essai de biodégradabilité facile.

Attention: les boues activées, les eaux usées et les effluents d'eaux usées renferment des organismes pathogènes et doivent être manipulés avec précaution.

26. On sait empiriquement que le volume optimal de l'inoculum est celui qui:

— suffit pour fournir une activité biodégradante adéquate,

— dégrade la substance de référence dans le pourcentage stipulé (voir paragraphe 66),

— fournit 10^2 à 10^5 unités formant colonie par millilitre dans le mélange final,

— donne normalement une concentration de 4 mg/l de solides en suspension dans le mélange final lorsqu'on utilise de la boue activée; des concentrations allant jusqu'à 30 mg/l peuvent être utilisées, mais elles risquent d'augmenter sensiblement la production de CO_2 dans les témoins à blanc (26),

— représente moins de 10 % de la concentration initiale de carbone organique introduite par la substance d'essai,

— équivaut généralement à 1 à 10 ml d'inoculum par litre de solution expérimentale.

Boues activées

27. Prélever un échantillon de boue activée dans le bassin d'aération d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire traitant principalement des eaux usées domestiques. Éliminer, si nécessaire, les grosses particules à l'aide d'un tamis (possédant des orifices de 1 mm^2, par exemple) et conserver ensuite la boue en aérobiose jusqu'à son utilisation.

28. Une autre possibilité consiste, après avoir éliminé toutes les grosses particules, à laisser décanter la boue ou à la centrifuger (par exemple à 1 100 g pendant 10 minutes). Éliminer le surnageant. La boue peut être lavée dans la solution minérale. Suspendre la boue concentrée dans le milieu minéral de façon à obtenir une concentration de 3 à 5 g/l de matières en suspension. Aérer ensuite la suspension jusqu'à son utilisation.

29. La boue doit provenir d'une station d'épuration ordinaire en bon état de fonctionnement. Les boues issues d'une station d'épuration dont le débit est important, ainsi que les boues susceptibles de contenir des inhibiteurs, doivent être lavées. Décanter ou centrifuger la boue remise en suspension après agitation vigoureuse, éliminer le liquide surnageant et resuspendre la boue lavée dans un volume de milieu minéral frais. Répéter cette opération jusqu'à ce que la boue puisse être considérée comme exempte de substrat en excès ou d'inhibiteur.

30. Prélever un échantillon de boue remise en suspension (lorsque la resuspension est complète) ou de boue non traitée juste avant le moment de son utilisation afin de déterminer le poids sec des matières en suspension.

31. Une autre possibilité consiste à homogénéiser la boue activée (entre 3 et 5 g/l de solides en suspension). Passer la boue dans un mélangeur mécanique réglé sur une vitesse moyenne pendant 2 minutes. Laisser reposer la boue homogénéisée pendant 30 minutes, ou plus longtemps si nécessaire, et prélever la phase liquide, qui sera utilisée comme inoculum à raison d'environ 10 ml par litre de milieu minéral.

▼M4

32. Il est possible d'obtenir une réduction plus importante du dégagement de CO_2 dans le témoin à blanc en aérant la boue toute une nuit avec de l'air exempt de CO_2. Dans cet essai, la concentration de l'inoculum doit s'élever à 4 mg/l de solides de boue activée (13).

Effluent secondaire d'eaux usées

33. L'inoculum peut également provenir de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire recevant principalement des eaux usées domestiques. Conservé en aérobiose, l'échantillon sera utilisé le jour de son prélèvement ou préconditionné si nécessaire. L'effluent doit être filtré à travers un filtre grossier et son pH est mesuré.

34. Pour réduire la teneur en carbone inorganique du filtrat, on fait barboter dans celui-ci de l'air exempt de CO_2 [paragraphe 15 e)] durant 1 heure tout en maintenant le pH à 6,5 avec de l'acide phosphorique (paragraphe 20). La valeur du pH est ramenée à sa valeur de départ avec de l'hydroxyde de sodium (paragraphe 21) et on laisse reposer le filtrat pendant environ 1 heure, avant d'y prélever un volume approprié de surnageant pour l'inoculation. Ce processus de barbotage diminue la teneur de l'inoculum en carbone inorganique. Par exemple, si on utilise le volume maximal recommandé d'effluent filtré et barboté (100 ml) par litre comme inoculum, la quantité de carbone inorganique présente dans les flacons témoins à blanc est comprise entre 0,4 et 1,3 mg/l (14), ce qui représente 2 à 6,5 % du carbone de la substance d'essai à 20 mg C/l et 4 à 13 % à 10 mg C/l.

Eaux de surface

35. Dans une eau de surface adéquate, on prélève un échantillon qui sera conservé en aérobiose et utilisé le jour même. Si nécessaire, l'échantillon est concentré par filtration ou centrifugation. Le volume d'inoculum à utiliser dans chaque récipient expérimental doit satisfaire aux critères énoncés au paragraphe 26.

Sols

36. Prélever un échantillon dans un sol approprié à une profondeur allant jusqu'à 20 cm en dessous de la surface du sol. Il convient d'enlever les pierres, les débris végétaux et les invertébrés de l'échantillon de sol avant de le passer au travers d'un tamis pourvu d'orifices de 2 mm (si l'échantillon est trop mouillé pour pouvoir être tamisé immédiatement, on le sèche partiellement à l'air). Il faut le garder en aérobiose et l'utiliser le jour même (si l'échantillon est transporté dans un sac noir de polythène fermé de manière non hermétique, il peut être conservé à 2 à 4 °C dans ce sac jusqu'à un mois).

Préconditionnement de l'inoculum

37. L'inoculum peut être préconditionné aux conditions expérimentales, mais non préadapté à la substance d'essai. Le préconditionnement peut diminuer le dégagement de CO_2 dans le témoin à blanc. Le préconditionnement consiste à aérer la boue activée, après l'avoir diluée dans le milieu expérimental à 30 mg/l, avec de l'air humide exempt de CO_2 durant 5 à 7 jours à la température de l'essai.

MODE OPÉRATOIRE

Nombre de flacons

38. Le nombre de flacons [paragraphe 15 a)] requis pour un essai dépendra de la fréquence des analyses et de la durée de l'essai.

39. On recommande d'analyser les flacons en trois exemplaires, après un nombre suffisant d'intervalles de temps pour pouvoir identifier la fenêtre des dix jours. On analyse également au moins cinq flacons expérimentaux [paragraphe 15 a)] des séries a), b) et c) (voir paragraphe 42) à la fin de l'essai, afin de pouvoir calculer les intervalles de confiance à 95 % pour le pourcentage moyen de biodégradation.

▼M4

Milieu ensemencé

40. L'inoculum est utilisé à une concentration de 4 mg/l en solides secs de boue activée. Juste avant l'utilisation, préparer une quantité suffisante de milieu ensemencé en ajoutant, par exemple, 2 ml de boue activée traitée comme il convient (paragraphes 27 à 32) à une concentration de 2 000 mg/l à 1 litre de milieu minéral (paragraphe 19). Si l'on utilise un effluent secondaire d'eaux usées, ajouter jusqu'à 100 ml d'effluent (paragraphe 33) à 900 ml de milieu minéral (paragraphe 19) et porter à 1 litre avec du milieu.

Préparation des flacons

41. Verser des aliquotes de milieu ensemencé dans des flacons identiques en plusieurs exemplaires, de telle sorte que le rapport espace de tête/liquide soit de 1/2 (introduire, par exemple 107 ml dans des flacons de 160 ml de capacité). D'autres rapports peuvent être appliqués, mais il faut tenir compte de l'avertissement donné au paragraphe 11. Quel que soit le type d'inoculum utilisé, on veillera à mélanger correctement le milieu ensemencé pour qu'il se répartisse uniformément dans les flacons d'essai.

42. Préparer des séries de flacons [paragraphe 15 a)] destinés aux usages suivants:

a) flacons d'essai (F_T) contenant la substance d'essai;

b) flacons témoins à blanc (F_B) ne contenant que le milieu expérimental et l'inoculum; tous les produits chimiques, solvants, agents ou filtres en fibres de verre utilisés pour introduire la substance d'essai dans les récipients expérimentaux doivent aussi y être ajoutés;

c) flacons contenant la substance de référence (F_C) pour vérifier le procédé;

d) si nécessaire, flacons (F_I) pour vérifier un éventuel effet inhibiteur de la substance d'essai contenant à la fois la substance d'essai et la substance de référence aux mêmes concentrations (paragraphe 24) que dans les flacons F_T et F_C respectivement;

e) flacons (F_S) pour vérifier une éventuelle dégradation abiotique; il s'agit des flacons (F_T) auxquels on a ajouté 50 mg/l de $HgCl_2$ ou qu'on a stérilisés d'une autre manière (à l'autoclave, par exemple).

43. Les substances d'essai et de référence solubles dans l'eau sont ajoutées aux flacons sous la forme de leurs solutions mères aqueuses (paragraphes 22, 23 et 24), de manière à fournir une concentration de 10 à 20 mg C/l.

44. Les substances d'essai et de référence insolubles sont ajoutées aux flacons de différentes façons [voir paragraphe 22 a) à e)] en fonction de la nature de la substance, avant ou après l'ajout du milieu ensemencé, selon la méthode de traitement de la substance. Si l'on utilise l'une des procédures exposées au paragraphe 22 a) à e), les flacons témoins à blanc (F_B) [paragraphe 42 b)] doivent être traités de manière identique, si ce n'est qu'ils ne contiendront ni la substance d'essai ni la substance de référence.

45. Les substances d'essai volatiles doivent être introduites dans des flacons hermétiquement clos (paragraphe 47) au moyen d'une microseringue. La dose est calculée en fonction du volume injecté et de la densité de la substance.

46. Si nécessaire, on ajoutera de l'eau aux flacons, afin que le volume de liquide soit identique dans tous les flacons. On s'assurera que le rapport espace de tête/liquide (généralement de 1/2) et la concentration de la substance d'essai sont tels que l'espace de tête renferme suffisamment d'oxygène pour permettre une biodégradation totale.

▼M4

47. Tous les flacons sont ensuite fermés hermétiquement, par exemple au moyen de bouchons en caoutchouc butylique et de surcapsules en aluminium. Les substances d'essai volatiles doivent être ajoutées à ce stade (paragraphe 45). S'il y a lieu de mesurer la baisse de concentration du carbone organique dissous dans la solution expérimentale et d'analyser au temps zéro la concentration initiale de carbone inorganique ou d'autres paramètres [témoins stériles, paragraphe 42 e)], on prélève un échantillon approprié du flacon d'essai. Le flacon d'essai et son contenu sont ensuite éliminés.

48. Les flacons hermétiquement clos sont placés sur un agitateur rotatif [paragraphe 15 d)], réglé sur une vitesse d'agitation suffisante pour que le contenu du flacon reste bien mélangé et en suspension (par exemple 150 à 200 tpm), et mis à incuber dans l'obscurité à température constante (20 °C ± 1 °C).

Prélèvement

49. Le programme de prélèvement dépendra de la période de latence et de la vitesse de biodégradation de la substance d'essai. Des flacons sont retirés définitivement du dispositif expérimental afin d'être analysés le jour du prélèvement, lequel intervient au moins une fois par semaine ou plus fréquemment (par exemple deux fois par semaine), si une courbe de dégradation complète est requise. On retire le nombre nécessaire de flacons identiques de l'agitateur dans chaque catégorie: F_T, F_B et F_C et, le cas échéant F_I et F_S (voir paragraphe 42). L'essai dure normalement 28 jours. Si la courbe de biodégradation atteint un plateau avant 28 jours, l'essai peut s'arrêter avant 28 jours. Prélever des échantillons dans les cinq flacons réservés aux analyses à effectuer le 28^{e} jour et utiliser les résultats pour calculer les limites de confiance ou le coefficient de variation du pourcentage de biodégradation. Les flacons destinés à vérifier l'inhibition et la dégradation abiotique ne doivent pas faire l'objet de prélèvements aussi fréquents que les autres flacons; il suffira de deux prélèvements effectués respectivement le 1er jour et le 28^{e} jour.

Analyse du carbone inorganique

50. On détermine la production de CO_2 dans les flacons en mesurant l'augmentation de la concentration de carbone inorganique durant l'incubation. Deux méthodes, décrites ci-après, sont recommandées pour mesurer la quantité de carbone inorganique produite durant l'essai. Au cours d'un même essai, il ne faudra utiliser qu'une seule méthode, car ces méthodes risquent de donner des résultats légèrement différents.

51. On recommande la méthode (a) si le milieu est susceptible de contenir des résidus, par exemple de papier filtre en verre et/ou d'une substance d'essai insoluble. Cette analyse peut être pratiquée au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse, à défaut d'un analyseur de carbone. Il est important de maintenir les flacons à une température assez proche de la température de l'essai durant l'analyse du gaz de l'espace de tête. La méthode (b) peut s'avérer plus facile à appliquer par les laboratoires qui mesurent le carbone inorganique à l'aide d'un analyseur de carbone. Il importe que la solution d'hydroxyde de sodium (paragraphe 21) utilisée pour convertir le CO_2 en carbonate soit fraîchement préparée ou que sa teneur en carbone inorganique soit connue, de telle sorte que ce paramètre puisse être pris en compte lors du calcul des résultats de l'essai [voir paragraphe 66 b)].

Méthode (a): acidification à pH < 3

52. Avant chaque lot d'analyses, l'analyseur de carbone inorganique est étalonné au moyen d'un étalon de carbone inorganique approprié (par exemple une dilution 1 % poids/poids de CO_2 dans du N_2). Injecter de l'acide phosphorique concentré (paragraphe 20) à travers le bouchon de chaque flacon destiné à un prélèvement, afin d'abaisser le pH du milieu à une valeur < 3 (ajouter, par exemple, 1 ml à 107 ml de milieu expérimental). Remettre les flacons sur l'agitateur. Après avoir subi une agitation d'une heure à la température expérimentale, les flacons sont retirés de l'agitateur. On prélève des aliquotes de gaz (1 ml, par exemple) dans l'espace de tête de chaque flacon et on les injecte dans l'analyseur de carbone inorganique. Les concentrations de carbone inorganique mesurées sont notées en mg C/l.

▼M4

53. Cette méthode repose sur le principe suivant lequel après l'acidification à pH < 3 et l'équilibrage à 20 °C, la constante d'équilibre de la répartition du CO_2 entre les phases liquide et gazeuse des flacons d'essai est égale à 1,0 lorsqu'elle est mesurée sous forme de concentration (13). Cette relation doit être démontrée au moins une fois pour le système expérimental, de la façon suivante:

Préparer des flacons contenant 5 et 10 mg/l de carbone inorganique à l'aide d'une solution de carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3) dans de l'eau exempte de CO_2 [préparer cette eau en l'acidifiant à pH 6,5 avec de l'acide phosphorique concentré (paragraphe 20), en y faisant barboter de l'air exempt de CO_2 toute une nuit et en ramenant le pH à une valeur neutre avec un produit alcalin]. S'assurer que le rapport volumique espace de tête/liquide est le même que dans les essais (1/2, par exemple). Acidifier et équilibrer comme indiqué au paragraphe 52 et mesurer les concentrations de carbone inorganique dans l'espace de tête et dans la phase liquide. Vérifier que les deux concentrations sont identiques, à l'erreur expérimentale près. Si elles ne le sont pas, l'expérimentateur devra réexaminer les procédures. Il n'est pas nécessaire de vérifier la répartition du carbone inorganique entre les phases liquide et gazeuse à chaque essai; cette vérification pourrait être effectuée au cours de l'étalonnage

54. S'il y a lieu de mesurer la disparition de carbone organique dissous (substances d'essai hydrosolubles uniquement), des échantillons sont prélevés dans la phase liquide de flacons séparés (non acidifiés), filtrés sur une membrane et injectés dans l'analyseur de carbone organique dissous. Ces flacons peuvent servir à d'autres analyses, si nécessaire, permettant de mesurer la biodégradation primaire.

Méthode (b): conversion du CO_2 en carbonate

55. Avant chaque lot d'analyses, l'analyseur de carbone inorganique est étalonné au moyen d'un étalon adéquat, par exemple une solution de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) dans de l'eau exempte de CO_2 (voir paragraphe 53), à une concentration de 0 à 20 mg de carbone inorganique/litre. Injecter une solution d'hydroxyde de sodium (7M, paragraphe 21) (par exemple à raison d'1 ml pour 107 ml de milieu) à travers le bouchon de chaque flacon destiné à un prélèvement et agiter les flacons durant une heure à la température de l'essai. On utilise la même solution de NaOH dans tous les flacons retirés définitivement un jour donné, mais pas nécessairement pour tous les prélèvements effectués tout au long de l'essai. Si les valeurs absolues de la teneur en carbone inorganique des témoins à blanc sont requises à chaque prélèvement, il faudra déterminer la teneur en carbone inorganique de la solution de NaOH chaque fois qu'elle est utilisée. Enlever les flacons de l'agitateur et laisser reposer. Extraire un volume approprié (50 à 1 000 µl, par exemple) de la phase liquide de chaque flacon à l'aide d'une seringue. Injecter les échantillons dans l'analyseur de carbone inorganique et enregistrer les concentrations de carbone inorganique. On s'assurera que l'analyseur employé se prête au traitement des échantillons alcalins obtenus par cette méthode.

56. Cette méthode repose sur le principe selon lequel après l'ajout d'une solution alcaline et agitation, la concentration de carbone inorganique dans l'espace de tête est négligeable. Cela doit être vérifié au moins une fois pour le système expérimental. Il faut, pour ce faire, utiliser des étalons de carbone inorganique, ajouter une solution basique et équilibrer, et mesurer la concentration de carbone inorganique dans l'espace de tête et dans la phase liquide (voir paragraphe 53). La concentration dans l'espace de tête devrait avoisiner zéro. Il n'est pas nécessaire de vérifier cette absorption pratiquement complète de CO_2 à chaque essai.

57. Si la disparition de carbone organique dissous (substances d'essai hydrosolubles uniquement) est à mesurer, des échantillons sont prélevés dans la phase liquide de flacons séparés (ne contenant pas de produit alcalin ajouté), filtrés sur une membrane et injectés dans l'analyseur de carbone organique dissous. Ces flacons peuvent servir à d'autres analyses, si nécessaire, pour mesurer la biodégradation primaire.

▼M4

RÉSULTATS ET RAPPORT

Calcul des résultats

58. En supposant que la substance d'essai a été minéralisée à 100 % en CO_2, la production maximale théorique de carbone inorganique (ThCI) des flacons d'essai excédant celle des témoins à blanc est égale au carbone organique total (COT) ajouté dans chaque flacon d'essai au début de l'essai, autrement dit:

$$ThCI = COT$$

La masse totale (mg) de carbone inorganique (CIT) dans chaque flacon est:

$$CIT = (\text{mg de C dans le liquide} + \text{mg de C dans l'espace de tête}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{Équation [1]}$$

où:

V_L = volume de liquide dans le flacon (litre);

C_L = concentration de carbone inorganique dans le liquide (carbone en mg/l);

V_H = volume de l'espace de tête (litre);

C_H = concentration de carbone inorganique dans l'espace de tête (carbone en mg/l).

Les calculs du CIT pour les deux méthodes analytiques utilisées pour mesurer le carbone inorganique dans cet essai sont décrits ci-dessous aux paragraphes 60 et 61. Le pourcentage de biodégradation (% D) dans chaque cas est donné par l'équation suivante:

$$\%D = \frac{(CIT_t - CIT_b)}{COT} \times 100 \quad \text{Équation [2]}$$

où:

CIT_t = mg de CIT dans le flacon d'essai au temps t;

CIT_b = la moyenne des mg de CIT dans les flacons témoins à blanc au temps t;

COT = mg de COT ajoutés initialement au flacon d'essai.

Le pourcentage de biodégradation (% D) est calculé pour les flacons d'essai (F_T) et de référence (F_C) et, le cas échéant, les flacons (F_I) destinés à la vérification d'un éventuel effet inhibiteur, à partir des quantités respectives de carbone inorganique total produites jusqu'à chaque temps de prélèvement.

59. Une augmentation significative de la teneur en CIT dans les témoins stériles (F_S) durant l'essai permet de conclure à une dégradation abiotique de la substance d'essai et il faut en tenir compte dans le calcul de D dans l'équation [2].

Acidification à pH < 3

60. L'acidification à pH < 3 et l'équilibrage entraînant l'égalisation de la concentration de CIT entre les phases liquide et gazeuse, seule la concentration de carbone inorganique dans la phase gazeuse doit être mesurée. Aussi, d'après l'équation [1], $CIT = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, où V_B = est le volume du flacon de sérum.

Conversion du CO_2 en carbonate

61. Dans cette méthode, les calculs sont effectués conformément à l'équation [1], mais la quantité négligeable de carbone inorganique dans la phase gazeuse est ignorée, de sorte que $V_H \times C_H = 0$, et $CIT = V_L \times C_L$.

▼M4

Expression des résultats

62. On trace une courbe de biodégradation en reportant le pourcentage de biodégradation, D, en fonction du temps d'incubation, courbe qui indiquera, si possible, la phase de latence, la phase de biodégradation, la fenêtre des dix jours et la phase plateau, c'est-à-dire la phase durant laquelle la dégradation a atteint son maximum et où la courbe de biodégradation marque un palier. Si des résultats comparables sont obtenus pour les flacons d'essai (F_T) testés en parallèle (< 20 % de différence), on trace une courbe moyenne (voir appendice 2, figure 1); dans le cas contraire, on trace une courbe pour chaque flacon d'essai. On détermine la valeur moyenne du pourcentage de biodégradation dans la phase plateau ou on évalue sa valeur maximale (par exemple si la courbe fléchit dans la phase plateau), mais il est important d'estimer si, dans ce dernier cas, la valeur n'est pas nettement divergente. Ce niveau maximal de biodégradation doit être mentionné en tant que «degré de biodégradation de la substance d'essai» dans le rapport d'essai. Si le nombre de flacons d'essai s'est avéré insuffisant pour préciser une phase plateau, on utilise les données mesurées du dernier jour de l'essai pour calculer une valeur moyenne. Cette dernière valeur, la moyenne de cinq essais identiques, sert à indiquer la précision avec laquelle le pourcentage de biodégradation a été déterminé. La valeur obtenue au terme de la fenêtre des dix jours doit également figurer dans le rapport.

63. Tracer, de la même manière, une courbe pour la substance de référence, F_C, et, le cas échéant, pour la vérification de la dégradation abiotique F_S et pour le contrôle de l'inhibition, F_I.

64. Les quantités de CIT présentes dans les témoins à blanc (F_B) sont consignées, de même que celles présentes dans les flacons F_S, si ces flacons sont inclus dans le système expérimental.

65. Calculer D pour les flacons F_I, d'après le rendement théorique escompté en carbone inorganique provenant uniquement de la substance de référence du mélange. Si, au 28e jour, $([D_{FC}\ (\text{(1)}) - DF_I\ (\text{(2)})]/D_{FC}) \times 100 > 25$ %, il est permis de supposer que la substance d'essai a inhibé l'activité de l'inoculum, ce qui peut expliquer les faibles valeurs de D_{FT} obtenues dans les conditions de l'essai. Dans ce cas, l'essai pourrait être répété avec une concentration d'essai plus faible, et en réduisant de préférence le carbone inorganique dissous (CID) dans l'inoculum et le CIT formé dans les témoins à blanc, car une diminution de la concentration de la substance d'essai amoindrit la précision de la méthode. Un autre inoculum peut également être utilisé. Si la quantité de CIT dans le flacon F_S (dégradation abiotique) montre une augmentation significative (> 10 %), il se peut qu'une dégradation abiotique ait eu lieu.

Validité des résultats

66. Un essai est considéré comme valable si:

a) le pourcentage moyen de dégradation dans les flacons F_C contenant la substance de référence est > 60 % au 14e jour de l'incubation; et

b) la quantité moyenne de CIT présente dans les témoins à blancs F_B à la fin de l'essai est > 3 mg C/l.

Si ces limites ne sont pas atteintes, on répétera l'essai avec un inoculum provenant d'une autre source et/ou on révisera les procédures appliquées. Par exemple, si une production élevée de carbone inorganique dans le témoin à blanc pose un problème, il convient de suivre la procédure exposée aux paragraphes 27 à 32.

(1) Le pourcentage de dégradation dans les flacons F_C contenant la substance de référence.
(2) Le pourcentage de dégradation dans les flacons F_I.

▼M4

67. Si la substance d'essai ne fournit pas 60 % de la production maximale théorique de carbone inorganique (ThCI) et qu'il a été démontré qu'elle n'exerce aucun effet inhibiteur (paragraphe 65), l'essai peut être répété avec une concentration accrue d'inoculum (jusqu'à 30 mg/l de boue activée et 100 ml d'effluent/l) ou avec un inoculum provenant d'autres sources, en particulier si la dégradation a atteint une valeur comprise entre 20 et 60 %.

Interprétation des résultats

68. Si une substance d'essai atteint une biodégradation > 60 % de la ThCI dans la fenêtre des dix jours au cours de cet essai, cela démontre qu'elle est facilement biodégradable en aérobiose.

69. Si la valeur de seuil de 60 % de la ThCI n'a pas été atteinte, on mesure le pH du milieu des flacons qui n'ont pas été acidifiés ou alcalinisés; une valeur inférieure à 6,5 pourrait indiquer qu'une nitrification a eu lieu. Dans ce cas, on répète l'essai avec une solution tampon plus concentrée.

Rapport d'essai

70. Dresser un tableau du pourcentage de dégradation (% D) relevé dans chaque flacon d'essai (F_T), de référence (F_C) et, le cas échéant, de vérification de l'inhibition (F_I) pour chaque jour de prélèvement. Si les flacons identiques livrent des résultats comparables, tracer une courbe du % D moyen en fonction du temps. Noter la quantité de carbone inorganique total dans les témoins à blanc (F_B) et dans les témoins stériles (F_S), de même que le carbone organique dissous et/ou d'autres paramètres, ainsi que leur pourcentage de disparition.

71. Déterminer la valeur moyenne du % D dans la phase plateau ou utiliser la valeur maximale si la courbe de biodégradation fléchit dans la phase plateau et rapporter cette valeur en tant que «degré de biodégradation de la substance d'essai». Il importe de vérifier que dans ce dernier cas, la valeur la plus élevée n'est pas nettement divergente.

72. Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes:

Substance d'essai:

— nom courant, nom chimique, numéro CAS, formule structurale et propriétés physico-chimiques pertinentes,

— pureté (impuretés) de la substance d'essai.

Conditions expérimentales:

— référence à la présente méthode d'essai,

— description du système expérimental utilisé (par exemple, volume du flacon, rapport espace de tête/liquide, méthode d'agitation, etc.),

— ajout de la substance d'essai et de la substance de référence dans le système expérimental: concentration appliquée et quantité de carbone mesurée dans chaque flacon d'essai, et, le cas échéant, solvants utilisés,

— détails sur l'inoculum utilisé, traitement préalable et préconditionnement éventuels,

— température d'incubation,

— validation du principe de l'analyse du carbone inorganique,

— principales caractéristiques de l'analyseur de carbone inorganique employé (et de toute autre méthode d'analyse utilisée),

— nombre de répétitions.

Résultats:

— données brutes et valeurs calculées de la biodégradabilité présentées dans un tableau,

▼M4

— graphique du pourcentage de dégradation en fonction du temps pour les substances d'essai et de référence, phase de latence, phase de dégradation, fenêtre des dix jours et pente,

— pourcentage de disparition au niveau du plateau, à la fin de cet essai et après la fenêtre des dix jours,

— justification en cas de rejet des résultats expérimentaux,

— tout autre fait se rapportant à la procédure utilisée,

— analyse des résultats.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Chapitre C.4 de la présente annexe Détermination de la biodégradabilité «facile» - Essai de dégagement de CO_2 (Méthode C.4-C).

(2) Sturm R.N. (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A., Oil Chem Soc. 50: 159-167.

(3) Larson R.J. (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.

(4) Larson R.J., Hansmann M.A. and Bookland E.A. (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; révisée en 1999). Qualité de l'eau – Évaluation de la biodégradabilité aérobie ultime en milieu aqueux des composés organiques – Essai de dégagement de dioxyde de carbone (Sturm).

(6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(8) Gledhill W.E. (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.

(9) Weytjens D., Van Ginneken I. and Painter H.A. (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.

(10) Ennis D.M. and Kramer A. (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.

(11) Ennis D.M., Kramer A., Jameson C.W., Mazzoccki P.H. and Bailey P.H. (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.

(12) Boatman R.J., Cunningham S.L. and Ziegler D.A. (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.

(13) Struijs J. and Stoltenkamp J. (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.

(14) Birch R.R. and Fletcher R.J. (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.

(15) Birch R.R., Biver C., Campagna R., Gledhill W.E., Pagga U., Steber J., Reust H., and Bontinck W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593, (1999) Qualité de l'eau – Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques – Méthode par analyse du carbone inorganique dans des récipients hermétiquement clos (essai au CO_2 – espace de tête).

(17) Battersby N.S. (1997). The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby N.S., Ciccognani D., Evans M.R., King D., Painter H.A., Peterson D.R. and Starkey M. (1999). An «inherent» biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

(20) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité «facile».

(21) OCDE (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

(22) Chapitre C.11 de la présente annexe, Boues activées: essai d'inhibition de la respiration.

(23) Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M.J. and Dekkers A.L.M. (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.

(24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

(25) ISO 10634 (1996) Qualité de l'eau – Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.

▼M4

Appendice 1

ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS

CI: carbone inorganique.

$ThCO_2$: production théorique de CO_2 (mg); correspond à la quantité de dioxyde de carbone calculée à partir de la teneur en carbone connue ou mesurée de la substance d'essai, qui doit se dégager lors de la minéralisation complète de celle-ci; également exprimée en mg de dioxyde de carbone dégagé par mg de substance d'essai.

COD: le carbone organique dissous est le carbone organique présent en solution ou qui traverse un filtre à pores de 0,45 micron ou encore qui reste dans le surnageant après une centrifugation de 15 minutes à environ 4 000 g (40 000 m sec^{-2}).

CID: carbone inorganique dissous.

ThCI: production théorique de carbone inorganique.

CIT: carbone inorganique total.

Facilement biodégradable: classification arbitraire des produits chimiques qui ont répondu positivement à certains essais de dépistage spécifiques portant sur la biodégradabilité ultime; du fait de la rigueur de ces essais, on admet que de tels composés se dégraderont rapidement et complètement en milieu aquatique dans des conditions aérobies.

Fenêtre des dix jours: les dix jours qui suivent immédiatement le moment où le taux de biodégradation atteint 10 %.

Biodégradabilité intrinsèque: classification des produits chimiques pour lesquels une biodégradation (primaire ou finale) se manifeste sans ambiguïté au cours d'un quelconque essai de biodégradabilité.

Biodégradation ultime en aérobiose: niveau de dégradation atteint lorsque la totalité de la substance d'essai a été utilisée par des micro-organismes pour produire du dioxyde de carbone, de l'eau, des sels minéraux et de nouveaux constituants cellulaires microbiologiques (biomasse).

Minéralisation: dégradation complète d'un composé organique en CO_2 et en H_2O dans des conditions aérobies, et en CH_4, CO_2 et H_2O dans des conditions anaérobies.

Phase de latence: correspond à la période qui commence au début de l'essai et s'achève au moment où les micro-organismes dégradants se sont acclimatés et/ou adaptés et où le degré de biodégradation d'une substance chimique ou d'une matière organique a atteint un niveau détectable (par exemple 10 % de la biodégradation maximale théorique, ou moins, suivant la précision de la technique de mesure).

Phase de dégradation: correspond à la période qui commence à la fin de la phase de latence et se termine au moment où on atteint 90 % du taux maximal de dégradation.

Phase plateau: phase au cours de laquelle la dégradation atteint sa valeur maximale et où la courbe de biodégradation marque un palier.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

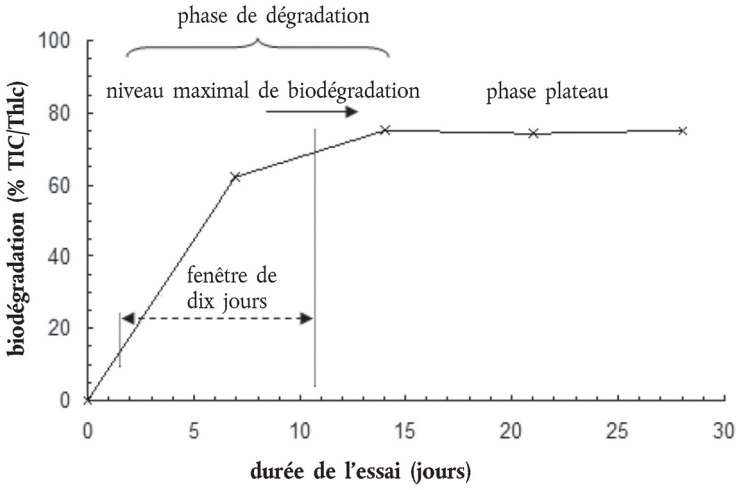
▼M4

Appendice 2

Exemple de courbe de biodégradation

Figure 1

Biodégradation du 1-octanol au cours de l'essai de l'espace de tête (dégagement de CO_2)



Glossaire

biodégradation.

phase de dégradation.

niveau maximal de biodégradation.

phase plateau.

fenêtre de dix jours.

durée de l'essai (jours).

▼M4

C. 30. BIOACCUMULATION CHEZ LES OLIGOCHÈTES TERRESTRES

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 317 (2010) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Parmi les méthodes d'essai relatives au devenir environnemental, celles intitulées «Bioconcentration: essai avec renouvellement continu sur les poissons» [chapitre C.13 de la présente annexe (49)] et «Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fouisseurs» (53) ont été publiées, respectivement, en 1996 et en 2008. Il est difficile voire impossible d'extrapoler aux organismes terrestres comme les vers de terre les données sur la bioaccumulation en milieu aquatique. Des calculs de modèles fondés sur la lipophilie d'une substance d'essai, voir par exemple (14) ou (37), sont actuellement utilisés pour évaluer la bioaccumulation des substances chimiques dans le sol, notamment dans le document d'orientation technique de l'Union européenne (19). La nécessité d'appliquer une méthode d'essai comportant des compartiments spécifiques a déjà été exposée (55). Une telle méthode est particulièrement importante pour évaluer l'empoisonnement secondaire dans les chaînes alimentaires terrestres (4). Plusieurs méthodes d'essai nationales portent sur la bioaccumulation chez les organismes autres que les poissons, par exemple (2) et (72). Une méthode d'évaluation de la bioaccumulation chez les vers de terre (*Eisenia fetida*, Savigny) et les enchytrées dans des sols contaminés a été élaborée par l'American Society for Testing and Materials (ASTM) (3). Une méthode internationalement reconnue visant à déterminer la bioaccumulation dans un sol chargé permettra de mieux évaluer les risques des produits chimiques pour les écosystèmes terrestres, notamment (25) et (29).

2. Les invertébrés géophages sont exposés aux substances chimiques présentes dans le sol. Au nombre de ces animaux, les oligochètes terrestres jouent un rôle important dans la structure et la fonction des sols (15) (20). Les oligochètes terrestres vivent dans le sol et, partiellement, à sa surface (notamment sur la litière); ils représentent fréquemment l'espèce la plus abondante en termes de biomasse (54). Leur rôle dans la bioturbation du sol et leur fonction de proies confèrent à ces animaux une influence considérable sur la biodisponibilité des substances chimiques pour d'autres organismes comme les prédateurs invertébrés [dont les acariens et les coléoptères; voir notamment (64)] ou vertébrés [dont les renards et les mouettes (18) (62)]. Certaines espèces d'oligochètes terrestres actuellement utilisées dans les essais écotoxicologiques sont décrites à l'appendice 5.

3. Le guide de l'ASTM sur les essais en laboratoire consacrés à la toxicité du sol ou à la bioaccumulation chez les vers de terre *Eisenia fetida* et les enchytrées *Enchytraeus albidus* (3) fournit nombre d'informations essentielles qui ont servi à mettre en œuvre la méthode d'essai exposée ici sur la bioaccumulation dans le sol. Parmi les autres références citées dans la présente méthode d'essai figurent le chapitre C.13 de la présente annexe, intitulé «Bioconcentration: essai avec renouvellement continu sur les poissons» (49) et la ligne directrice 315 de l'OCDE intitulée «Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fouisseurs» (53). Des expériences pratiques tirées d'études et de diverses publications sur la bioaccumulation dans le sol, dont (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79), ont également largement inspiré la présente méthode d'essai.

4. Cette méthode d'essai s'applique essentiellement aux substances chimiques organiques neutres, stables, qui ont tendance à être adsorbées dans le sol. Elle permet également d'évaluer la bioaccumulation de composés organométalliques stables, associés au sol. Cette méthode s'applique aussi aux métaux et autres éléments présents à l'état de traces.

PRÉREQUIS

5. Les essais visant à mesurer la bioaccumulation d'une substance dans les oligochètes terrestres ont été réalisés avec des métaux lourds [voir notamment (63)] et des substances organiques persistantes dont le log K_{ow} (K_{oe}) se situe entre 3,0 et 6,0 (40). Ces essais s'appliquent également aux:

   — substances dont le log K_{ow} est supérieur à 6,0 (substances super-hydrophobes),

▼M4

— substances appartenant à la classe des substances organiques connues pour leur potentiel de bioaccumulation dans les organismes vivants, par exemple les substances fortement adsorbantes ou tensio-actives,

— substances qui présentent un potentiel de bioaccumulation de par leurs caractéristiques structurelles (analogues des substances dont le potentiel de bioaccumulation est connu),

— métaux.

6. Avant de débuter toute étude, il convient de disposer de certaines informations sur la substance d'essai, comme le nom courant, le nom chimique (de préférence le nom IUPAC), la formule structurale, le numéro CAS, la pureté, les mesures de sécurité, les conditions de stockage appropriées et les méthodes d'analyse. Il faut aussi connaître les propriétés suivantes de la substance:

a) solubilité dans l'eau;

b) coefficient de partage octanol-eau, K_{ow};

c) coefficient de partage sol-eau, exprimé par K_{oc};

d) pression de vapeur;

e) dégradabilité (dans le sol ou l'eau notamment);

f) métabolites connus.

7. Il est possible d'utiliser des substances d'essai radiomarquées ou non. Cependant, l'utilisation de substances radiomarquées est recommandée car elle facilite l'analyse. La décision d'y recourir dépendra des limites de détection ou de la nécessité de mesurer le composé parent et les métabolites. Dans le cas où une substance radiomarquée est utilisée et où le total des résidus radioactifs est mesuré, il est important que les résidus radiomarqués tant dans le sol que dans les organismes d'essai soient définis en pourcentages de la substance d'essai parente et de la substance marquée non-parente, par exemple dans des échantillons prélevés à un état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption, pour permettre de calculer le facteur de bioaccumulation (FBA) pour la substance d'essai parente et les métabolites du sol pertinents (voir paragraphe 50). Il peut s'avérer nécessaire de modifier la méthode décrite ici, en particulier en vue de disposer d'une biomasse suffisante pour mesurer les substances d'essai organiques non-radiomarquées ou les métaux. Lorsque le total des résidus radioactifs est mesuré (par comptage en scintillation liquide après extraction, combustion ou solubilisation des tissus), le facteur de bioaccumulation est basé sur la susbtance d'essai parente et sur les métabolites. Il est préférable que le FBA soit calculé sur la base de la concentration de la substance d'essai parente dans les organismes et du total des résidus radioactifs. Ensuite, le facteur d'accumulation biota-sol (BSAF) (*biota-soil accumulation factor*), normalisé par rapport à la teneur en lipides des vers et à la teneur en carbone organique (CO) du sol, est calculé à partir du FBA pour garantir la comparabilité des résultats de différents essais de bioaccumulation.

8. Il convient que la toxicité de la substance d'essai envers les espèces utilisées dans l'essai soit connue, notamment la concentration d'effet (CE_x) ou la concentration létale (CL_x) pour la durée de la phase d'absorption [(19) par exemple]. La concentration de la substance d'essai représente de préférence environ 1 % de sa CL_{50} aiguë asymptotique, et elle est au moins dix fois supérieure à sa limite de détection dans le sol par la méthode d'analyse utilisée. La préférence est donnée, lorsqu'elles sont disponibles, aux valeurs de toxicité issues d'études à long terme sur les effets sublétaux observés (51) et (52). Si ces données ne sont pas disponibles, un essai de toxicité aiguë apportera des informations utiles [voir notamment (23)].

▼M4

9. Il est nécessaire de disposer d'une méthode d'analyse appropriée, dont on connaît l'exactitude, la précision et la sensibilité pour quantifier la substance dans les solutions d'essai, dans le sol et dans le matériel biologique; il est aussi nécessaire de disposer des détails de la préparation et du stockage des échantillons, et des fiches de données de sécurité des substances. Il convient également de connaître les limites de détection analytiques de la substance d'essai dans le sol et les tissus du ver. Si une substance d'essai marquée au ^{14}C est utilisée, il est nécessaire de connaître aussi la radioactivité spécifique (c'est-à- dire en Bq.mol-1) et le pourcentage de radioactivité associé aux impuretés. La radioactivité spécifique de la substance d'essai sera suffisamment élevée pour faciliter l'analyse et les concentrations d'essai utilisées ne provoqueront pas d'effets toxiques.

10. L'essai peut être réalisé sur sol naturel ou artificiel. Avant le début de l'essai, il convient de connaître les caractéristiques du sol naturel utilisé, par exemple son origine ou ses constituants, son pH, sa teneur en carbone organique, sa distribution granulométrique (pourcentages de sable, de limon et d'argile), et sa capacité de rétention d'eau (CRE) (3) (48).

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. Les paramètres qui caractérisent la bioaccumulation d'une substance d'essai se composent du facteur de bioaccumulation (FBA), de la constante de vitesse d'absorption (k_s) et de la constante de vitesse d'élimination (k_e). L'appendice 1 donne des définitions détaillées de ces paramètres.

12. L'essai consiste en deux phases, la phase d'absorption (exposition) et la phase d'élimination (postexposition). Durant la phase d'absorption, des groupes répliqués de vers sont exposés au sol chargé avec la substance d'essai. En plus des animaux d'essai, des groupes témoins de vers sont conservés dans des conditions identiques, sans la substance d'essai. Le poids sec et la teneur en lipides des organismes d'essai sont mesurés. Pour ce faire, on peut utiliser des vers du groupe témoin. Les valeurs de fond analytiques (essai à blanc) peuvent être obtenues en analysant des échantillons des vers et du sol témoins. Pour la phase d'élimination, les vers sont transférés dans un sol dépourvu de la substance d'essai. Une phase d'élimination est toujours nécessaire sauf si l'absorption de la substance d'essai au cours de la phase d'exposition s'avère être non significative. Elle permet de recueillir des informations sur la vitesse à laquelle la substance d'essai est excrétée par l'organisme d'essai (27). Si un état stationnaire n'a pas été atteint durant la phase d'absorption, il est préférable de déterminer les paramètres cinétiques – constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, facteur de bioaccumulation cinétique FBAk – en s'appuyant sur l'ajustement simultané des résultats des phases d'absorption et d'élimination. La concentration de la substance d'essai dans ou sur les vers est contrôlée pendant toute la durée des deux phases de l'essai.

13. Durant la phase d'absorption, des mesures sont effectuées pendant des temps de prélèvement pouvant durer jusqu'à 14 jours (enchytrées) ou 21 jours (vers de terre) jusqu'à ce que l'état stationnaire soit atteint (11) (12) (67). On identifie un état stationnaire lorsque le tracé de la concentration dans les vers en fonction du temps est parallèle à l'axe du temps, et lorsque trois analyses successives de la concentration réalisées sur des échantillons prélevés à des intervalles d'au moins deux jours ne diffèrent pas de plus de ± 20 % l'une par rapport à l'autre sur la base de comparaisons statistiques (par exemple, analyse de la variance, analyse de la régression).

14. La phase d'élimination consiste à transférer les organismes d'essai dans des récipients qui contiennent un substrat identique, mais sans la substance d'essai. Durant la phase d'élimination, les mesures sont réalisées pendant des durées pouvant aller jusqu'à 14 jours (enchytrées) ou 21 jours (vers de terre), à moins qu'une détermination analytique antérieure n'ait mis en évidence une diminution de 90 % des résidus de substance d'essai dans les vers. La concentration de la substance d'essai dans les vers à la fin de la phase d'élimination est consignée comme résidus non éliminés. Le facteur

▼M4

de bioaccumulation à l'état stationnaire (*steady state*) (FBAss) est calculé de préférence à la fois comme le rapport de la concentration dans les vers (C_a) à celle dans le sol (C_s) à un état stationnaire apparent, et comme un facteur de bioaccumulation cinétique (FBAK), c'est-à-dire comme le rapport de la constante de vitesse d'absorption à partir du sol (k_s) à la constante de vitesse d'élimination (k_e) (voir l'appendice 1 pour les définitions) en supposant une cinétique du premier ordre (voir l'appendice 2 pour les calculs). Si la cinétique du premier ordre n'est manifestement pas applicable, il convient d'employer d'autres modèles.

15. La constante de vitesse d'absorption, la constante de vitesse d'élimination (ou les constantes, si d'autres modèles ont été utilisés), le facteur de bioaccumulation cinétique (FBAK), et lorsque cela est possible, les limites de confiance de chacun de ces paramètres, sont calculés à partir d'équations de modèles à l'aide de programmes informatiques (voir l'appendice 2). La qualité de l'ajustement d'un modèle peut être déterminée à partir du coefficient de corrélation ou du coefficient de détermination (des coefficients proches de 1 indiquent une bonne qualité d'ajustement) ou de la loi du chi-deux. De plus la grandeur de l'écart-type ou de l'intervalle de confiance autour des paramètres estimés peut donner une bonne indication de la qualité de l'ajustement du modèle.

16. Pour réduire la variabilité des résultats pour les substances de lipophilie élevée, les facteurs de bioaccumulation sont exprimés par rapport à la teneur en lipides et à la teneur en carbone organique [teneur en kg de carbone organique (CO) du sol par teneur en kg de lipides des vers]. Cette approche s'appuie sur le fait que, pour certaines classes chimiques, il existe une relation claire entre le potentiel de bioaccumulation et la lipophilie; cette relation a été clairement établie pour le poisson (47). Il existe une relation entre la teneur en lipides du poisson et la bioaccumulation de ces substances. Pour les organismes benthiques, des corrélations similaires ont été trouvées [voir notamment (30) (44)]. Cette corrélation a également été démontrée pour les oligochètes terrestres (5) (6) (7) (14). Si on dispose de suffisamment de tissu de vers, il est possible de déterminer la teneur en lipides des animaux d'essai sur le même matériel biologique que celui utilisé pour déterminer la concentration de la substance d'essai. Il est également possible de mesurer la teneur en lipides en utilisant des animaux témoins.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

17. Pour qu'un essai soit valable, les critères suivants seront remplis tant concernant les animaux témoins que les animaux traités:

— à l'issue de l'essai, la mortalité totale au cours des phases d'absorption et d'élimination ne dépasse pas 10 % (vers de terre) ou 20 % (enchytrées) du nombre total de vers introduits,

— avec *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*, la perte de poids moyenne mesurée à la fin des phases d'absorption et d'élimination ne dépasse pas 20 % du poids frais initial au début de chaque phase.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Espèces d'essai

18. Différentes espèces d'oligochètes terrestres sont recommandées pour les essais sur la bioaccumulation. Les espèces les plus couramment employées, *Eisenia fetida* ou *Eisenia andrei* (vers de terre) ou encore *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* ou *Enchytraeus luxuriosus* (enchytrées), sont décrites à l'appendice 5.

▼M4

Appareillage

19. Il convient d'éviter avec soin d'utiliser pour l'appareillage des matériaux susceptibles de dissoudre ou d'adsorber la substance d'essai ou de laisser s'échapper des substances ayant un effet délétère sur les animaux d'essai. Il est possible d'utiliser des récipients rectangulaires ou cylindriques standard, faits dans un matériau chimiquement inerte et d'une capacité adaptée, conforme au taux de charge, c'est-à- dire au nombre de vers d'essai. De l'acier inoxydable, du plastique ou du verre peut être utilisé pour tout équipement entrant en contact avec le milieu d'essai. Les récipients d'essai devront être fermés de manière appropriée, pour éviter que les vers ne s'échappent, tout en assurant un apport d'air suffisant. Du verre silanisé peut s'avérer nécessaire pour des substances de coefficient d'adsorption élevé comme les pyréthroïdes synthétiques. Dans ces cas de figure, l'équipement devra être jeté après usage (49). Il conviendra d'éviter l'évaporation des substances radiomarquées et des substances chimiques volatiles. On utilisera des pièges (par exemple des flacons de lavage des gaz) contenant un absorbant permettant de capter d'éventuels résidus susceptibles de s'évaporer des récipients d'essai.

Sol

20. Il convient que le sol d'essai soit être d'une qualité permettant la survie et de préférence la reproduction des organismes d'essai durant les périodes d'acclimatation et d'essai, sans qu'ils ne présentent un aspect ou un comportement anormal. Les vers devront pouvoir s'enfouir dans le sol.

21. Il est recommandé d'utiliser comme substrat lors des essais le sol artificiel décrit au chapitre C.8 de la présente annexe (48). La préparation du sol artificiel en vue d'essais sur la bioaccumulation est décrite à l'appendice 4, où figurent également des recommandations relatives au stockage de ce sol artificiel. Tout sol artificiel séché à l'air peut être stocké à température ambiante jusqu'à son utilisation.

22. Toutefois, il est possible d'utiliser des sols naturels provenant de sites non pollués comme sol d'essai et/ou d'élevage. Les sols naturels sont caractérisés au moins par leur origine (site de prélèvement), leur pH, leur teneur en carbone organique, leur distribution granulométrique (pourcentage de sable, de limon et d'argile), leur capacité maximale de rétention d'eau (CREmax), et leur teneur en eau (3). La recherche de micropolluants dans le sol ou dans ses constituants, préalablement à son utilisation, devrait fournir des informations utiles. En cas d'utilisation d'un sol naturel prélevé sur des terres agricoles, il convient que ce dernier n'ait pas été traité avec des produits phytopharmaceutiques ou n'ait pas fait l'objet d'un épandage de fumier d'animaux traités pendant au moins un an avant l'échantillonnage, ou d'un épandage d'engrais organiques pendant au moins six mois avant l'échantillonnage (50). Les procédures de manipulation des sols naturels avant utilisation dans le cadre d'essais écotoxicologiques sur des oligochètes en laboratoire sont décrites dans le document de l'ASTM (3). La durée de stockage des sols naturels au laboratoire est aussi courte que possible.

Application de la substance d'essai

23. La substance d'essai est incorporée dans le sol. Il convient de prendre en compte les propriétés physico-chimiques de cette substance. Une substance d'essai soluble dans l'eau est entièrement dissoute dans l'eau avant d'être mélangée au sol. La procédure de chargement recommandée pour les substances d'essai peu solubles dans l'eau consiste à enrober un ou plusieurs des constituants du sol (artificiel) avec la substance d'essai. Par exemple, le sable de quartz, ou une portion de celui-ci, peut être trempé dans une solution de la substance d'essai dans un solvant organique adapté, lequel

▼M4

est ensuite lentement évaporé jusqu'à dessiccation. La fraction enrobée peut ensuite être mélangée avec le sol mouillé. Cette procédure a pour principal avantage de n'introduire aucun solvant dans le sol. En cas d'utilisation d'un sol naturel, la substance d'essai peut être ajoutée soit par chargement d'une portion du sol séchée à l'air comme décrit précédemment pour le sol artificiel, soit par mélange avec le sol mouillé, puis évaporation si un agent de solubilisation est utilisé. En règle générale, il conviendra d'éviter autant que possible tout contact du sol mouillé avec les solvants. Les éléments suivants sont à prendre en considération (3):

— si un solvant autre que l'eau est utilisé, il convient qu'il soit miscible à l'eau et/ou puisse être éliminé (par évaporation notamment) pour ne laisser que la substance chimique d'essai sur le sol,

— si un témoin solvant est utilisé, aucun témoin négatif n'est nécessaire. Le témoin solvant présentera la plus forte concentration de solvant ajouté au sol et le solvant en question sera issu du même lot que celui utilisé pour la solution mère. La toxicité et la volatilité du solvant ainsi que la solubilité de la substance d'essai dans le solvant sélectionné constituent les principaux critères de choix pour l'agent de solubilisation.

24. Pour les substances peu solubles dans l'eau et les solvants organiques, 2,0 à 2,5 g de sable quartzique finement broyé par récipient d'essai peuvent être mélangés, au moyen d'un mortier et d'un pilon par exemple, à la quantité nécessaire de la substance d'essai pour obtenir la concentration expérimentale voulue. Ce mélange de sable quartzique et de la substance d'essai est ajouté au sol préhumidifié, auquel il est mélangé complètement après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est réparti entre les récipients d'essai. On répète la procédure pour chaque concentration expérimentale et on prépare un témoin approprié de 2,0 à 2,5 g de sable quartzique finement broyé par récipient d'essai.

25. La concentration de la substance d'essai dans le sol est déterminée après chargement. La répartition homogène de la substance d'essai dans le sol est contrôlée avant l'introduction des organismes d'essai. La méthode de chargement choisie et les raisons de ce choix sont notées (24).

26. Idéalement, il convient d'établir un équilibre entre le sol et l'eau interstitielle avant l'ajout des organismes; une période de quatre jours à 20 °C est recommandée. Pour un grand nombre de substances chimiques organiques faiblement solubles dans l'eau, le laps de temps nécessaire pour qu'un véritable équilibre soit atteint entre les parties adsorbées et dissoutes peut s'étendre sur plusieurs jours ou plusieurs mois. Selon l'objectif de l'étude, par exemple lorsqu'il s'agit de simuler des conditions environnementales, il peut être nécessaire de «vieillir» plus longtemps le sol chargé [trois semaines à 20 °C pour les métaux notamment (22)].

Élevage des animaux d'essai

27. Il est préférable de conserver les vers en élevage de laboratoire permanent. Des conseils sur les méthodes d'élevage en laboratoire concernant *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*, et les espèces enchytrées figurent à l'appendice 5 [voir aussi (48), (51) et (52)].

28. Il convient que les vers utilisés dans les essais ne présentent pas de maladies, anomalies ou parasites observables.

DÉROULEMENT DE L'ESSAI

29. Les organismes d'essai sont exposés à la substance d'essai durant la phase d'absorption. La phase d'absorption dure 14 jours (enchytrées) ou 21 jours (vers de terre) sauf s'il est prouvé que l'état stationnaire a été atteint.

▼M4

30. Pour la phase d'élimination, les vers sont transférés sur un sol dépourvu de la substance d'essai. Le premier échantillon est prélevé de 4 à 24 h après le début de la phase d'élimination. L'appendice 3 donne des exemples de programme d'échantillonnage pour une phase d'absorption de 21 jours et une phase d'élimination de 21 jours.

Organismes d'essai

31. Chez de nombreuses espèces d'oligochètes terrestres, le poids individuel est très faible (5 à 10 mg de poids humide par individu pour *Enchytraeus albidus* et moins pour *Enchytraeus crypticus* ou *Enchytraeus luxuriosus*); la pesée et l'analyse chimique peuvent nécessiter de réunir les vers des récipients de réplicats (tous les vers d'un récipient de réplicat sont utilisés afin d'obtenir un seul résultat pour les tissus analysés). Vingt enchytrées sont ajoutés à chaque réplicat, et au moins trois réplicats sont utilisés. Si la limite de détection analytique de la substance d'essai est élevée, il peut être nécessaire d'utiliser un plus grand nombre de vers. Pour les espèces d'essai de poids individuel supérieur (*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*), il est possible de recourir à des récipients de réplicats contenant un seul individu.

32. Il convient que les vers de terre utilisés lors d'un essai soient de poids similaire (*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* ont par exemple un poids individuel de 250 à 600 mg). Les enchytrées (*Enchytraeus albidus* notamment) mesurent environ 1 cm de long. Tous les vers utilisés pour un même essai proviennent de la même source et sont adultes (avec un clitellum) (appendice 5). Le poids et l'âge d'un animal pouvant influer sur les valeurs de FBA (par exemple, du fait d'une teneur en lipides variable et/ou de la présence d'œufs), ces paramètres sont consignés avec précision, et pris en compte dans l'interprétation des résultats. De plus, des cocons sont susceptibles d'apparaître pendant la période d'exposition, ce qui a également des répercussions sur les valeurs de FBA. Il est recommandé de peser un sous-échantillon des vers avant l'essai afin d'estimer les poids humides et secs moyens.

33. Un rapport sol/vers élevé est utilisé afin de minimiser la baisse de la concentration de la substance d'essai dans le sol durant la phase d'absorption. Il est recommandé que ce rapport s'élève au minimum, pour *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*, à 50 g de poids sec de sol par ver et, pour les enchytrées, à 10-20 g de poids sec de sol par récipient d'essai. La couche de sol contenu dans les récipients a une épaisseur de 2 à 3 cm (enchytrées) ou de 4 à 5 cm (vers de terre).

34. Les vers utilisés lors d'un essai sont extraits du milieu d'élevage (les enchytrées par exemple à l'aide de pinces de joaillier). Les animaux adultes sont transférés pour acclimatation sur un sol d'essai non traité, puis nourris (voir le paragraphe 36). Si les conditions d'essai diffèrent des conditions d'élevage, une phase d'acclimatation de 24 à 72 h devrait suffire à l'adaptation des vers aux conditions d'essai. Une fois acclimatés, les vers de terre sont transférés dans des récipients en verre (des boîtes de Petri par exemple) contenant une eau propre pour y être rincés, puis ils sont pesés avant d'être déposés sur le sol d'essai. Avant la pesée, tout excès d'eau est enlevé en tapotant délicatement les vers contre le bord du récipient ou en les séchant précautionneusement à l'aide d'une serviette en papier légèrement humidifiée.

35. Le comportement d'enfouissement des organismes d'essai est observé et consigné. Dans les essais menés avec des vers de terre, les animaux (témoins et traités) s'enfouissent dans le sol normalement en quelques heures; ceci est vérifié 24 h maximum après l'ajout des vers dans le récipient d'essai. Si ce n'est pas le cas (par exemple, plus de 10 % ne s'enfouissent pas pendant plus de la moitié de la phase d'absorption), soit les

▼M4

conditions d'essai ne sont pas appropriées, soit les organismes d'essai ne sont pas en bonne santé. Il conviendra alors d'arrêter l'essai et de le répéter. Les enchytrées vivant essentiellement dans les pores interstitiels du sol, il arrive souvent que leur tégument soit seulement partiellement en contact avec le substrat environnant. On suppose que l'exposition des enchytrées enfouis et non enfouis est équivalente, et le non-enfouissement des enchytrées n'exige pas nécessairement de répéter l'essai.

Alimentation

36. L'alimentation des organismes d'essai est envisagée si le sol utilisé présente une faible teneur en carbone organique total. Avec un sol artificiel, il est recommandé d'alimenter les vers suivant une fréquence hebdomadaire (une fois par semaine) à raison de 7 mg de fumier séché par gramme de masse sèche du sol pour les vers de terre, et de 2 à 2,5 mg de flocons d'avoine moulus par gramme de masse sèche du sol pour les enchytrées (11). La première ration est mélangée au sol immédiatement avant l'ajout des organismes d'essai. Il convient d'employer, de préférence, le même type d'alimentation que pour l'élevage (appendice 5).

Régime d'éclairage et température

37. Les essais sont menés suivant un cycle contrôlé de 16/8 heures de lumière/obscurité, avec une intensité lumineuse comprise de préférence entre 400 et 800 lx au niveau des récipients d'essai (3). La température est maintenue à 20 ± 2 °C tout au long de l'essai.

Concentrations d'essai

38. Une seule concentration est utilisée. Les cas où une ou plusieurs concentrations seraient requises font l'objet d'une justification. Si la toxicité (CE_x) de la substance d'essai est voisine de la limite de détection analytique, on recommande l'utilisation d'une substance d'essai radiomarquée, de radioactivité spécifique élevée. Pour les métaux, la concentration devra être supérieure à la concentration de fond dans les tissus et le sol.

Réplicats

39. Concernant les mesures de cinétique (phase d'absorption et d'élimination), le nombre minimum de récipients de réplicats traités devra être de trois par point d'échantillonnage. Le nombre total de réplicats préparés suffira à couvrir tous les temps de prélèvement prévus au cours des phases d'absorption et d'élimination.

40. Pour les observations et les mesures biologiques (rapport poids sec/poids humide, teneur en lipides) et pour l'analyse des concentrations de fond dans les vers et le sol, au moins 12 récipients de réplicats d'un témoin négatif (quatre échantillons prélevés au démarrage, quatre à la fin de la phase d'absorption et quatre à la fin de la phase d'élimination) sont fournis, si aucun solvant autre que l'eau n'a été utilisé. Si un agent de solubilisation est utilisé pour l'application de la substance d'essai, il convient de prévoir, en plus des réplicats traités, des témoins solvant (quatre récipients de réplicats devront faire l'objet d'un prélèvement au démarrage, quatre à la fin de la phase d'absorption et quatre à la fin de la phase d'élimination) contenant tous les constituants, à l'exception de la substance d'essai. Dans ce cas, quatre récipients supplémentaires de réplicats d'un témoin négatif (sans solvant) pourront également être fournis pour procéder à un nouvel échantillonnage à la fin de la phase d'absorption. Ces réplicats pourront être comparés biologiquement avec le témoin solvant afin d'obtenir des informations sur une éventuelle influence du solvant sur les organismes d'essai. Il est recommandé de prévoir un nombre suffisant de récipients supplémentaires de réplicats de réserve (huit, par exemple) pour les vers traités et les vers témoins.

▼M4

Fréquence des mesures de la qualité du sol

41. Le pH et le taux d'humidité du sol sont mesurés au début et à la fin des phases d'absorption et d'élimination. La température de la chambre d'essai est relevée en continu. Il convient de contrôler l'humidité du sol une fois par semaine en pesant les récipients d'essai et en comparant leur poids au moment des contrôles avec leur poids en début d'essai. Les pertes d'humidité sont compensées par l'ajout d'eau désionisée.

Échantillonnage et analyse des vers et du sol

42. L'appendice 3 donne un exemple de programme d'échantillonnage pour les phases d'absorption et d'élimination des essais de bioaccumulation sur les vers de terre et les enchytrées.

43. Un échantillon du sol est prélevé dans les récipients d'essai pour déterminer la concentration de la substance d'essai avant l'introduction des vers, puis durant les phases d'absorption et d'élimination. Pendant l'essai, les concentrations de la substance d'essai sont déterminées dans les vers et dans le sol. En règle générale, on mesure les concentrations totales dans le sol. On peut également mesurer les concentrations dans l'eau interstitielle; dans ce cas, il convient de justifier ce choix et de décrire les méthodes appropriées prévues avant le début de l'étude, puis de consigner ces informations dans le rapport.

44. Les vers et le sol sont échantillonnés au moins à six reprises durant les phases d'absorption et d'élimination. Si la stabilité d'une substance d'essai est démontrée, le nombre d'analyses du sol peut être réduit. Il est recommandé d'analyser au moins trois réplicats au début et à la fin de la phase d'absorption. Si la concentration mesurée dans le sol à la fin de la phase d'absorption s'écarte de la concentration initiale de plus de 30 %, les échantillons de sol prélevés à d'autres dates sont également analysés.

45. Enlever du sol les vers d'un réplicat donné à chaque temps de prélèvement (par exemple, après avoir étalé le sol du réplicat sur un plateau peu profond et prélevé les vers à l'aide d'une pince de joaillier), les rincer rapidement à l'eau dans un récipient peu profond en verre ou en acier. Enlever l'eau en excès (voir le paragraphe 34). Transférer délicatement les vers dans un récipient préalablement taré, et les peser immédiatement, en incluant le contenu de l'intestin.

46. Les vers de terre (*Eisenia* sp.) doivent pouvoir purger leur intestin pendant la nuit, par exemple sur un papier filtre humide dans une boîte de Petri fermée (voir paragraphe 34). Après la purge, il convient de déterminer le poids des vers afin d'évaluer la perte éventuelle de biomasse pendant l'essai (voir les critères de validité au paragraphe 17). La pesée et l'analyse des tissus des enchytrées sont effectuées sans purge, ceci étant techniquement difficile en raison de la petite taille de ces vers. Une fois le poids final déterminé, les vers sont tués immédiatement, en utilisant la méthode la plus appropriée (par exemple avec de l'azote liquide, ou en congelant les vers à une température inférieure à - 18 °C).

47. Durant la phase d'élimination, les vers remplacent le contenu contaminé de leur intestin par des éléments du sol propre. Autrement dit, les mesures réalisées sur un échantillon de vers qui ne se sont pas purgés (les enchytrées en l'occurrence) immédiatement avant la phase d'élimination incluent le sol contaminé présent dans l'intestin. S'agissant des oligochètes aquatiques, on suppose qu'après les 4 à 24 h initiales de la phase d'élimination, l'essentiel du contenu intestinal contaminé a été remplacé par du sédiment propre [voir notamment (46)]. Des observations similaires ont été rapportées pour les vers de terre lors d'études sur l'accumulation de cadmium et de zinc radiomarqués (78). Chez les enchytrées ne s'étant pas purgés, la concentration de ce premier échantillon de la phase d'élimination peut être considérée comme la concentration dans les tissus après la purge de l'intestin. Pour tenir compte de la dilution de la concentration de la substance d'essai par du sol non contaminé durant la phase d'élimination, il est possible d'estimer le poids du contenu de l'intestin à partir des rapports poids des vers humides/poids des cendres de vers ou poids des vers secs/poids des cendres de vers.

▼M4

48. Il est préférable d'analyser les échantillons de sol et de vers immédiatement après extraction (c'est-à-dire dans les 1 à 2 jours suivants) afin d'éviter des dégradations ou d'autres pertes, et il est recommandé de calculer les vitesses approximatives d'absorption et d'élimination pendant le déroulement de l'essai. Si l'analyse est retardée, les échantillons devront être stockés suivant une méthode appropriée, par exemple, en procédant à leur congélation (≤ - 18 °C).

49. Il conviendra de vérifier que la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique, ainsi que la récupération de la substance d'essai dans les échantillons de sol et de vers sont satisfaisantes pour la méthode donnée; l'efficacité d'extraction, la limite de détection et la limite de quantification devront être consignées. De même, il faudra s'assurer que la substance d'essai n'est pas détectable dans les récipients témoins à des concentrations supérieures à la concentration de fond. Si la concentration de la substance d'essai dans l'organisme d'essai C_a est > 0 pour les vers témoins, il faudra l'inclure au calcul des paramètres cinétiques (appendice 2). Pendant toute la durée de l'essai, tous les échantillons sont manipulés de façon à réduire au minimum les contaminations et les pertes (résultant, par exemple, de l'adsorption de la substance d'essai sur le dispositif d'échantillonnage).

50. En cas d'utilisation de substances d'essai radiomarquées, il est possible d'analyser le produit parent et les métabolites. Une quantification de la substance d'essai parente et des métabolites à l'état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption fournit des informations importantes. Les échantillons sont alors nettoyés de façon à pouvoir quantifier séparément la substance d'essai parente. Si des métabolites simples excèdent 10 % de la radioactivité totale du ou des échantillons analysés, l'identification de ces métabolites est recommandée.

51. La récupération globale et la récupération de la substance d'essai dans les vers, le sol, et le cas échéant, dans les pièges contenant des absorbants permettant de retenir la substance d'essai évaporée, sont consignées et rapportées.

52. Le regroupement d'individus échantillonnés à partir d'un récipient d'essai donné est acceptable pour les enchytrées, plus petits que les vers de terre. Si ce regroupement implique de réduire le nombre de réplicats, cela restreint les procédures statistiques pouvant s'appliquer aux données. Si une procédure et une puissance statistiques spécifiques sont requises, alors l'essai comprend un nombre adéquat de récipients de réplicats, adapté aux quantités, à la procédure et à la puissance voulues.

53. Il est recommandé d'exprimer le FBA à la fois comme une fonction du poids sec total et, si nécessaire (à savoir pour des substances fortement hydrophobes), comme une fonction de la teneur en lipides. La teneur en lipides est déterminée par des méthodes appropriées [certaines méthodes existantes, voir par exemple (31) ou (58), ont besoin d'être adaptées à cette fin]. Ces méthodes s'appuient sur une technique d'extraction au chloroforme/méthanol. Toutefois, afin d'éviter l'utilisation de solvants chlorés, il convient d'utiliser une version modifiée de la méthode de Bligh et Dyer (9) qui est décrite dans (17). Comme les diverses méthodes ne conduisent pas forcément à des valeurs identiques, il est important de détailler la méthode employée. Lorsque cela est possible, c'est-à-dire si on dispose de suffisamment de tissu de vers, la teneur en lipides est, idéalement, analysée à partir du même échantillon ou extrait que la substance d'essai, l'extrait devant souvent être débarrassé de ses lipides avant d'être analysé par chromatographie (49). Une autre possibilité consiste à mesurer la teneur en lipides sur des animaux témoins et à utiliser la valeur obtenue pour normaliser les valeurs de FBA. Cette dernière approche réduit la contamination de l'équipement par la substance d'essai.

▼M4

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

54. On obtient la courbe d'absorption de la substance d'essai en portant la concentration de la substance d'essai dans/sur les vers durant la phase d'absorption en fonction du temps, en échelle arithmétique. Lorsque la courbe atteint un plateau ou état stationnaire (voir les définitions à l'appendice 1), le facteur de bioaccumulation à l'état stationnaire (FBAss) est calculé à l'aide de la formule suivante:

$$\frac{C_a \text{ à l'état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption (moyenne)}}{C_s \text{ à l'état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption (moyenne)}}$$

C_a représente la concentration de la substance d'essai dans l'organisme d'essai, et

C_s la concentration de la substance d'essai dans le sol.

55. Si la courbe n'atteint pas de plateau, le FBA_K, fondé sur les constantes de vitesse, devra être déterminé à la place du BAFss comme suit:

— déterminer le facteur d'accumulation (FBA_K) comme le rapport k_s/k_e,

— les vitesses d'absorption et d'élimination sont calculées de préférence simultanément (voir l'équation 11 à l'appendice 2),

— La constante de vitesse d'élimination (k_e) est généralement déterminée à partir de la courbe d'élimination (c'est-à-dire du tracé de la concentration de la substance d'essai dans les vers durant la phase d'élimination). La constante de vitesse d'absorption k_s est ensuite calculée en fonction de k_e et d'une valeur de C_a qui est dérivée de la courbe d'absorption – voir la description de ces méthodes à l'appendice 2. La méthode préférée pour l'obtention du FBAK et des constantes de vitesse, k_s et k_e, consiste à utiliser des méthodes informatisées non linéaires d'estimation des paramètres. Si la courbe d'élimination n'obéit manifestement pas à une cinétique du premier ordre, des modèles plus complexes devront alors être utilisés.

Rapport d'essai

56. Le rapport d'essai comporte les informations suivantes:

Substance d'essai:

— toute information disponible sur la toxicité aiguë ou à long terme (par exemple CE_x, CL_x, CSEO) de la substance d'essai vis-à-vis des oligochètes fouisseurs,

— pureté, état physique et propriétés physico-chimiques, par exemple log K_{ow}, solubilité dans l'eau,

— données d'identification de la substance; provenance de la substance d'essai, identité et concentration des solvants éventuellement utilisés,

— en cas d'utilisation d'une substance d'essai radiomarquée, position précise des atomes marqués, radioactivité spécifique et pureté radiochimique.

Espèces d'essai:

— nom scientifique, souche, source, traitement préalable éventuel, acclimatation, âge, taille, etc.

▼M4

Conditions d'essai:

— procédure d'essai utilisée,

— type et caractéristiques de l'éclairage utilisé et photopériode(s),

— protocole d'essai (par exemple, nombre et dimension des récipients d'essai, masse du sol et épaisseur de la couche de sol, nombre de réplicats, nombre de vers par réplicat, nombre de concentrations d'essai, durée des phases d'absorption et d'élimination, fréquence d'échantillonnage),

— justification du matériau choisi pour les récipients d'essai,

— méthode de préparation et d'application de la substance d'essai, ainsi que raisons du choix de la méthode,

— concentrations d'essai nominales, moyennes et écarts-types des valeurs mesurées dans les récipients d'essai, et méthode d'obtention de ces valeurs,

— source des constituants du sol artificiel ou – si un milieu naturel est utilisé – origine du sol, description d'un éventuel traitement préalable, résultats des contrôles (survie, augmentation de la biomasse, reproduction), caractéristiques du sol [pH, teneur totale en carbone organique, distribution granulométrique (pourcentage de sable, de limon et d'argile), capacité maximale de rétention d'eau (CRE_{max}), teneur en eau au début et à la fin de l'essai, et toutes autres mesures réalisées],

— informations détaillées sur le traitement des échantillons de sol et de vers, y compris les détails concernant la préparation, le stockage, les procédures de chargement en substance d'essai, l'extraction et les procédures analytiques (et leur précision) pour la substance d'essai dans les vers et le sol, la teneur en lipides (si mesurée), et les méthodes de récupération de la substance d'essai.

Résultats:

— mortalité des vers témoins et des vers dans chaque récipient d'essai et éventuel comportement anormal observé (par exemple, évitement du sol, absence de reproduction lors d'un essai de bioaccumulation chez les enchytrées),

— rapport poids sec/poids humide du sol et des organismes d'essai (utiles pour la normalisation),

— poids humides des vers à chaque temps de prélèvement; pour les vers de terre, poids humides au début de l'essai, et à chaque temps de prélèvement avant et après la purge de l'intestin,

— teneur en lipides des organismes d'essai (si déterminée),

— courbes montrant les constantes cinétiques d'absorption et d'élimination de la substance d'essai chez les vers, et la durée pour atteindre l'état stationnaire,

— C_a et C_s (avec écart-type et fourchette, si nécessaire) pour tous les temps de prélèvement (C_a exprimé en $g.kg^{-1}$ de poids humide et sec du corps entier, C_s exprimé en $g.kg^{-1}$ du poids humide et sec). Si un facteur d'accumulation biote-sol (BSAF) est nécessaire (par exemple, pour une comparaison des résultats entre deux essais ou plus réalisés avec des animaux de teneurs en lipides différentes), C_a est en plus être exprimé en $g.kg^{-1}$ de teneur en lipides de l'organisme et C_s est exprimé en $g.kg^{-1}$ de carbone organique (CO) du sol,

— FBA (exprimé en kg de sol kg^{-1} de ver), constante de vitesse d'absorption du sol k_s (exprimée en g de sol kg^{-1} de vers j^{-1}), et constante de vitesse d'élimination k_e (exprimée en j^{-1}); éventuellement, BSAF (exprimé en kg de CO du sol kg^{-1} de teneur en lipides des vers),

▼M4

— le cas échéant: pourcentages de substance parente, de métabolites et de résidus liés (c'est-à-dire le pourcentage de substance d'essai ne pouvant être extraite par les méthodes d'extraction courantes) détectés dans le sol et les animaux d'essai,

— méthodes utilisées pour les analyses statistiques des données.

Évaluation des résultats:

— conformité des résultats avec les critères de validité tels qu'énoncés au paragraphe 17,

— résultats inattendus ou inhabituels, par exemple élimination incomplète de la substance d'essai des animaux d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

(1) Amorim M. (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

(2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 pp.

(4) Beek B., Boehling S., Bruckmann U., Franke C., Joehncke U., Studinger G. (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(5) Belfroid A., Sikkenk M., Seinen W., Van Gestel C., Hermens J. (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.

(6) Belfroid A., Van Wezel A., Sikkenk M., Van Gestel C., Seinen W. & Hermens J. (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.

(7) Belfroid A., Meiling J., Drenth H., Hermens J., Seinen W., Van Gestel C. (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.

(8) Bell A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.

(9) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

(10) Bouché M. (1972). Lombriciens de France. Écologie et systématique. INRA, Annales de zoologie-écologie animale, Paris, 671 p.

(11) Bruns E., Egeler Ph., Moser T., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E., Egeler Ph., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185-196.

(13) Conder J.M. and Lanno R.P. (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. J. Soils Sediments 3: 13-20.

▼M4

(14) Connell D.W. and Markwell R.D. (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91-100.

(15) Didden W.A.M. (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2-29.

(16) Didden W. (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, p. 555-576.

(17) De Boer J., Smedes F., Wells D., Allan A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich D.R., Schmid P., Zweifel U., Schlatter C., Jenni-Eiermann S., Bachmann H., Bühler U., Zbinden N. (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140-145.

(19) Règlement (CE) nº 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) nº 793/93 du Conseil et le règlement (CE) nº 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission (JO L 396 du 30.12.2006, p. 1).

(20) Edwards C.A. and Bohlen P.J. (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

(21) OCDE (2008). Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fouisseurs, ligne directrice 315 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.

(22) Egeler Ph., Gilberg D., Scheffczyk A., Moser Th. and Römbke J. (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No: 204 67 458: 149 pp. Le document peut être téléchargé à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

(23) Elmegaard N. and Jagers op Akkerhuis G.A.J.M. (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

(24) Environnement Canada (1995). Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiments de contrôle dopé avec un produit toxique de référence, Série de la protection de l'environnement, Rapport SPE 1/RM/30.

(25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.

(27) Franke C., Studinger G., Berger G., Böhling S., Bruckmann U., Cohors-Fresenborg D., Jöhncke U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501-1514.

(28) Füll C. (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

(29) Füll C., Schulte C., Kula C. (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.

(30) Gabric A.J., Connell D.W., Bell P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225-1231.

(31) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A., Parrish C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.

(32) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(33) Hund-Rinke K. and Wiechering H. (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15-20.

(34) Hund-Rinke K., Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.

(35) ISO 11268-2 (1998), Qualité du sol – Effets des polluants vis- à-vis des vers de terre *(Eisenia fetida),* Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction.

(36) Jaenike J. (1982). «*Eisenia foetida*» is two biological species. Megadrilogica 4: 6-8.

(37) Jager T. (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080-2090.

(38) Jager T., Sanchez P.A., Muijs B., van der Welde E., Posthuma L. (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.

(39) Jager T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A.C., Hogendoorn E.A., DeJong A., Kruitbosch J.A.W., Peijnenburg W.J.G.M. (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767-775.

(40) Jager T., Fleuren R.L.J., Hoogendoorn E., de Korte G. (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399-3404.

(41) Janssen M.P.M., Bruins A., De Vries T.H., Van Straalen N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(42) Kasprzak K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217-232.

(43) Khalil A.M. (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

(44) Landrum P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.

(45) Marinussen M.P.J.C., Van der Zee S.E.A.T.M., De Haan F.A. (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.

(46) Mount D.R., Dawson T.D., Burkhard L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.

▼M4

(47) Nendza M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Chapitre C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre.

(49) Chapitre C.13 de la présente annexe, Bioconcentration: essai avec renouvellement continu sur les poissons.

(50) Chapitre C.21 de la présente annexe, Microorganismes du sol: essai de transformation de l'azote.

(51) OCDE (2004ba) Essai de reproduction chez l'enchytrée. Ligne directrice 220 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques; OCDE, Paris.

(52) OCDE (2004b) Essai de reproduction chez le lombric (Eisenia fetida/Eisenia andrei). Ligne directrice 222 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques; OCDE, Paris.

(53) OCDE (2008) Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fouisseurs. Ligne directrice 315 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques; OCDE, Paris.

(54) Petersen H. and Luxton M. (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

(55) Phillips D.J.H. (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

(56) Pflugmacher J. (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.

(57) Posthuma L., Weltje L., Anton-Sanchez F.A. (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

(58) Randall R.C., Lee II H., Ozretich R.J., Lake J.L., Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431-1436.

(59) Römbke J., Egele P., Füll C. (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke J. and Moser Th. (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/1999: 373 pp.

(61) Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

(62) Romijn C.A.F.M., Luttik R., Van De Meent D., Slooff W.,Canton J.H. (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107-127.

(63) Sample B.E., Suter D.W., Beauchamp J.J., Efroymson R.A. (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H.-J. and Riepert F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R. and Collado R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. novembre, a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

(66) Sims R.W. and Gerard B.M. (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa J.P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M. (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

(68) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(69) Stephenson G.L., Kaushik A., Kaushik N.K., Solomon K.R., Steele T., Scroggins R.P. (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds). Setac Press, Pensacola, 67-81.

(70) Sterenborg I., Vork N.A., Verkade S.K., Van Gestel C.A.M., Van Straalen N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation – Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

(72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(73) Van Brummelen T.C. and Van Straalen N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

(74) Van Gestel C.A.M. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H., Edwards, P.J., Greig-Smith, P.W. & Heimbach, F.). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel C.A. and Ma W.-C. (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023-1033.

(76) Van Straalen N.M., Donker M.H., Vijver M.G., van Gestel C.A.M. (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409-417.

(77) Venter J.M. and Reinecke A.J. (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161-165.

(78) Vijver M.G., Vink J.P.M., Jager T., Wolterbeek H.T., van Straalen N.M., van Gestel C.A.M. (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843-1851.

(79) Widianarko B. and Van Straalen N.M. (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

Appendice 1

DÉFINITIONS

La bioaccumulation est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant. La bioaccumulation est le résultat combiné des processus de bioconcentration et de bioamplification (voir ci-dessous).

La bioconcentration est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, résultant de l'absorption de la substance exclusivement depuis le milieu environnant (à savoir via la surface du corps et le sol ingéré), par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant.

La bioamplification est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, résultant principalement de l'absorption d'aliments ou de proies contaminés, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans l'alimentation ou la proie. La bioamplification peut conduire à un transfert ou à une accumulation de la substance d'essai dans les réseaux trophiques.

L'élimination d'une substance est la perte de cette substance par les tissus de l'organisme d'essai selon des processus actifs ou passifs survenant indépendamment de la présence ou de l'absence de la substance d'essai dans le milieu environnant.

Le facteur de bioaccumulation (FBA) à n'importe quel instant de la phase d'absorption de l'essai de bioaccumulation, est la concentration de la substance d'essai dans ou sur l'organisme d'essai (C_a en $g.kg^{-1}$ de poids humide ou sec de ver) divisée par la concentration de la substance dans le milieu environnant (C_s en $g.kg^{-1}$ de poids de sol humide ou sec). Le FBA est exprimé en kg de sol kg^{-1} de ver.

Le facteur de bioaccumulation à l'état stationnaire (FBAss), qui est le FBA à l'état stationnaire, ne varie pas de façon significative pendant une longue période, la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant (C_s en g kg^{-1} de poids de sol sec) étant constante pendant cette période.

Les facteurs de bioaccumulation calculés directement à partir du rapport de la constante de vitesse d'absorption du sol divisée par la constante de vitesse d'élimination (k_s et k_e, voir ci-dessous), sont appelés facteurs de bioaccumulation cinétiques (FBA_K).

Le facteur d'accumulation biote-sol (BSAF) est la concentration de la substance d'essai normalisée par rapport aux lipides dans/sur l'organisme d'essai, divisée par la concentration de la substance d'essai normalisée par rapport au carbone organique, dans le sol à l'état stationnaire. C_a est alors exprimée en $g.kg^{-1}$ de teneur en lipides de l'organisme, et C_s en $g.kg^{-1}$ de teneur en carbone organique du sol; le BSAF est exprimé en kg de $CO.kg^{-1}$ de lipides.

Un plateau ou état stationnaire est défini comme l'équilibre entre les processus d'absorption et d'élimination survenant simultanément durant la phase d'exposition. L'état stationnaire est atteint, dans le tracé du FBA en fonction du temps, lorsque la courbe devient parallèle à l'axe des temps et que trois analyses successives de FBA réalisées sur des échantillons pris à intervalles d'au moins deux jours ne diffèrent pas de plus de 20 % les uns des autres et qu'il n'y a pas de différence statistique significative entre les trois périodes d'échantillonnage. Pour les substances d'essai absorbées lentement, des intervalles plus appropriés seraient de sept jours (49).

Le coefficient de partage carbone organique-eau (K_{co}) est le rapport de la concentration d'une substance dans/sur la fraction de carbone organique d'un sol et de la concentration de substance dans l'eau à l'équilibre.

Le coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}) est le rapport des solubilités de la substance dans le n-octanol et dans l'eau à l'équilibre; il est parfois exprimé par P_{ow}. Le logarithme de K_{ow} ($\log K_{ow}$) est utilisé comme indicateur du potentiel de bioaccumulation de la substance par les organismes aquatiques.

▼M4

La phase d'absorption ou d'exposition est la durée pendant laquelle les organismes d'essai sont exposés à la substance d'essai.

La constante de vitesse d'absorption du sol (k_s) est la valeur numérique définissant la vitesse d'augmentation de la concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai résultant de l'absorption de la phase du sol. k_s est exprimé en g de sol kg^{-1} de ver j^{-1}.

La phase d'élimination est la durée, suite au transfert des organismes d'essai depuis un milieu contaminé dans un milieu dépourvu de la substance d'essai, durant laquelle est étudiée l'élimination (ou la perte nette) de la substance par les organismes d'essai.

La constante de vitesse d'élimination (k_e) est la valeur numérique définissant la vitesse de réduction de la concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai, suite au transfert des organismes d'essai depuis un milieu contenant l'élément d'essai vers un milieu dépourvu de cette substance. k_e est exprimé en j^{-1}.

Une substance d'essai est toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

▼M4

Appendice 2

Calcul des paramètres d'absorption et d'élimination

Le principal effet observé d'un essai de bioaccumulation est le facteur de bioaccumulation, FBA. Il est possible de calculer le FBA en divisant la concentration dans l'organisme d'essai, C_a, par la concentration dans le sol, C_s, à l'état stationnaire. Si l'état stationnaire n'est pas atteint durant la phase d'absorption, le FBA_K est calculé à partir des constantes de vitesse et non du FBAss. Il convient d'indiquer si le FBA est basé, ou non, sur des concentrations à l'état stationnaire.

La procédure habituelle pour obtenir le facteur de bioaccumulation cinétique (FBA_K), la constante de vitesse d'absorption du sol (k_s) et la constante de vitesse d'élimination (k_e) consiste à faire à appel à des méthodes informatisées non linéaires d'estimation des paramètres, par exemple à partir des modèles décrits dans (68). D'après un ensemble de valeurs séquentielles de la concentration en fonction du temps et les équations de modèles:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[équation 1]}$$

ou

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[équation 2]}$$

où:

C_a = concentration de la substance dans les vers [$g.kg^{-1}$ de poids humide ou sec]

k_s = constante de vitesse d'absorption dans les tissus [g de sol kg^{-1} de ver j - 1]

C_s = concentration de la substance dans le sol [$g.kg^{-1}$ de poids humide ou sec]

k_e = constante de vitesse d'élimination [j - 1]

t_c = temps à la fin de la phase d'absorption,

ces programmes informatiques calculent les valeurs de FBA_K, k_s et k_e.

Lorsque la concentration de fond dans les vers non exposés, par exemple au jour 0, diffère sensiblement de zéro (cela peut être le cas pour les métaux notamment), cette concentration ($C_{a,0}$) est incluse dans ces équations comme suit:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[équation 3]}$$

et

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[équation 4]}$$

Dans les cas où l'on observe une forte baisse de la concentration de la substance d'essai dans le sol durant la phase d'absorption, il est possible de recourir aux modèles suivants (par exemple, (67) et (79):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \qquad \text{[équation 5]}$$

▼**M4**

où:

C_s = concentration de la substance dans le sol [$g.kg^{-1}$ de poids humide ou sec]

k_0 = constante de vitesse de dégradation dans le sol [d^{-1}]

C_0 = concentration initiale de la substance dans le sol [$g.kg^{-1}$ de poids humide ou sec]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[équation 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[équation 7]}$$

où:

C_a = concentration de la substance dans les vers [$g.kg^{-1}$ de poids humide ou sec]

k_s = constante de vitesse d'absorption dans les tissus [g de sol kg^{-1} de vers j^{-1}]

k_0 = constante de vitesse de dégradation dans le sol [j - 1]

k_e = constante de vitesse d'élimination [j - 1]

t_c = temps à la fin de la phase d'absorption.

Lorsqu'on a atteint un état stationnaire durant la phase d'absorption (c'est-à-dire t = ∞), il est possible de réduire l'équation 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[équation 1]}$$

à:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

ou à

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[équation 8]}$$

Ensuite $k_s/k_e \times C_s$ donne une valeur approchée de la concentration de la substance d'essai dans le tissu du ver à l'état stationnaire ($C_{a,ss}$).

Le facteur d'accumulation biote-sol (BSAF) peut se calculer comme suit:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[équation 9]}$$

où f_{oc} est la fraction de carbone organique dans le sol, et f_{lip} est la fraction de lipides dans le ver, toutes deux étant déterminées, de préférence, sur des échantillons prélevés de l'essai, et basées respectivement soit sur le poids sec, soit sur le poids humide.

Il est possible de modéliser les constantes cinétiques d'élimination en utilisant les données issues de la phase d'élimination et en appliquant l'équation de modèle suivante et une méthode informatisée non linéaire d'estimation des paramètres. Si le tracé des données en fonction du temps indique une décroissance exponentielle constante de la concentration de la substance d'essai dans les animaux, le déroulement temporel de l'élimination peut être décrit par un modèle à un compartiment (équation 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[équation 10]}$$

▼M4

Les processus d'élimination semblent parfois se dérouler en deux étapes, montrant une décroissance rapide de C_a au cours des premières étapes, qui évolue vers une perte plus lente des éléments d'essai dans les étapes ultérieures de l'élimination [par exemple (27), (68)]. Les deux étapes peuvent être interprétées en faisant l'hypothèse de l'existence de deux compartiments dans l'organisme, compartiments à partir desquels la substance d'essai est éliminée à différentes vitesses. Dans ces cas particuliers, il convient d'étudier la littérature pertinente, par exemple (38), (39), (40), (78).

À l'aide des équations de modèles ci-dessus, on peut également calculer les paramètres cinétiques (k_s et k_e) en une seule fois, en appliquant un modèle de cinétique du premier ordre à toutes les données des phases d'absorption et d'élimination simultanément. Pour une description d'une méthode pouvant permettre un tel calcul combiné des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, consulter (41), (73) et (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[équation 11]}$$

Note: quand les paramètres d'absorption et d'élimination sont estimés simultanément à partir des données combinées d'absorption et d'élimination, «m» tel que mentionné dans l'équation 11 est un descripteur qui permet au programme informatique d'attribuer les sous-termes de l'équation aux ensembles de données de la phase correspondante et de faire une évaluation correcte (m = 1 pour la phase d'absorption; m = 2 pour la phase d'élimination).

Quoi qu'il en soit, ces équations de modèles seront utilisées avec précaution, en particulier lorsque des modifications de la biodisponibilité de la substance d'essai, ou (bio)dégradation, surviennent durant l'essai [voir notamment (79)].

▼M4

Appendice 3

EXEMPLES DE PROGRAMMES D'ÉCHANTILLONNAGE POUR DES ESSAIS DE BIOACCUMULATION DANS LE SOL

Essai sur des vers de terre

a) Phase d'absorption avec 8 dates d'échantillonnage pour le calcul des paramètres cinétiques

Jour	Activité
- 6	Conditionnement du sol préparé durant 48 h.
- 4	Chargement d'une fraction du sol avec la solution de la substance d'essai; évaporation de tout solvant; mélange des constituants du sol; répartition du sol dans les récipients d'essai; équilibration dans les conditions d'essai durant 4 jours (3 semaines pour les sols chargés en métaux).
- 3 à - 1	Séparation des organismes d'essai du milieu d'élevage pour acclimatation; préparation et humidification des constituants du sol.
0	Mesure de la température et du pH du sol; retrait d'échantillons de sol des récipients traités et des témoins au solvant pour la détermination de la concentration de la substance d'essai; ajout d'une ration alimentaire; pesée et distribution aléatoire des vers dans les récipients d'essai; conservation d'un nombre suffisant de sous-échantillons de vers pour la détermination des valeurs de fond analytiques, des poids humide et sec, ainsi que de la teneur en lipides; pesée de tous les récipients d'essai pour le contrôle de l'humidité du sol; contrôle de l'alimentation en air, en cas de système en circuit fermé.
1	Contrôle de l'alimentation en air, consignation du comportement des vers et de la température; prélèvement d'échantillons de sol et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai.
2	Comme le 1er jour.
3	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température.
4	Comme le 1er jour.
5 – 6	Comme le 3e jour.
7	Comme le 1er jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée.
8 – 9	Comme le 3e jour.
10	Comme le 1er jour.
11 – 13	Comme le 3e jour.
14	Comme le 1er jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée.
15 – 16	Comme le 3e jour.
17	Comme le 1er jour.
18 – 20	Comme le 3e jour.

▼**M4**

Jour	Activité
21	Comme le 1er jour; mesure de la température et du pH du sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai; fin de la phase d'absorption; transfert des vers des réplicats exposés restants vers des récipients contenant du sol propre pour la phase d'élimination (sans purge de l'intestin); échantillonnage du sol et des vers des témoins au solvant.
	Les activités préalables à l'exposition (phase d'équilibration) sont programmées en tenant compte des propriétés de la substance d'essai.
	Les activités décrites pour le 3e jour sont réalisées quotidiennement (au moins les jours ouvrés).

b) Phase d'élimination

Jour	Activité
- 6	Préparation et humidification des constituants du sol; conditionnement du sol préparé durant 48 h.
- 4	Mélange des constituants du sol; répartition du sol dans les récipients d'essai; incubation dans les conditions d'essai durant 4 jours.
0 (fin de la phase d'absorption)	Mesure de la température et du pH du sol; pesée et distribution aléatoire des vers dans les récipients d'essai; ajout d'une ration alimentaire; transfert des vers des réplicats exposés restants vers des récipients contenant du sol propre; prélèvement d'échantillons de sol et de vers après 4 à 6 h pour la détermination de la concentration de la substance d'essai.
1	Contrôle de l'alimentation en air, consignation du comportement des vers et de la température; prélèvement d'échantillons de sol et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai.
2	Comme le 1er jour.
3	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température.
4	Comme le 1er jour.
5 – 6	Comme le 3e jour.
7	Comme le 1er jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée.
8 – 9	Comme le 3e jour.
10	Comme le 1er jour.
11 – 13	Comme le 3e jour.
14	Comme le 1er jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée.
15 – 16	Comme le 3e jour.
17	Comme le 1er jour.

▼M4

Jour	Activité
18 – 20	Comme le 3e jour.
21	Comme le 1er jour; mesure de la température et du pH du sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai; échantillonnage du sol et des vers des témoins au solvant.
	La préparation du sol avant le début de la phase d'élimination intervient de la même manière qu'avant la phase d'absorption.
	Les activités décrites pour le 3e jour sont réalisées quotidiennement (au moins les jours ouvrés).

Essai sur des enchytrées

a) Phase d'absorption avec 8 dates d'échantillonnage pour le calcul des paramètres cinétiques

Jour	Activité
- 6	Conditionnement du sol préparé durant 48 h.
- 4	Chargement d'une fraction du sol avec la solution de la substance d'essai; évaporation de tout solvant; mélange des constituants du sol; répartition du sol dans les récipients d'essai; équilibration dans les conditions d'essai durant 4 jours (3 semaines pour les sols chargés en métaux).
- 3 à - 1	Séparation des organismes d'essai du milieu d'élevage pour acclimatation; préparation et humidification des constituants du sol.
0	Mesure de la température et du pH du sol; retrait d'échantillons de sol des récipients traités et des témoins au solvant pour la détermination de la concentration de la substance d'essai; ajout d'une ration alimentaire dans le sol; pesée et distribution aléatoire des vers dans les récipients d'essai; conservation de suffisamment de sous-échantillons de vers pour la détermination des valeurs de fond analytiques, du poids sec et humide et de la teneur en lipides; pesée de tous les récipients d'essai pour le contrôle de l'humidité du sol; contrôle de l'alimentation en air, en cas de système en circuit fermé.
1	Contrôle de l'alimentation en air, consignation du comportement des vers et de la température; prélèvement d'échantillons de sol et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai.
2	Comme le 1er jour.
3	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température.
4	Comme le 1er jour.
5 – 6	Comme le 3e jour.
7	Comme le 1er jour; ajout d'une ration alimentaire dans le sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée.
9	Comme le 1er jour.
10	Comme le 3e jour.

▼**M4**

Jour	Activité
11	Comme le 1er jour.
12 – 13	Comme le 3e jour.
14	Comme le 1er jour; ajout d'une ration alimentaire dans le sol; mesure de la température et du pH du sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai; fin de la phase d'absorption; transfert des vers des réplicats exposés restants vers des récipients contenant du sol propre pour la phase d'élimination (sans purge de l'intestin); échantillonnage du sol et des vers des témoins au solvant.
	Les activités préalables à l'exposition (phase d'équilibration) sont programmées en tenant compte des propriétés de la substance d'essai.
	Les activités décrites pour le 3e jour sont réalisées quotidiennement (au moins les jours ouvrés)

▼M4

Appendice 4

Sol artificiel – recommandations pour la préparation et le stockage

Les sols naturels provenant d'une source particulière ne sont pas toujours disponibles tout au long de l'année, et des organismes indigènes ainsi que la présence de micropolluants peuvent influer sur l'essai; il est donc recommandé d'utiliser un substrat artificiel, le sol artificiel décrit au chapitre C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre (48). Plusieurs espèces d'essai peuvent survivre, se développer et se reproduire dans ce sol, et une normalisation maximum doublée d'une comparabilité intra- et interlaboratoire des conditions d'essai et d'élevage est proposée.

Constituants du sol:

Tourbe:	10 %	Tourbe de sphaigne, conformément à la ligne directrice 207 de l'OCDE (48).
Sable quartzique:	70 %	Sable quartzique industriel (séché à l'air); taille des grains: plus de 50 % des particules seront dans une fourchette comprise entre 50 et 200 μm, mais toutes seront ≤ 2 mm.
Argile kaolinique:	20 %	Teneur en kaolinite ≥ 30 %.
Carbonate de calcium:	≤ 1 %	$CaCO_3$, pulvérisé, chimiquement pur.

Il est également possible de réduire la teneur en carbone organique du sol artificiel, notamment en abaissant la teneur en tourbe à 4-5 % de sol sec et en augmentant la teneur en sable en conséquence. Cette réduction de la teneur en carbone organique est susceptible de diminuer les possibilités d'adsorption de la substance d'essai sur le sol (carbone organique) et d'augmenter la disponibilité de la substance d'essai pour les vers (74). Il a été démontré que *Enchytraeus albidus* et *Eisenia fetida* peuvent satisfaire aux critères de validité concernant la reproduction lorsqu'ils sont testés sur des sols naturels dont la teneur en carbone organique est inférieure (2,7 %, par exemple) (33) et (61), et on a constaté expérimentalement qu'il pouvait en aller de même sur un sol artificiel renfermant 5 % de tourbe.

Préparation

Les constituants secs du sol sont soigneusement mélangés (par exemple, dans un grand mélangeur de laboratoire). Ce mélange est réalisé environ une semaine avant le début de l'essai. Le mélange sec de constituants du sol est humidifié avec de l'eau désionisée au moins 48 h avant l'application de la substance d'essai de manière à équilibrer/stabiliser l'acidité. Pour déterminer le pH, on utilisera un mélange de sol et d'une solution de 1 M KCl suivant un rapport de 1/5. Si le pH ne se trouve pas dans la plage requise (6,0 ± 0,5), soit on ajoute au sol une quantité suffisante de $CaCO_3$, soit on prépare un nouveau lot de sol.

La capacité maximale de rétention d'eau (CRE) du sol artificiel est déterminée conformément à la norme ISO 11268-2 (35). Au moins deux jours avant de démarrer l'essai, on humidifie le sol artificiel sec en ajoutant suffisamment d'eau désionisée ou reconstituée pour obtenir approximativement la moitié de la teneur finale en eau. Cette teneur finale en eau devrait représenter 40 % à 60 % de la CRE maximale. Au début de l'essai, on divise le sol préalablement humidifié en lots d'un nombre égal à celui des concentrations d'essai et des témoins utilisés pour l'essai, et, en employant la solution de la substance d'essai et/ou en ajoutant de l'eau désionisée ou reconstituée, on ajuste le taux d'humidité pour qu'il se trouve entre 40 et 60 % de la CRE_{max}. Le taux d'humidité est déterminé au début et à la fin de l'essai (à 105 °C). Il sera optimal pour satisfaire les exigences des espèces (le taux d'humidité peut aussi être contrôlé comme suit: le sol légèrement pressé dans la main doit laisser apparaître de petites gouttes d'eau entre les doigts).

▼**M4**

Stockage

Les constituants secs du sol artificiel peuvent être stockés à température ambiante jusqu'à leur utilisation. Le sol préparé, préhumidifié peut être stocké dans un endroit frais pendant maximum trois jours avant d'être chargé; il convient de veiller à minimiser l'évaporation de l'eau. Un sol chargé avec la substance d'essai sera utilisé immédiatement, sauf si des informations spécifient qu'il est possible de stocker ce sol sans affecter la toxicité et la biodisponibilité de la substance d'essai. Des échantillons de sol chargé peuvent alors être stockés dans les conditions recommandées pour la substance d'essai donnée jusqu'à l'analyse.

▼M4

Appendice 5

Espèces d'oligochètes terrestres recommandées pour les essais de bioaccumulation dans le sol

Vers de terre

L'espèce d'essai recommandée est *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), qui appartient à la famille des *Lumbricidae*. Depuis 1972, on la divise en deux sous-espèces [*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* (10)]. Selon Jaenike (36), il s'agit là de deux espèces à part entière. *Eisenia fetida* est facilement reconnaissable à ses larges bandes jaunes entre les segments alors qu'*Eisenia andrei* présente une couleur rouge foncé uniforme. Probablement originaires de la région de la mer Noire, elles sont aujourd'hui présentes partout dans le monde, surtout dans les habitats modifiés par les activités anthropiques comme les tas de compost. Toutes deux se prêtent à la réalisation d'essais écotoxicologiques et d'essais de bioaccumulation.

Eisenia fetida et *Eisenia andrei* sont disponibles dans le commerce, notamment comme appât pour la pêche. Par rapport à d'autres vers de terre de la même famille, ces deux espèces ont un cycle de vie court et atteignent leur maturité en 2 à 3 mois (à température ambiante). Leur température optimale oscille entre 20 et 24 °C. Elles préfèrent les substrats relativement humides, d'un pH presque neutre et à forte teneur en matière organique. Ces espèces étant largement utilisées dans les essais écotoxicologiques normalisés depuis environ 25 ans, leur élevage est bien établi (48) (77).

Ces deux espèces peuvent être élevées dans des déjections animales très diverses. Le milieu d'élevage recommandé par l'ISO (35) est un mélange 50/50 de crottin de cheval ou de bouse de vache et de tourbe. Le milieu aura un pH d'environ 6 à 7 (ajusté avec du carbonate de calcium), une faible conductivité ionique (une concentration de sels inférieure à 0,5 % ou à 6 mS/cm) et ne sera pas trop contaminé par de l'ammoniac ou des urines animales. Il est également possible d'utiliser de la terre de jardin, vendue dans le commerce, qui soit sans additifs, un sol artificiel tel que défini par l'OCDE (48), ou encore un mélange des deux, à parts égales (50/50). Le substrat sera humide, mais pas mouillé. Des boîtes d'élevage d'une capacité de 10 à 50 litres conviennent.

Pour obtenir une population de vers homogène quant à l'âge et à la masse, il vaut mieux commencer l'élevage avec des cocons. À cet effet, des vers adultes sont ajoutés à une boîte d'élevage qui contient du substrat frais pour produire des cocons. L'expérience a montré qu'une densité démographique d'environ 100 vers adultes par kg de substrat (poids humide) donne de bons taux de reproduction. Après 28 jours, les vers adultes sont retirés. Les vers de terre éclos sont utilisés pour les essais une fois adultes, soit 2 mois plus tard au moins mais pas au-delà de 12 mois.

Les vers des espèces décrites précédemment peuvent être considérés comme sains s'ils se déplacent dans le substrat, ne tentent pas de s'en échapper et se reproduisent continuellement. Une extrémité postérieure qui bouge très lentement ou qui est jaune (s'agissant d'*E. fetida*) indique un épuisement du substrat. Il est alors recommandé d'utiliser du substrat frais et/ou de réduire le nombre d'animaux par boîte.

Références bibliographiques complémentaires

Gerard B.M. (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O. (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J., Egeler P., Füll C. (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S. (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell J.E. (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims R.W. and Gerard B.M. (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin A.D. (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 pp.

Enchytrées

L'espèce d'essai recommandée est *Enchytraeus albidus*, Henle 1837 (ver blanc). *Enchytraeus albidus* est l'une des plus grosses espèces (jusqu'à 15 mm) de la famille des annélides oligochètes (*Enchytraeidae*) et c'est la plus répandue dans le monde (8). *Enchytraeus albidus* colonise des habitats marins, dulcicoles et terrestres, constitués la plupart du temps de matière organique en décomposition (algues, compost), et fréquente rarement les prairies (42). Le fait qu'il tolère une gamme étendue de conditions écologiques et certaines variations morphologiques indiquent qu'il pourrait exister différentes races.

Enchytraeus albidus est disponible dans le commerce, plus particulièrement sous forme de nourriture pour les poissons. Il convient de vérifier si l'élevage est contaminé par d'autres espèces, généralement plus petites (60). Dans l'affirmative, tous les vers sont lavés à l'eau dans une boîte de Petri. De grands spécimens adultes d'*Enchytraeus albidus* sont ensuite sélectionnés (à l'aide d'un stéréomicroscope) pour commencer un nouvel élevage. Tous les autres vers sont éliminés. Le cycle de vie de ces vers est court puisqu'ils arrivent à maturité entre 33 jours (à 18 °C) et 74 jours (à 12 °C). Seuls les vers ayant été conservés en laboratoire pendant au moins 5 semaines (une génération) sans problème devront être utilisés pour des essais.

D'autres espèces du genre *Enchytraeus* conviennent également, notamment *Enchytraeus luxuriosus*. L'univers de vie de cette espèce est le sol, comme récemment décrit dans (65). Si on utilise d'autres espèces d'*Enchytraeus*, il faut les identifier clairement et justifier ce choix dans le rapport.

L'espèce *Enchytraeus crypticus* (Westheide et Graefe, 1992) appartient au même groupe qu'*E. luxuriosus*. L'existence d'*Enchytraeus crypticus* dans la nature n'est pas certaine, cette espèce n'ayant été décrite que dans les élevages de lombrics et les tas de compost (Römbke, 2003). Par conséquent, on ne connaît pas ses besoins écologiques d'origine. Cependant, des études récemment menées en laboratoire avec différents sols naturels ont confirmé la grande tolérance de cette espèce vis-à-vis de propriétés du sol telles que le pH et la texture (Jänsch *et al.*, 2005). Ces dernières années, cette espèce a souvent été utilisée dans des études écotoxicologiques en raison de sa facilité d'élevage et de mise à l'essai (Kuperman *et al.*, 2003). Néanmoins, elle est petite (3-12 mm; 7 mm en moyenne) (Westheide et Müller, 1996), ce qui la rend plus difficile à manipuler qu'*Enchytraeus albidus*. Si on utilise cette espèce et non *Enchytraeus albidus*, les récipients d'essai peuvent être de plus petite taille, mais cela n'est pas nécessaire. En outre, il convient de considérer que cette espèce se reproduit très rapidement, son temps de génération étant inférieur à 20 jours à 20 ± 2 °C (Achazi *et al.*, 1999), voire encore plus court à des températures supérieures.

Les *Enchytraeidae* de l'espèce *Enchytraeus albidus* (comme d'autres espèces d'enchytrées) peuvent être élevés dans de grandes boîtes en plastique (par exemple: 30 × 60 × 10 cm ou 20 × 12 × 8 cm, ce qui convient à la culture de vers de petite taille) remplies d'un mélange de sol artificiel et d'une terre de jardin, vendue dans le commerce, non contaminée et sans additifs. L'emploi de compost, qui risque de contenir des substances toxiques, telles que des métaux lourds, est à éviter. La faune est retirée du sol d'élevage avant usage par triple congélation. Un sol entièrement artificiel est également envisageable, mais le taux de reproduction pourrait être moindre par rapport à celui obtenu avec des substrats mixtes. Il convient que le substrat présente un pH de 6,0 ± 0,5. Les vers sont conservés dans un incubateur à une température de 15 ± 2 °C sans lumière. Dans tous les cas, il convient d'éviter une température supérieure à 23 °C. Ce sol artificiel/naturel sera humide, mais pas mouillé. Légèrement pressé dans la main, il laissera apparaître de petites gouttes d'eau. Dans tous les cas, on évite de créer des conditions anoxiques (si on utilise un couvercle, ce dernier devra comporter un nombre de trous suffisamment élevé pour assurer un échange d'air approprié). Il convient d'aérer le sol d'élevage en le remuant délicatement une fois par semaine.

▼M4

Les vers sont nourris au moins une fois par semaine ad libitum avec des flocons d'avoine placés dans une cavité à la surface du sol et recouverte de sol. Si de la nourriture reste de la fois précédente, il convient d'ajuster la ration alimentaire à ajouter. Si la nourriture restante est infestée de champignons, elle est remplacée par une nouvelle ration de flocons d'avoine. Pour favoriser la reproduction, les flocons d'avoine peuvent être remplacés toutes les deux semaines par une poudre protéique du commerce, enrichie en vitamines. Après trois mois, les animaux sont transférés vers un substrat d'élevage fraîchement préparé. Les flocons d'avoine, qui sont conservés dans des récipients hermétiquement fermés, sont passés à l'autoclave ou chauffés avant l'emploi afin de prévenir toute infection par des acariens de stockage (*Glycyphagus* sp., Astigmata, Acarina, par exemple) ou des acariens prédateurs [*Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina, par exemple]. Une fois désinfectée, la nourriture est moulue de façon à pouvoir être facilement parsemée à la surface du sol. Il est également possible de nourrir les vers avec de la levure de boulanger ou de la nourriture pour poissons Tetra-Min®.

En règle générale, les conditions d'élevage sont satisfaisantes si les vers ne tentent pas de quitter le substrat, se déplacent rapidement dans le sol, présentent une surface brillante sur laquelle les particules de sol n'adhèrent pas, ont une couleur plus ou moins blanchâtre, et représentent diverses tranches d'âge. On peut considérer que les vers sont sains s'ils se reproduisent continuellement.

Références bibliographiques complémentaires

Achazi R.K., Fröhlich E., Henneken M., Pilz C. (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S., Amorim M.J.B., Römbke J. (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman R.G., Checkai R.T., Simini M., Phillips C.T., Kolakowski J.E., Kurnas C.W., Sunahara G.I. (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J. (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W. and Graefe U. (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W. and Müller M.C. (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.