

II

(Actes dont la publication n'est pas une condition de leur applicabilité)

COMMISSION

DIRECTIVE DE LA COMMISSION

du 18 novembre 1987

portant neuvième 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

(87/302/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne,

vu 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 ⁽¹⁾, modifiée pour la sixième fois par la directive 79/831/CEE ⁽²⁾, et plus particulièrement son article 19,

considérant que l'article 3 paragraphe 1 de la directive 67/548/CEE prévoit que la détermination des propriétés physico-chimiques, de la toxicité et de l'écotoxicité des substances et préparations est pratiquée selon les méthodes prévues à l'annexe V;

considérant que l'article 3 paragraphe 2 de la directive 67/548/CEE prévoit que l'évaluation du danger pour l'environnement, même sous forme potentielle, est faite en fonction des caractéristiques énumérées aux annexes VII et VIII;

considérant que l'annexe V telle qu'elle est établie par la directive 84/449/CEE de la Commission, du 25 avril 1984 ⁽³⁾, ne décrit actuellement que les méthodes d'essai correspondant aux caractéristiques énumérées à l'annexe VII et qu'il est nécessaire de décrire également des méthodes d'essai correspondant aux caractéristiques énumérées à l'annexe VIII;

considérant que les dispositions de la présente directive sont conformes à l'avis du comité pour l'adaptation au progrès

technique des directives visant à l'élimination des entraves techniques aux échanges dans le secteur des substances et des préparations dangereuses;

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

Article premier

Le texte de l'annexe V de la directive 67/548/CEE est complété par le texte figurant en annexe à la présente directive,

Article 2

Les États membres adoptent et publient, avant le 31 décembre 1988, les dispositions nécessaires pour se conformer à la présente directive et en informent immédiatement la Commission. Ils appliquent ces dispositions à partir du 30 juin 1989.

Article 3

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Bruxelles, le 18 novembre 1987.

Par la Commission

Stanley CLINTON DAVIS

Membre de la Commission

⁽¹⁾ JO n° 196 du 16. 8. 1967, p. 1.

⁽²⁾ JO n° L 259 du 15. 10. 1979, p. 1.

⁽³⁾ JO n° L 251 du 19. 9. 1984, p. 1.

ANNEXE

La présente annexe expose les méthodes d'essai pour la détermination des propriétés physico-chimiques, toxicologiques et écotoxicologiques énumérées à l'annexe VIII de la directive 79/831/CEE du Conseil. Elle donne la description des méthodes d'essai correspondant aux niveaux 1 et 2 de l'annexe VIII mais les essais ne sont pas subdivisés en fonction des différents niveaux.

TABLE DES MATIÈRES

	page
PARTIE B: Méthodes de détermination de la toxicité	4
Introduction générale: partie B	4
Toxicité orale subchronique: expérience de 90 jours sur des rongeurs	8
Toxicité orale subchronique: expérience de 90 jours sur des espèces n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs	12
Toxicité dermique subchronique: épreuve de 90 jours sur des rongeurs	16
Toxicité subchronique par inhalation: expérience de 90 jours sur des rongeurs	20
Étude de tératogénicité	24
Étude de la toxicité chronique	27
Étude de cancérogénèse	32
Étude combinée de cancérogénèse et de toxicité chronique	37
Test de reproduction sur une génération	43
Test de reproduction sur deux générations	47
Toxicocinétique	51
Tests de mutagenèse et de dépistage de cancérogénèse	55
— Mutation génique, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
— Recombinaison mitotique, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
— Cellules de mammifère <i>in vitro</i> , essai de mutation génique	61
— Lésion et réparation d'ADN — synthèse non programmée de l'ADN (UDS) — cellules de mammifère <i>in vitro</i>	64
— Essai <i>in vitro</i> d'échange de chromatides-sœurs	68
— Test de létalité récessive liée au sexe sur <i>Drosophila melanogaster</i>	71
— Tests de transformation sur cellules de mammifère <i>in vitro</i>	73
— Tests de létalité dominante chez le rongeur	76
— Cytogénétique des cellules germinales de mammifère <i>in vivo</i>	79
— <i>Spot test</i> chez la souris	82
— Translocation héréditaire chez la souris	85
PARTIE C: Méthodes de détermination de l'écotoxicité	88
Introduction générale: partie C	88
Essai d'inhibition de la croissance des algues	89
Toxicité pour les vers de terre — essai sur sol artificiel	95
Biodégradation: essai de Zahn et Wellens	99
Biodégradation: essais de simulation de boues activées	106
Biodégradation: boues activées: essai d'inhibition de la respiration	118
Biodégradation: test SCAS modifié	123

PARTIE B: MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ

INTRODUCTION GÉNÉRALE: PARTIE B

ÉTUDES À LONG TERME

Études de toxicité subchronique, de toxicité chronique et de cancérogénèse

Caractérisation de la substance à tester et mélange utilisé pour le traitement

Avant d'entreprendre toute étude de toxicité, il faut connaître la composition de la substance à tester, y compris ses principales impuretés, ainsi que ses propriétés physico-chimiques essentielles, y compris la stabilité.

Les propriétés physico-chimiques de la substance à tester fournissent des informations importantes pour le choix de la voie d'administration, la conception des études subchroniques, chroniques ou de cancérogénicité ainsi que pour la manipulation et le stockage de la substance à tester.

La connaissance de la structure chimique et des propriétés physico-chimiques de la substance peut également donner une idée des caractéristiques d'absorption par la voie d'administration envisagée ainsi que des possibilités de distribution tissulaire et de métabolisme. Des études antérieures de toxicité et de toxicocinétique peuvent également fournir des informations sur les paramètres toxicocinétiques.

La mise au point d'une méthode analytique pour la détermination qualitative et quantitative de la substance à tester (y compris les impuretés principales) dans le véhicule d'administration et dans le matériel biologique doit précéder le début de l'étude.

Animaux d'expérience: sélection de l'espèce et de la souche

Étant donné qu'il est nécessaire de traiter les animaux pendant une grande partie de leur vie, on tend à limiter les études à des espèces faciles à élever en laboratoire et ayant une durée de vie relativement courte. Il est hautement souhaitable de connaître l'incidence des affections et des tumeurs spontanées chez les animaux de la lignée utilisée, élevés dans des conditions similaires.

Les souches seront bien caractérisées et exemptes de toutes anomalies congénitales gênantes. L'utilisation de lignées consanguines (*inbred*) ou d'hybrides F₁ présente quelques avantages à cet égard, mais lorsqu'on dispose de données suffisantes sur les antécédents de souches non consanguines, utilisant des animaux provenant de colonies fermées, on peut avoir recours à de telles souches.

Soins aux animaux, régime alimentaire et de boisson

Les expérimentations et les études sur les animaux devront respecter les réglementations nationales et tenir compte des principes humanitaires ainsi que des derniers développements internationaux dans le domaine de la protection des animaux.

Un contrôle rigoureux des conditions ambiantes de même que des techniques adéquates de soins aux animaux sont impératifs si l'on veut obtenir des résultats significatifs. Des facteurs tels que conditions de stabulation, maladie intercurrente, chimiothérapie, présence d'impuretés dans la nourriture, l'air, l'eau et la litière, soins généraux aux animaux et installations peuvent influencer de manière significative le résultat des études par administration répétée. En général, l'impact sur l'étude de produits chimiques stérilisants devra être connu.

Le régime alimentaire doit répondre à tous les besoins nutritionnels de l'espèce testée et sera exempt d'impuretés susceptibles d'influencer le résultat de l'essai. La nourriture et l'eau seront fournies à satiété aux rongeurs, la nourriture étant remplacée au moins une fois par semaine. Actuellement, trois types de régimes alimentaires sont utilisés: régime conventionnel, régime synthétique et régimes à formulation libre.

Quel que soit le régime alimentaire choisi, les fournisseurs doivent, par des contrôles périodiques, garantir la valeur nutritive et le niveau de contaminants du régime alimentaire de base; ils sont tenus de fournir ces informations au laboratoire avec chaque lot de nourriture. Il est hautement souhaitable de connaître les effets du régime alimentaire sur le métabolisme ainsi que sur le développement de tumeurs et la longévité des animaux.

De plus, le laboratoire d'essai peut effectuer une contre-analyse du régime alimentaire de base pour contrôler les composants alimentaires et des contaminants involontaires, y compris les cancérogènes. Dans ce cas, les résultats des analyses seront conservés et inclus dans le rapport final consacré à chaque substance à tester.

Les composants alimentaires courants connus pour influencer la cancérogénèse (par exemple antioxydants, acides gras insaturés, sélénium) ne seront pas présents à des concentrations gênantes. En raison de l'impact potentiel de plusieurs contaminants diététiques courants sur l'évaluation de la cancérogénicité, il est nécessaire d'accorder une attention particulière à la présence dans la nourriture de résidus de pesticides, de composés organochlorés d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, d'œstrogènes, de métaux lourds, de nitrosamines et de myco-toxines.

Des essais de stabilité sont indispensables lorsque la substance à tester est administrée dans l'eau ou la nourriture. Des essais de stabilité et d'homogénéité correctement menés avant d'entreprendre des études par administration répétée doivent servir à déterminer la fréquence nécessaire pour la préparation et le contrôle du régime alimentaire.

Si les aliments sont stérilisés, les effets d'une telle opération sur la substance à tester ainsi que sur les constituants alimentaires devront être connus. Il sera procédé à tout ajustement approprié.

Durant les essais de cancérogénicité, les expérimentateurs doivent être informés sur les contaminants dans l'eau utilisée. L'eau reconnue propre à la consommation humaine est généralement d'une qualité satisfaisante et des informations sur sa composition devront être disponibles.

Il peut s'avérer nécessaire d'ajuster la concentration de la substance testée dans le régime alimentaire au fur et à mesure de la croissance des animaux afin de maintenir à peu près constante l'ingestion de la substance testée en fonction du poids corporel.

La valeur nutritive du régime de contrôle (témoin) et des régimes étudiés (testés) doit être aussi similaire que possible. Il y a donc lieu de prendre en considération la valeur nutritive de la substance testée et incorporée dans le régime. L'expérience montre que, jusqu'à 5 % dans le régime, une substance testée non nutritive ne semble pas interférer significativement sur la valeur nutritive de ce régime alimentaire.

1. Études par inhalation

Aucune épreuve limite n'est précisée car il n'a pas été possible de définir une valeur particulière d'exposition limite par inhalation.

2. Étude de tératogénicité

La méthode d'essai est essentiellement axée sur l'administration par voie orale. D'autres voies peuvent être utilisées en fonction des propriétés physiques de la substance à tester ou de la voie d'exposition humaine probable. Dans de tels cas, la méthode d'essai devra être convenablement adaptée en tenant compte des informations obtenues de l'essai de 28 jours.

3. Toxicocinétique

Les études de toxicocinétique facilitent l'interprétation et l'évaluation des données toxicologiques. Ces études ont pour but d'élucider certains aspects particuliers de la toxicité du produit chimique testé et les résultats obtenus peuvent aider à la conception d'autres études de toxicité. La nécessité de déterminer tous les paramètres pour chaque cas n'est pas envisagée. Seulement dans des cas rares, la séquence complète de l'étude de toxicocinétique (absorption, excrétion, distribution et métabolisme) sera nécessaire. Pour certains composés, une modification des séquences peut être conseillée ou une étude avec une seule dose peut être suffisante.

Définitions

Toxicocinétique: Étude de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion des substances à tester.

Absorption: Processus par lequel (lesquels) une substance administrée pénètre dans l'organisme.

Excrétion: Processus par lequel (lesquels) la substance administrée et/ou ses métabolites sont éliminés de l'organisme.

Distribution: Processus par lequel (lesquels) la substance absorbée et/ou ses métabolites se répartissent dans l'organisme.

Métabolisme: Processus par lequel (lesquels) la substance administrée est structurellement modifiée dans l'organisme par des réactions enzymatiques ou non enzymatiques.

4. Étude de toxicité aiguë et subaiguë sur une seconde espèce

Une étude sur une seconde espèce a pour but de compléter les conclusions tirées de l'étude sur la première espèce.

Dans le cas d'une étude sur une seconde espèce, la méthode d'essai déjà décrite peut être utilisée ou adaptée à un plus petit nombre d'animaux.

5. Étude de la fertilité

Lorsqu'une étude de reproduction à la génération F3 est requise, la méthode décrite pour l'essai de reproduction à la génération F2 peut être étendue à une génération F3.

6. Études de mutagénicité

Tests complémentaires de mutagénicité y compris tests de dépistage de la carcinogénicité

L'annexe VIII de la directive fait mention d'essais complémentaires destinés à étudier la mutagénicité ou à déceler la carcinogénicité. Les essais décrits dans cette partie peuvent généralement être utilisés pour mettre en évidence l'une et l'autre.

Introduction

L'activité mutagène d'une substance est tout d'abord évaluée au moyen de tests visant à déceler les mutations géniques (ponctuelles) dans des bactéries ainsi que les lésions cytogénétiques dans des cellules de mammifères (*in vitro* ou *in vivo*); des méthodes se prêtant à ces études «de base» ont déjà été décrites précédemment. Cette partie traite d'essais complémentaires permettant de vérifier et/ou de compléter les résultats obtenus dans les essais de base et pouvant être utilisés notamment:

- 1) pour confirmer les résultats obtenus dans les essais de base;
- 2) pour étudier concrètement les effets non examinés dans les essais de base;
- 3) pour entreprendre ou approfondir des études *in vivo*.

Dans ce but, la gamme d'essais décrite comprend des organismes eucaryotes *in vitro* et *in vivo* et concrétise une grande gamme d'effets biologiques. Les essais permettent d'obtenir des informations sur les mutations ponctuelles se produisant dans des organismes plus complexes que les bactéries utilisées dans les essais de base et complètent les informations sur l'aptitude d'une substance à induire des aberrations chromosomiques.

Des essais concrétisant d'autres effets que les mutations ponctuelles et les aberrations chromosomiques sont également décrits. Ils fournissent des informations complémentaires et peuvent, le cas échéant, être utilisés dans des programmes d'expérimentation.

En règle générale, tout programme d'études complémentaires de la mutagénicité devrait être conçu de manière à fournir des informations supplémentaires pertinentes sur le potentiel mutagène et/ou carcinogène de cette substance.

Le choix des études à effectuer dans un cas précis dépendra de multiples facteurs et notamment des caractéristiques physiques et chimiques de la substance, des résultats des premiers essais bactériologiques et cytogénétiques, du profil métabolique de la substance, des résultats d'autres études de toxicité et des utilisations connues de la substance. Étant donné la variété des facteurs à prendre en considération, il n'est pas possible d'établir un programme rigide pour la sélection des essais. Certains principes généraux peuvent néanmoins servir d'orientation: lorsqu'un essai s'est révélé positif dans les essais de base, les études complémentaires devraient comporter au moins un essai permettant de déceler concrètement le même effet génétique. Lorsque les deux essais de base se sont révélés négatifs, un essai permettant de déceler les mutations géniques et un essai destiné à déceler les aberrations chromosomiques devraient normalement être effectués à titre d'études complémentaires. Il peut également s'avérer nécessaire d'obtenir des informations complémentaires dans le cadre de tests révélateurs (voir liste ci-dessous). Les méthodes permettant d'effectuer de telles recherches sont regroupées ci-dessous d'après la concrétisation de leur principal effet génétique.

Études visant à déceler les mutations géniques (ponctuelles)

Pour une meilleure connaissance de l'aptitude d'une substance à induire des mutations géniques (ponctuelles), l'un des tests suivants peut être utilisé:

- a) étude de mutation directe ou reverse sur des micro-organismes eucaryotes (*Saccharomyces cerevisiae*);
- b) étude *in vitro* permettant de déceler les mutations directes dans les cellules des mammifères;
- c) épreuve du gène létal récessif lié au sexe sur *Drosophila melanogaster*;
- d) essai de mutation somatique *in vivo*: épreuve des taches chez la souris.

Études visant à déceler les aberrations chromosomiques

Lorsqu'il s'avère nécessaire d'approfondir les recherches sur l'aptitude d'une substance à induire des aberrations chromosomiques, il est possible d'utiliser l'un des tests suivants:

- a) épreuves cytogénétiques *in vivo* sur mammifères:

L'analyse *in vivo* de la métaphase des cellules de la moelle osseuse devra être envisagée si elle n'a pas été effectuée dans l'évaluation initiale (études de base). De plus, l'étude cytogénétique des cellules germinales peut être réalisée *in vivo*;

- b) études cytogénétiques *in vitro* sur cellules de mammifères, si celles-ci n'ont pas été effectuées dans le cadre de la première évaluation;
- c) gène létal dominant chez les rongeurs;
- d) épreuve de translocation à transmission héréditaire chez la souris.

Tests révélateurs des effets sur l'acide désoxyribonucléique (ADN)

Il existe des méthodes qui permettent de mettre en évidence certains effets sur l'ADN mais dont la concrétisation n'est pas une manifestation mutagène. Ces tests peuvent fournir des informations complétant celles obtenues dans le cadre d'études de mutagenicité et pouvant s'avérer utiles pour l'interprétation de celles-ci. S'il est nécessaire d'effectuer ces tests, il est possible d'appliquer une de ces trois méthodes utilisant des micro-organismes eucaryotes ou des cellules de mammifères:

- a) recombinaison mitotique sur *Saccharomyces cerevisiae*;
- b) lésion et réparation d'ADN — synthèse non programmée de l'ADN — cellules de mammifères (*in vitro*);
- c) échange de chromatides-sœurs sur cellules de mammifères (*in vitro*).

Autres tests révélateurs du potentiel carcinogène

Des essais de transformation des cellules de mammifères permettent de mesurer l'aptitude d'une substance à induire, dans une culture cellulaire, des modifications morphologiques et comportementales qui sont supposées être liées à une transformation maligne *in vivo*. Un certain nombre de types cellulaires et de critères de transformation différents peuvent être utilisés.

Évaluation du risque d'effets héréditaires chez les mammifères

Il existe plusieurs méthodes permettant de mesurer, chez les mammifères, les effets héréditaires induits par des mutations géniques (ponctuelles) [par exemple, épreuve du locus spécifique chez la souris ⁽¹⁾] ou par des aberrations chromosomiques (par exemple, épreuve de transformation à transmission héréditaire chez la souris).

Ces méthodes peuvent être utilisées pour apprécier le risque génétique que peut présenter une substance pour l'homme. Toutefois, étant donné la complexité de ces essais et le nombre élevé d'animaux requis, en particulier pour l'épreuve du locus spécifique, ces essais ne seront entrepris que s'ils sont pleinement justifiés.

⁽¹⁾ L'épreuve du locus spécifique chez la souris (qui n'est pas décrite dans ce document) peut être utilisée pour mesurer la mutation intervenue dans les cellules germinales de la première génération après exposition à une substance mutagène. Il est possible de déceler et de quantifier les altérations génétiques aboutissant à une modification des gènes et se traduisant par des phénotypes visibles.

TOXICITÉ ORALE SUBCHRONIQUE**EXPÉRIENCE 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

Des doses croissantes de la substance d'essai sont administrées quotidiennement, par voie orale, à plusieurs lots d'animaux d'expérience, à raison d'une dose par groupe durant une période de 90 jours. Durant la période d'administration, les animaux sont observés quotidiennement afin de déceler des manifestations de toxicité. Les animaux qui meurent en cours d'expérience sont autopsiés et, à la fin de l'expérience, les animaux survivants sont également autopsiés.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai*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 entre les lots soumis au traitement.

La substance à tester peut être administrée dans la nourriture, par gavage, en capsule ou dans l'eau de boisson. Les doses seront administrées aux animaux de la même façon durant toute la durée de l'expérience. Si, pour faciliter l'administration, on utilise un véhicule ou d'autres additifs, ceux-ci doivent être réputés non toxiques. Des données publiées peuvent, si nécessaire, être utilisées.

*Conditions expérimentales***Animaux d'expérience**

Sauf contre-indications, c'est le rat qui est utilisé de préférence. Il faut utiliser de jeunes animaux sains d'une souche de laboratoire courante; l'idéal serait de commencer à administrer la substance avant que les rats n'atteignent l'âge de six semaines et, en tout état de cause, avant la huitième semaine. Au commencement de l'expérience, la différence de poids entre les animaux utilisés n'excédera pas $\pm 20\%$ de la valeur moyenne. Si l'étude orale subchronique constitue la phase préparatoire d'une étude à long terme, la même espèce et la même souche seront utilisées pour les deux études.

Nombre et sexe

Vingt animaux au moins (dix femelles et dix mâles) seront utilisés pour chaque dose. Les femelles doivent être 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. De plus, un lot satellite de vingt animaux (dix animaux 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, le persistance ou l'apparition tardive des effets toxiques durant les 28 jours qui suivent le traitement.

Doses

On utilise au moins trois doses et un témoin. À l'exception de la substance d'essai, les animaux du lot témoin seront traités de la même manière que ceux des groupes d'expérience. Si l'on utilise un véhicule pour faciliter l'administration, il sera administré aux témoins de la même manière que pour les lots traités et le volume reçu correspondra à celui administré au lot traité avec la dose la plus élevée. La dose la plus élevée qui sera étudiée produira des effets toxiques mais pas, ou peu, de décès. La dose la plus faible ne doit produire aucun effet toxique. Lorsqu'on dispose d'informations sur le niveau de l'exposition humaine, la dose la plus faible lui sera supérieure. L'idéal serait que la dose moyenne produise l'effet toxique minimal observable. Si on utilise plusieurs doses intermédiaires, l'écart entre les doses sera suffisant pour qu'il en résulte une gradation des effets toxiques.

Dans les lots correspondant aux doses faibles et intermédiaires, ainsi que dans le lot témoin, l'incidence de la mortalité doit être faible afin de permettre une évaluation significative des résultats.

Lorsque la substance à tester est incorporée à la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (ppm ou mg/kg de nourriture) soit une dose constante en rapport avec le poids corporel des animaux; la méthode choisie doit être précisée. Dans le cas d'une substance administrée par gavage, la dose sera donnée chaque jour aux mêmes heures. Les doses seront ajustées chaque semaine ou tous les quinze jours de façon à maintenir une dose constante en rapport avec le poids corporel de l'animal.

Essai de limite

Si une expérience de 90 jours effectuée d'après la méthode décrite ci-dessous, à une dose de 1 000 mg/kg poids corporel/jour ou à une dose plus élevée en fonction de la possibilité d'une exposition humaine — pour autant que celle-ci soit connue — n'entraîne aucun effet toxique, on peut juger inutile de poursuivre l'expérience. Lorsqu'il s'agit de substances faiblement toxiques, incorporées à l'alimentation, il est important de s'assurer que leur quantité et leurs propriétés n'interfèrent pas avec les exigences nutritionnelles normales.

Période d'observation

Tous les animaux doivent faire l'objet d'une observation quotidienne; les manifestations de toxicité ainsi que le moment de leur apparition, leur intensité et leur durée seront consignés. Le moment de la mort et le moment auquel les manifestations de toxicité apparaissent et disparaissent seront enregistrés.

Mode opératoire

Dans les conditions idéales, les doses de substance à tester sont administrées aux animaux 7 jours sur 7 durant une période de 90 jours. Les animaux des lots satellites prévus pour des observations complémentaires seront gardés pendant 28 jours encore, sans traitement, afin d'étudier la récupération ou la persistance des effets toxiques.

Pendant la période d'observation des animaux en cage, il convient notamment de relever toute modification du poil, 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 (ainsi que la consommation d'eau lorsque la substance à tester est administrée dans l'eau de boisson) et le poids des animaux seront déterminés chaque semaine.

Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux afin de prévenir toute perte d'animal par cannibalisme, autolyse des tissus ou erreur d'engagemment. À l'issue de l'expérience, tous les animaux survivants des lots traités non satellites sont autopsiés. Les animaux moribonds seront immédiatement retirés et autopsiés.

Les examens figurant ci-après sont habituellement pratiqués pour tous les animaux, y compris les témoins:

- 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'à l'issue de l'expérience, de préférence sur tous les animaux, mais au moins sur le groupe des animaux ayant reçu les doses les plus élevées et sur le groupe témoin correspondant. Si des modifications oculaires sont observées, tous les animaux seront examinés.
- b) Un examen hématologique sera effectué au terme de l'expérience, et comprendra les épreuves suivantes: hématoCRITE, concentration en hémoglobine, numération des hématies et des leucocytes, et 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.
- c) Des déterminations biochimiques cliniques dans le sang seront effectuées au terme de l'expérience. L'équilibre électrolytique, le métabolisme glucidique, les fonctions rénale et hépatique 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 à tester. 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⁾, glutamo-oxaloacétique sériques ⁽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 d'effets toxiques probables ou manifestes.

Si les informations recueillies dans le passé ne sont pas appropriées, les paramètres hématologiques et biochimiques cliniques seront déterminés avant de commencer le traitement.

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'un examen histopathologique ultérieur: toute lésion macroscopique, encéphale — y compris sections de la moelle/du pont de Varole, cortex cérébelleux et cortex cérébral, hypophyse, thyroïde/parathyroïde, tout tissu thymique, trachée et poumons, cœur, aorte (glandes salivaires), foie, rate, reins, glandes surrénales, pancréas, gonades, utérus, (organes génitaux annexes), (peau), œsophage, ganglion lymphatique représentatif, (femelle: glande mammaire), (musculature de la cuisse), nerf périphérique, sternum avec moelle osseuse, (yeux), (fémur — y compris surface articulaire), (moelle épinière à trois niveaux — cervical, médiathoracique et lombaire) et (glandes lacrymales). Les tissus mentionnés entre parenthèses ne doivent être examinés que sur indication des signes de toxicité ou en cas d'atteinte de l'organe.

Examen histopathologique

- a) Les organes et les tissus des animaux appartenant au lot témoin et au lot traité par la dose la plus élevée seront soumis à un examen histopathologique complet.
- b) Toutes les lésions macroscopiques seront examinées.
- c) Les organes-cibles des animaux des lots traités avec d'autres doses seront examinés.
- d) Les poumons des animaux appartenant aux lots exposés aux doses faible et intermédiaire seront soumis à un examen histopathologique pour déceler tout signe d'infection qui permette de juger facilement de l'état de santé des animaux. Il faut également envisager un examen histopathologique du foie et des reins pour ces lots. Un examen histopathologique complémentaire de routine peut ne pas être nécessaire pour les animaux de ces lots mais doit toujours être effectué pour les organes présentant des lésions dans le lot traité à la dose la plus élevée.
- e) Lorsqu'il est prévu un lot satellite, un examen histopathologique sera pratiqué pour les tissus et les organes, présentant des signes de toxicité dans les lots traités.

2. RÉSULTATS

Les données seront résumées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux atteints 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,
- réponse toxique par sexe et par dose,

⁽¹⁾ Connue actuellement sous le nom d'alanine transaminase sérique.

⁽²⁾ Connue actuellement sous le nom d'aspartate transaminase sérique.

- dose dépourvue d'effet, si possible,
- moment de la mort en cours d'expérience ou indication que les animaux ont survécu à l'expérience,
- description des effets toxiques ou autres,
- moment de l'observation de toute manifestation anormale et évolution de celle-ci,
- quantité de nourriture et poids corporel,
- observations ophtalmologiques,
- examens hématologiques pratiqués et résultats complets,
- épreuves biochimiques cliniques pratiquées et résultats complets (y compris résultats de l'examen des urines),
- résultats d'autopsie,
- description détaillée de toutes les observations histopathologiques,
- le cas échéant, traitement 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.

TOXICITÉ ORALE SUBCHRONIQUE**EXPÉRIENCE DE 90 JOURS SUR DES ESPÈCES N'APPARTENANT PAS À L'ORDRE 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

Des doses croissantes de la substance d'essai sont administrées quotidiennement, par voie orale, à plusieurs groupes d'animaux d'expérience (n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs), à raison d'une dose par groupe pendant une période de 90 jours. Durant la période d'administration, 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*Préparation*

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 entre les différents lots soumis au traitement.

La substance à tester peut être administrée dans la nourriture ou en capsule, si cela semble plus commode. D'autres modes d'administration orale peuvent être utilisés. Les doses seront administrées aux animaux de la même façon durant toute la durée de l'expérience. Si, pour faciliter l'administration, on utilise un véhicule ou d'autres additifs, ceux-ci seront réputés non toxiques. Des données publiées peuvent, si nécessaire, être utilisées.

*Conditions expérimentales***Animaux d'expérience**

L'espèce n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs la plus couramment utilisée est le chien, de préférence d'une race définie. D'autres espèces de non-rongeurs peuvent être utilisées. On utilisera de jeunes animaux sains et, dans le cas du chien, l'essai commencera de préférence à l'âge de 4 à 6 mois, 9 mois étant la limite extrême. Si l'étude orale subchronique constitue la phase préparatoire d'une étude à long terme, la même espèce et la même race seront utilisées pour les deux études.

Nombre et sexe

8 animaux au moins (4 femelles et 4 mâles) seront utilisés pour chaque dose. Le nombre des animaux encore en vie à l'issue de l'expérience doit être suffisant pour permettre une évaluation valable des effets toxiques.

Dosés

Il faut prévoir au moins trois doses différentes et un lot témoin. À l'exception de la substance à tester, les animaux du lot témoin seront traités de la même manière que les sujets des lots traités. On attend de la dose la plus élevée qu'elle produise des effets toxiques mais pas la mort de l'animal; de la dose la plus faible qu'elle ne produise aucun

effet toxique. Lorsqu'on dispose d'informations sur le niveau de l'exposition humaine, la dose la plus faible doit lui être supérieure. L'idéal serait que la dose moyenne produise l'effet toxique minimal observable. Si l'on utilise plusieurs doses intermédiaires, l'écart entre les doses sera calculé de manière à produire une gradation des effets toxiques.

Dans les lots correspondant aux doses faible et intermédiaire ainsi que dans le lot témoin, il ne devrait pas y avoir de décès d'animaux.

Lorsqu'il s'agit de substances faiblement toxiques, il est important d'éviter que les quantités de la substance à tester, lorsqu'elles sont administrées dans l'alimentation, n'interfèrent avec l'alimentation normale.

Lorsque la substance à tester est incorporée dans la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (ppm ou mg/kg de nourriture) soit une dose constante en rapport avec le poids corporel de l'animal; la méthode choisie doit être précisée. Lorsque la substance est administrée directement, par exemple en capsule, la dose sera donnée chaque jour à la même heure et sera, au besoin, ajustée chaque semaine de façon à maintenir une dose constante en rapport avec le poids corporel de l'animal. Si une étude subchronique sert de phase préparatoire à une étude à long terme, un régime alimentaire analogue sera habituellement utilisé dans les deux études.

Essai de limite

Si une expérience de 90 jours effectuée d'après la méthode décrite ci-dessous, à une dose de 1 000 mg/kg poids corporel/jour ou à une dose plus élevée en fonction de la possibilité d'une exposition humaine — pour autant que celle-ci soit connue — ne révèle aucun effet toxique, on peut juger inutile de poursuivre l'expérience. Lorsqu'il s'agit de substances faiblement toxiques mélangées à la nourriture, il est important de s'assurer que leurs quantités et leurs propriétés n'interfèrent pas avec les exigences nutritionnelles normales.

Période d'observation

Tous les animaux doivent faire l'objet d'une observation quotidienne et les manifestations de toxicité ainsi que le moment de leur apparition, leur intensité et leur durée seront consignés. Le moment de la mort et le moment auquel les manifestations de toxicité apparaissent et disparaissent seront enregistrés.

Mode opératoire

Dans les conditions idéales, les doses de substance à tester sont administrées aux animaux 7 jours sur 7 durant une période de 90 jours. Toutefois, pour des raisons essentiellement pratiques, il est admis que la substance soit administrée 5 jours sur 7, lorsqu'elle n'est pas administrée dans l'alimentation. Les observations devront inclure, sans être limitées à cela, 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 la consommation d'eau lorsque la substance à tester est administrée dans l'eau de boisson) ainsi que le poids des animaux seront déterminés chaque semaine.

Un examen clinique attentif des animaux sera pratiqué quotidiennement et des mesures appropriées seront prises afin de réduire la perte d'animaux. À l'issue de l'expérience, tous les animaux encore en vie sont autopsiés. Les animaux moribonds seront immédiatement retirés et autopsiés.

Les examens figurant ci-après sont habituellement effectués pour tous les animaux, y compris les témoins:

- a) Un examen ophtalmologique sera pratiqué au moyen d'un ophtalmoscope ou d'un appareil équivalent avant d'administrer la substance à tester ainsi qu'au terme de l'expérience, de préférence sur tous les animaux mais au moins sur le lot traité par la dose la plus élevée ainsi que sur le lot témoin. Si des modifications oculaires sont observées, tous les animaux seront examinés.
- b) Un examen hématologique comprenant hémocrite, concentration en hémoglobine, numération des hématies et des leucocytes, 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 pratiqué au début de l'essai et au terme de l'expérience.
- c) Des déterminations biochimiques cliniques dans le sang seront effectuées au début de l'essai, puis soit tous les mois soit à la moitié de l'essai et au terme de l'expérience. L'équilibre électrolytique, le métabolisme glucidique, les fonctions rénale et hépatique 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 à tester. 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/race), les transaminases glutamo-pyruvique ⁽¹⁾, glutamo-oxaloacétique sériques ⁽²⁾, l'ornithine-décarboxylase, la gamma-glutamyl transpeptidase, l'azote uréique,

⁽¹⁾ Connue actuellement sous le nom d'alanine transaminase sérique.

⁽²⁾ Connue actuellement sous le nom d'aspartate transaminase sérique.

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 réalisées afin d'approfondir l'étude des effets observés. Les animaux n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs seront mis à la diète pendant un certain laps de temps (n'excédant pas 24 heures) avant les prises de sang.

- d) Un examen régulier des urines n'est pas nécessaire; un tel examen n'est indiqué qu'en cas d'effets toxiques probables ou manifestes.

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, la thyroïde (ainsi que les parathyroïdes) 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'examen 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, utérus, (organes génitaux annexes), (peau), vésicule biliaire, œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, cæcum, colon, rectum, vessie, ganglion lymphatique représentatif, (femelle: glande mammaire), (musculature de la cuisse), nerf périphérique, (yeux), sternum avec moelle osseuse, (fémur — y compris surface articulaire), et (moelle épinière à trois niveaux — cervical, médiathoracique et lombaire). Les tissus mentionnés entre parenthèses ne doivent être examinés que sur indication des signes de toxicité ou en cas d'atteinte de l'organe.

Examen histopathologique

Un examen histopathologique complet sera pratiqué sur les organes et tissus de tous les animaux du lot témoin et du lot exposé à la dose la plus élevée. Dans les autres lots traités sera pratiqué un examen histopathologique de tous les organes présentant des lésions à la dose la plus élevée ou de ceux pour lesquels les observations cliniques font apparaître la nécessité d'un tel examen.

2. RÉSULTATS

Les données peuvent être résumées sous la forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'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 lésions. 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, race ou souche, origine, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.,
- conditions expérimentales,
- doses (y compris, le cas échéant, véhicule) et concentrations,
- réponse toxique par sexe et par dose,
- dose dépourvue d'effet, si possible,
- moment de la mort en cours d'expérience ou indication que les animaux ont survécu à l'expérience,
- description des effets toxiques ou autres (en mettant l'accent sur les observations cliniques),
- moment de l'observation de tout symptôme et évolution de celui-ci,
- quantité de nourriture et poids corporel,
- observations ophtalmologiques,

- épreuves hématologiques pratiquées et résultats complets,
- épreuves biochimiques cliniques pratiquées et résultats complets (y compris résultats de l'examen des urines),
- résultats d'autopsie,
- description détaillée de toutes les observations histopathologiques,
- le cas échéant, traitement 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.

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*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.

*Conditions expérimentales***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 $\pm 20\%$ 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.

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.

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 recommencer avec des concentrations plus faibles.

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.

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.

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'engagement, 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.
- 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 sériques ⁽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.

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'examen 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, médiathoracique 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.

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.
- 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.

(1) Connue actuellement sous le nom d'alanine transaminase sérique.

(2) Connue actuellement sous le nom d'aspartate transaminase sérique.

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,
- 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.

TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR INHALATION

EXPÉRIENCE DE 90 JOURS SUR DES RONGEURS

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

Plusieurs lots d'animaux d'expérience sont exposés quotidiennement, pendant une période déterminée, à différentes concentrations de la substance d'essai, à raison d'une concentration par lot, pendant une période de 90 jours. Lorsqu'on utilise un véhicule en vue d'obtenir une concentration appropriée de la substance à tester dans l'atmosphère, il y a lieu de prévoir un lot témoin pour le véhicule. Durant la période d'exposition, 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 au terme de celle-ci sont autopsiés.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai*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 entre le nombre de groupes requis. Au besoin, un véhicule approprié peut être ajouté à la substance à tester en vue d'obtenir une concentration appropriée de celle-ci dans l'atmosphère; si un véhicule ou d'autres additifs sont utilisés pour faciliter l'administration, ils seront réputés non toxiques. Des données publiées peuvent être utilisées le cas échéant.

*Conditions d'essai***Animaux d'expérience**

Sauf contre-indication, le rat est l'espèce préférée. Il faut utiliser de jeunes animaux sains d'une souche de laboratoire courante. Au commencement de l'expérience, la différence de poids entre les animaux utilisés n'excédera pas $\pm 20\%$ de la valeur moyenne correspondante. Si une étude subchronique par inhalation sert de phase préparatoire à une étude à long terme, la même espèce et la même souche seront utilisées pour les deux études.

Nombre et sexe

20 animaux au moins (10 femelles et 10 mâles) seront utilisés pour chaque groupe d'expérience. Les femelles seront nullipares et non gravides. Si l'on prévoit de sacrifier certains animaux en cours d'expérience, il faudra augmenter les effectifs en fonction du nombre d'animaux qu'il est prévu de sacrifier. De plus, un groupe satellite de 20 animaux (10 par sexe) peut être exposé au niveau de concentration le plus élevé pendant 90 jours et faire l'objet d'une observation quant à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive des effets toxiques pendant les 28 jours qui suivent le traitement.

Concentration d'exposition

Il faut prévoir au moins trois concentrations ainsi qu'un lot témoin ou, le cas échéant, un lot témoin pour le véhicule (correspondant à la concentration du véhicule au niveau d'exposition le plus élevé). À l'exception de l'inhalation de la substance d'essai, les animaux du lot témoin seront traités de la même manière que les sujets du groupe d'expérience. On attend de la concentration la plus élevée qu'elle produise des effets toxiques mais pas ou peu de décès; de la concentration la plus faible, qu'elle ne donne aucun effet toxique. Lorsqu'on dispose d'informations sur le niveau de l'exposition humaine, la concentration la plus faible sera supérieure à cette valeur. L'idéal serait que la concentration intermédiaire produise l'effet toxique minimal observable. Si plusieurs concentrations intermédiaires sont utilisées, l'écart entre les niveaux d'exposition sera calculé de manière à entraîner une gradation des effets toxiques. Dans les groupes à concentrations faible et intermédiaire ainsi que dans les groupes témoins, le nombre de morts sera faible afin de permettre une évaluation significative des résultats.

Temps d'exposition

L'exposition quotidienne sera de 6 heures après obtention des concentrations dans la chambre d'exposition. D'autres périodes peuvent être utilisées pour répondre à certaines exigences spécifiques.

Équipement

Les animaux seront exposés à la substance à tester au moyen d'un dispositif d'inhalation conçu pour maintenir un flux d'air continu assurant au moins 12 renouvellements de l'air par heure, et garantir une teneur en oxygène appropriée et une répartition uniforme du produit à tester dans l'air. Si l'on utilise une chambre, celle-ci sera conçue de manière à obtenir un entassement minimal des animaux d'expérience et une exposition maximale à la substance à tester. En règle générale, pour assurer la stabilité de l'atmosphère de la chambre, le «volume» total des animaux d'expérience ne doit pas dépasser 5 % du volume de la chambre d'essai. On peut aussi avoir recours à un système d'exposition oro-nasal, de la tête seule ou du corps entier en chambre individuelle; les deux premiers types d'exposition permettent de réduire la pénétration par d'autres voies.

Périodes d'observation

Les animaux d'expérience seront observés quotidiennement afin de déceler les manifestations de toxicité tout au long de la période de traitement et de récupération. Le moment de la mort ainsi que celui auquel les manifestations de toxicité apparaissent et disparaissent seront notés.

Mode opératoire

Les animaux sont quotidiennement exposés à la substance à tester, à raison de 5 à 7 jours par semaine, pendant une période de 90 jours. Les animaux des groupes satellites destinés à des observations complémentaires seront gardés en vie pendant 28 jours encore, sans traitement, afin de déterminer s'il y a disparition ou persistance des effets toxiques. La température à laquelle s'effectue l'épreuve sera maintenue à $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Dans les conditions optimales, l'humidité relative devrait être maintenue entre 30 et 70 % mais, dans certains cas, cela peut s'avérer impossible (par exemple, essais avec aérosols). Pendant l'exposition, les animaux ne recevront ni nourriture ni eau.

On utilisera un système d'inhalation qui fonctionne dans des conditions dynamiques comportant un dispositif approprié de contrôle analytique de la concentration. Il est recommandé de procéder à un essai préliminaire afin de déterminer les concentrations d'exposition appropriées. Le débit d'air devra assurer des concentrations homogènes dans toute la chambre d'exposition. Le système permettra d'obtenir des conditions d'exposition stables aussi rapidement que possible.

Il y a lieu de mesurer et de contrôler:

- a) le débit d'air (en permanence);
- b) la concentration réelle de la substance d'essai mesurée dans la zone de respiration. Durant la période d'exposition quotidienne, la concentration ne variera pas de plus de $\pm 15\%$ de la valeur moyenne. Cependant, dans le cas de poussières et d'aérosols, cette précision peut ne pas être possible et un écart plus grand pourra alors être accepté. Durant toute la durée de l'expérience, les concentrations journalières seront maintenues aussi constantes que possible. Lors de la mise au point du système générateur, il sera procédé à une analyse granulométrique des particules afin de déterminer la stabilité des concentrations d'aérosol. Durant l'exposition, il sera procédé à des analyses aussi fréquentes que nécessaire pour déterminer la stabilité de la répartition granulométrique;
- c) la température et l'humidité;
- d) pendant et après l'exposition, des observations ont lieu et sont systématiquement notées; des fiches individuelles sont établies pour chaque animal. Tous les animaux seront observés quotidiennement et les manifestations de toxicité ainsi que le moment de leur apparition, leur intensité et leur durée seront notés. Pendant la période d'encagement, il convient notamment d'observer les modifications de la peau et du poil, des yeux, des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. La consommation alimentaire et le poids des animaux seront déterminés chaque semaine. Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux afin de

s'assurer qu'il n'y a pas de 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 sont autopsiés. En cours d'expérience, tout animal moribond sera immédiatement retiré et autopsié.

Les examens figurant ci-après sont habituellement effectués sur tous les animaux, y compris les témoins:

- a) Un examen ophtalmologique sera pratiqué à l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un appareil équivalent avant l'exposition à la substance à tester ainsi qu'au terme de l'expérience, de préférence sur tous les animaux mais au moins sur le groupe traité au niveau de dose le plus élevé ainsi que sur le groupe 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 que l'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.
- c) Des déterminations biochimiques cliniques dans le sang seront effectuées à l'issue de l'expérience. L'équilibre électrolytique, le métabolisme glucidique, les fonctions rénale et hépatique 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 sériques ⁽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 pour 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 systématique 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.

Autopsie

Tous les animaux seront soumis à une autopsie générale 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, poumons — ceux-ci doivent être prélevés entiers, pesés et traités au moyen d'un fixateur approprié permettant de conserver la structure pulmonaire (une perfusion avec le fixateur est considérée comme une méthode efficace), tissu du rhino-pharynx, encéphale — y compris section de la moelle/du pont de Varole, cortex cérébelleux et cortex cérébral, hypophyse, thyroïde/parathyroïde, tout tissu thymique, trachée, cœur, aorte, glandes salivaires, foie, rate, reins, glandes surrénales, pancréas, gonades, utérus, (organes génitaux annexes), (peau), vésicule biliaire (si présente), œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, cæcum, colon, rectum, vessie, 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, médiathoracique et lombaire) et (glandes lacrymales). Les tissus mentionnés entre parenthèses ne doivent être examinés que sur indication des signes de toxicité ou en cas d'atteinte de l'organe.

Examen histopathologique

- a) Les voies respiratoires ainsi que les organes et tissus de tous les animaux du lot témoin et de ceux du lot exposé au niveau le plus élevé feront l'objet d'un examen histopathologique complet.
- b) Toutes les lésions marquées seront examinées.
- c) Les organes-cibles des animaux appartenant à d'autres lots traités seront examinés.
- d) Les poumons des animaux appartenant aux groupes exposés à des doses faible et intermédiaire seront également soumis à un examen histopathologique, les poumons étant un indicateur commode de l'état de santé des animaux. D'autres examens histopathologiques réguliers peuvent ne pas être nécessaires pour les animaux de ces groupes mais doivent toujours être effectués pour les organes présentant des lésions dans le lot traité au niveau d'exposition le plus élevé.
- e) Lorsqu'un groupe satellite est utilisé, un examen histopathologique sera pratiqué sur les tissus et les organes présentant des signes de toxicité dans les autres lots traités.

⁽¹⁾ Connue actuellement sous le nom d'alanine transaminase sérique.

⁽²⁾ Connue actuellement sous le nom d'aspartate transaminase sérique.

2. RÉSULTATS

Les données seront résumées sous la forme de tableaux, indiquant pour chaque lot d'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:

Description de l'appareil d'exposition y compris conception, type, dimensions, source d'air, système générateur de particules et d'aérosols, méthode de conditionnement d'air, traitement de l'air évacué et, le cas échéant, méthode de stabulation des animaux dans la chambre d'essai. L'équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité et, si nécessaire, la stabilité des concentrations d'aérosol ou la granulométrie des particules sera décrit.

Données relatives à l'exposition

Ces données seront présentées sous la forme de tableaux indiquant des valeurs moyennes ainsi qu'une mesure de la variabilité (par exemple écart type) et porteront sur:

- a) les débits d'air à travers le dispositif d'inhalation;
 - b) la température et l'humidité de l'air;
 - c) les concentrations nominales (quantité totale de substance à tester introduite dans le dispositif d'inhalation, divisée par le volume d'air);
 - d) le cas échéant, la nature du véhicule;
 - e) les concentrations réelles dans la zone de respiration;
 - f) les dimensions médianes des particules (si nécessaire),
- réponse toxique par sexe et par concentration,
 - moment de la mort en cours d'expérience ou indication que l'animal était encore en vie à la fin de l'expérience,
 - description des effets toxiques ou autres; niveau d'exposition dépourvu d'effet,
 - moment de l'observation de tout signe anormal 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,
 - 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.

ÉTUDE DE TÉRATOGENICITÉ

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 différentes doses ou concentrations, au moins pendant la partie de la gestation couvrant l'organogénèse, à plusieurs lots d'animaux d'expérience gravides, à raison d'une dose par lot. Peu de temps avant la date présumée de la parturition, la mère est sacrifiée, l'utérus prélevé et son contenu examiné. Cette méthode d'essai explore l'embryotoxicité et la toxicité foetale.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

De jeunes femelles adultes et saines, n'ayant jamais été accouplées, d'âge et de taille homogènes, sont acclimatées aux conditions expérimentales pendant 5 jours au moins avant l'expérience. Les femelles sont accouplées avec des mâles dont la fécondité est établie, puis sont réparties au hasard entre les groupes traités. La fécondation peut s'effectuer soit naturellement soit par insémination artificielle.

La substance à tester est administrée quotidiennement aux femelles immédiatement après l'implantation et pendant toute la période d'organogénèse. Un jour avant le terme, les fœtus sont prélevés par hystérectomie et on examine les anomalies des viscères ou du squelette, y compris retard de croissance, ossification tardive et hémorragies intestinales.

*Conditions expérimentales**Animaux d'expérience*

Les espèces habituellement utilisées sont le rat, la souris, le hamster et le lapin, avec une préférence pour le rat et le lapin. Des souches de laboratoire courantes seront utilisées. La souche utilisée aura une fécondité suffisante et sera caractérisée par sa réaction aux agents tératogènes. Les animaux seront placés dans des cages individuelles.

Nombre et sexe

Au moins vingt rats, souris ou hamsters gravides ou douze lapines gravides sont nécessaires pour chaque dose. L'objectif est d'obtenir un nombre de portées et de petits suffisant pour évaluer le potentiel tératogène de la substance.

Doses

Trois doses au moins ainsi qu'un lot témoin seront utilisés. Si la substance à tester est administrée dans un véhicule, on utilisera également un lot témoin pour le véhicule. Les propriétés toxicologiques du véhicule doivent être connues; il ne doit avoir aucun effet tératogène ou autre sur la reproduction. À l'exception de la substance à tester, les animaux du (des) groupe(s) témoin(s) seront traités de la même manière que les sujets des groupes d'expérience.

À moins que la nature physique/chimique ou les propriétés biologiques de la substance ne s'y opposent, la dose la plus élevée mettra en évidence, dans les conditions idéales, une certaine toxicité chez la mère, par exemple une légère diminution du poids, mais n'entraînera pas la mort de plus de 10 % des mères. La dose la plus faible ne produira pas d'effets observables imputables à la substance à tester. La (les) dose(s) intermédiaire(s) se situera (situeront) géométriquement entre les doses fortes et faibles.

Essai de limite

Dans le cas de substances faiblement toxiques, si une dose d'au moins 1 000 mg/kg ne produit aucun effet toxique sur l'embryon ou aucun effet tératogène, on peut juger inutile de poursuivre l'expérience avec d'autres doses. Si une dose de moins de 1 000 mg/kg met en évidence une certaine toxicité chez la mère (comme précisé ci-dessus) mais n'a aucun effet nocif sur l'embryon, on peut juger inutile de poursuivre l'expérience avec d'autres doses.

Temps d'exposition

Lors de l'essai, le jour 0 est celui où l'on observe la présence d'un bouchon vaginal/ou de sperme (lorsque c'est possible). Le traitement couvrira la période de l'organogénèse, à savoir jours 6 - 15 pour le rat et la souris, jours 6 - 14 pour le hamster et 6 - 18 pour le lapin. Si le jour 0 est celui de l'accouplement ou de l'insémination artificielle, on ajoutera un jour à chacune des périodes mentionnées. La période de traitement peut aussi être prolongée jusqu'à environ un jour avant la date présumée de parturition.

Période d'observation

Un examen clinique attentif sera effectué au moins une fois par jour. Des examens complémentaires seront effectués quotidiennement et des mesures appropriées seront prises afin de réduire la perte d'animaux pour l'étude.

Mode opératoire

La substance à tester est administrée oralement par gavage. Elle sera administrée à peu près à la même heure tous les jours, pendant toute la durée du traitement.

La dose peut être calculée en fonction du poids des femelles au début du traitement ou, compte tenu du gain de poids rapide durant la gestation, elles peuvent être pesées périodiquement et la dose adaptée à leur poids le plus récent. Les signes de toxicité seront notés ainsi au fur et à mesure de leur apparition, avec indication de leur intensité et de leur durée. Les femelles présentant des signes d'avortement ou de parturition avant terme seront sacrifiées et soumises à un examen macroscopique complet. La période d'observation après traitement se poursuivra jusqu'à environ un jour avant le terme. Le but est de couvrir la plus grande partie de la période de gestation mais d'éviter les difficultés que pourrait présenter l'interprétation des résultats s'il y avait naissance naturelle. Pendant la période d'engagement, 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 somato-motrice et du comportement. La consommation alimentaire ainsi que le poids des animaux seront déterminés chaque semaine.

Autopsie

Au moment de la mort, en cours d'étude ou à l'issue de celle-ci, les sujets feront l'objet d'un examen macroscopique afin de rechercher toute anomalie structurale ou toute modification pathologique susceptibles d'avoir influencé la gestation. Immédiatement après la mort, l'utérus sera prélevé et son contenu examiné afin de relever le nombre d'embryons ou de fœtus morts ainsi que le nombre de fœtus vivants. Il est habituellement possible de déterminer le moment de la mort *in utero*. Le nombre de corps jaunes peut être déterminé chez les rats et les lapins. Le sexe et le poids de chaque fœtus seront déterminés; les poids seront notés et le poids moyen calculé. Après prélèvement, chaque fœtus fera l'objet d'un examen externe. Dans le cas des rats, des souris et des hamsters, 30 à 50 % des animaux de chaque portée seront préparés et examinés du point de vue des anomalies du squelette, les autres seront préparés et examinés afin de rechercher les anomalies des tissus mous par des méthodes appropriées. Dans le cas des lapins, chaque fœtus sera soigneusement disséqué afin de rechercher les anomalies des viscères, puis examiné du point de vue des anomalies du squelette.

2.

RÉSULTATS

Les données seront résumées sous la forme de tableaux indiquant, pour chaque groupe d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux gravides, le nombre et le pourcentage des fœtus vivants et de fœtus présentant des anomalies des tissus mous ou du squelette ainsi que leur lien avec des portées spécifiques. 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,
- réponse toxique par dose,
- dose dépourvue d'effet (si possible),
- moment de la mort en cours d'expérience ou indication que l'animal était encore en vie à la fin de l'expérience,
- description des effets toxiques ou autres,
- moment de l'observation de tout signe anormal et évolution de celui-ci,
- quantité de nourriture et poids corporel,
- durée de la gestation et information sur la portée (y compris données publiées),
- données relatives aux fœtus (vivant/mort, sexe, anomalie des tissus mous et du squelette),
- données sur la portée (vivant/mort, sexe, anomalie des tissus mous et du squelette pour chaque portée),
- traitement 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.

ÉTUDE DE LA TOXICITÉ CHRONIQUE

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 substance à tester est administrée normalement sept jours sur sept, par une voie appropriée, à plusieurs lots d'animaux d'expérience, à raison d'une dose par groupe, pendant une grande partie de leur vie. Pendant et après l'exposition à la substance à tester, les animaux d'expérience sont observés quotidiennement afin de déceler les manifestations de toxicité.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

Les animaux sont maintenus dans les conditions d'encagement et d'alimentation propres à l'expérience pendant au moins les cinq jours qui la précèdent. Avant de commencer l'essai, les jeunes animaux sains sont répartis au hasard entre le nombre de lots requis.

Conditions expérimentales

Animaux d'expérience

Le rat est l'espèce la mieux appropriée.

Compte tenu des résultats d'études antérieures, d'autres espèces (rongeurs ou autres) peuvent être utilisées. De jeunes animaux sains de souches de laboratoire courantes seront utilisés et le traitement commencera dès que possible après le sevrage.

Au début de l'essai, la différence de poids entre les animaux utilisés ne dépassera pas $\pm 20\%$ de la valeur moyenne. Si une étude orale subchronique a servi de phase préparatoire à une étude à long terme, la même espèce et la même souche seront utilisées pour les deux études.

Nombre et sexe

Dans le cas de rongeurs, 40 animaux au moins (20 femelles et 20 mâles) seront utilisés pour chaque dose et chaque lot témoin correspondant. Les femelles seront nullipares et non gravides. Si l'on prévoit de sacrifier certains animaux en cours d'expérience, il y a lieu d'augmenter en conséquence les effectifs des groupes.

Pour les non-rongeurs, un plus petit nombre d'animaux au moins quatre par sexe et par groupe, peut être accepté.

Niveaux de dose et fréquence d'exposition

Trois doses au moins seront utilisées en plus des groupes témoins correspondants. La dose la plus élevée sera suffisante pour produire des manifestations nettes de toxicité sans entraîner une mortalité excessive.

La dose la plus faible ne produira aucun effet toxique.

La dose (les doses) intermédiaire(s) aura (auront) une valeur proche de la moyenne entre la dose forte et la dose faible.

Les doses seront choisies en fonction de données obtenues lors d'essais préliminaires et d'études de toxicité effectuées antérieurement.

Il est prévu une exposition quotidienne. Si le produit chimique est administré dans l'eau de boisson ou incorporé à l'alimentation, il devra être constamment disponible.

Témoins

On utilisera un groupe témoin en tout point identique au groupe exposé, exception faite toutefois de l'exposition à la substance à tester.

Dans des conditions particulières telles que des études d'inhalation impliquant l'emploi d'aérosols ou l'utilisation d'un émulsifiant à activité biologique non caractérisée dans des études par voie orale, on utilisera un groupe témoin négatif concurrent. Le groupe témoin négatif est traité de la même façon que tous les autres animaux d'expérience, exception faite de l'exposition à la substance à tester ou à un véhicule quelconque.

Voie d'administration

Les deux principales voies d'administration sont la voie orale et la voie respiratoire (inhalation). Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance à tester ainsi que du mode d'exposition probable pour l'homme.

L'utilisation de la voie dermique pose des problèmes pratiques considérables. La toxicité chronique générale due à l'absorption percutanée peut normalement être déduite des résultats de l'essai par voie orale et de la quantité de substance absorbée par voie percutanée lors des essais de toxicité par voie percutanée antérieurs.

Études par voie orale

En cas d'absorption gastro-intestinale de la substance à tester, et si l'ingestion est une voie d'exposition humaine, sauf contre-indications, on utilise de préférence la voie orale. Les animaux recevront la substance à tester dans leur nourriture, dissoute dans l'eau de boisson, ou sous la forme de capsule. Dans les conditions idéales, la dose quotidienne sera administrée 7 jours sur 7 car l'administration pendant 5 jours sur 7 peut permettre à l'animal de récupérer ou à la toxicité de décroître durant la période où le traitement est interrompu et affecter, par conséquent, les résultats et les évaluations ultérieures. Cependant, pour des raisons essentiellement pratiques, on peut accepter que la substance soit administrée 5 jours sur 7.

Études d'inhalation

Les études d'inhalation posent des problèmes techniques beaucoup plus complexes que pour les autres voies d'administration, des recommandations plus détaillées sont données ici. Il convient également de noter que l'instillation intratrachéale constitue une méthode valable dans certains cas spécifiques.

Les expositions prolongées sont habituellement établies en fonction de l'exposition humaine possible: les animaux sont soit exposés 5 jours sur 7 (exposition intermittente) à raison de 6 heures par jour après équilibrage des concentrations dans la chambre d'essai, soit soumis 7 jours sur 7 (exposition permanente) à une exposition journalière de 22 à 24 heures, une heure par jour environ étant consacrée à l'alimentation des animaux (horaire régulier) et à l'entretien de la chambre d'essai.

Dans les deux cas, les animaux sont habituellement exposés à une concentration fixe du produit à tester. Une différence essentielle entre l'exposition intermittente et l'exposition permanente réside dans le fait que, dans le premier cas, les animaux disposent d'une période de 17 à 18 heures pour se remettre des effets de l'exposition quotidienne et même d'une période plus longue durant les week-ends.

L'exposition intermittente ou permanente sera choisie en fonction des objectifs de l'étude et de l'exposition humaine que l'on se propose de simuler. Il convient, toutefois, de tenir compte de certaines difficultés techniques: par exemple, les avantages qu'offre l'exposition permanente pour simuler les conditions ambiantes peuvent être contre-balançés par la nécessité d'alimenter et de faire boire les animaux pendant l'exposition ainsi que par les contraintes inhérentes à la complexité (et fiabilité) de la génération des aérosols et des vapeurs et des moyens de contrôle.

Chambre d'exposition

Les animaux seront exposés à la substance à tester dans des chambres d'inhalation conçues pour assurer un flux d'air dans des conditions dynamiques, avec au moins 12 renouvellements de l'air par heure, garantir un teneur en oxygène appropriée et une répartition uniforme du produit à tester dans l'air. Les chambres d'exposition et les chambres destinées aux animaux témoins seront identiques du point de vue de la construction et de la conception afin de garantir des conditions d'exposition en tout point comparable, à la seule exception de l'exposition à la substance à tester. Une pression légèrement négative est généralement maintenue à l'intérieur de la chambre afin d'empêcher les fuites de la substance à tester dans la zone environnante. Les chambres seront conçues de manière à réduire l'entassement des animaux d'expérience. En règle générale, pour assurer la stabilité de l'atmosphère de la chambre, le volume total des animaux d'expérience ne doit pas dépasser 5 % du volume de la chambre d'essai.

Mesures ou contrôles à effectuer:

- (i) le débit d'air: le débit d'air dans la chambre fera, de préférence, l'objet d'un contrôle continu;
- (ii) durant la période d'exposition quotidienne, la concentration ne variera pas de $\pm 15\%$ de la valeur moyenne.
Durant toute la durée de l'expérience, les concentrations journalières seront maintenues aussi constantes que possible;
- (iii) température et humidité: pour les rongeurs, la température sera maintenue à $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) et l'humidité à l'intérieur de la chambre sera de 30 à 70 %, sauf lorsqu'on utilise de l'eau pour mettre la substance à tester en suspension dans l'air dans la chambre d'essai. Ces deux paramètres seront, de préférence, contrôlés en permanence;
- (iv) analyse granulométrique des particules: une répartition granulométrique des particules sera effectuée pour les atmosphères de la chambre d'essai impliquant l'utilisation d'aérosols liquides ou solides. Les particules de l'aérosol seront d'une taille respirable pour l'animal d'expérience utilisé. Des échantillons des atmosphères des chambres d'essai seront prélevés dans la zone respirable par les animaux. L'échantillon d'air prélevé sera représentatif de la répartition des particules auxquelles les animaux sont exposés et représentera, sur une base gravimétrique, la totalité de l'aérosol en suspension, même si une grande partie de celui-ci n'est pas respirable. Les analyses granulométriques seront effectuées fréquemment durant la mise au point du système générateur afin de veiller à la stabilité de l'aérosol puis, par la suite, uniquement lorsqu'il sera nécessaire de déterminer de façon adéquate la stabilité de la répartition des particules auxquelles les animaux ont été exposés.

Durée de l'étude

La durée du traitement sera d'au moins 12 mois.

Mode opératoire**Observations**

Il sera procédé au moins une fois par jour à un examen clinique attentif. Des observations complémentaires seront faites quotidiennement et des mesures appropriées seront prises afin de réduire la perte d'animaux pour l'étude, par exemple autopsie ou cryobiologie pour les animaux trouvés morts ainsi qu'isolement ou sacrifice des animaux en mauvaise santé. Les animaux seront soigneusement observés afin de déceler l'apparition et l'évolution de toutes les manifestations de toxicité ainsi que pour réduire la perte d'animaux pour cause de maladie, d'autolyse ou de cannibalisme.

Les signes cliniques, y compris les modifications neurologiques et oculaires, ainsi que la mortalité seront relevés pour tous les animaux. Le moment de l'apparition des effets toxiques et leur évolution ainsi que les tumeurs suspectes seront notés.

Le poids de chaque animal sera déterminé et noté une fois par semaine durant les 13 premières semaines de la période d'essai, puis au moins une fois toutes les 4 semaines. La consommation alimentaire sera déterminée chaque semaine durant les 13 premières semaines de l'étude, puis tous les 3 mois environ, à moins que l'état de santé ou les modifications de poids corporel nécessitent une autre fréquence.

Examen hématologique

Un examen hématologique (par exemple, teneur en hémoglobine, hématocrite, numération des érythrocytes, des leucocytes, des thrombocytes ou étude de la coagulation) sera effectué au troisième et au sixième mois, puis tous les 6 mois environ ainsi qu'au terme de l'essai, sur des échantillons de sang prélevés chez tous les non-rongeurs ainsi que chez 10 rats/sexe de tous les groupes. Ces échantillons seront, si possible, prélevés chaque fois sur les mêmes rats. De plus, un échantillon sera prélevé chez tous les animaux n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs avant de commencer l'essai.

Si les observations cliniques indiquent une détérioration de l'état de santé des animaux durant l'étude, il sera procédé à une numération avec formule leucocytaire chez les animaux atteints.

La formule leucocytaire est établie sur les échantillons des animaux traités par la dose la plus élevée ainsi que sur ceux des animaux du groupe témoin. Cette formule n'est établie pour les groupes exposés à des doses plus faibles que si l'on constate un écart important entre le groupe exposé à la dose la plus élevée et le groupe témoin, ou si l'examen pathologique le justifie.

Examen des urines

Des échantillons d'urine seront collectés pour analyse chez tous les non-rongeurs ainsi que chez 10 rats/sexe de chaque groupe, si possible chez les mêmes rats et aux mêmes moments que pour l'examen hématologique. Qu'il s'agisse des non-rongeurs ou des rongeurs, il sera procédé aux déterminations suivantes:

- apparence; volume et densité pour chaque animal,

- protéines, glucose, cétones, signes discrets d'hémorragie (semi-quantitativement)
- et
- microscopie des sédiments urinaires (semi-quantitativement).

Chimie clinique

Tous les six mois environ ainsi qu'au terme de l'essai, des échantillons de sang sont prélevés, afin d'effectuer des déterminations chimiques cliniques, chez tous les animaux n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs ainsi que chez 10 rats/sexe de chaque groupe, en prenant si possible chaque fois les mêmes rats. De plus, un échantillon sera prélevé sur tous les animaux n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs avant de commencer l'essai. Le plasma est préparé à partir de ces échantillons et l'on procède aux déterminations suivantes:

- concentrations des protéines totales,
- concentration de l'albumine,
- analyse de la fonction hépatique [telle que activité phosphatase alcaline, activité SGOT ⁽¹⁾ et activité SGPT ⁽²⁾], gamma-glutamyl transpeptidase, ornithine-décarboxylase,
- métabolisme glucidique tel que glycémie à jeun,
- exploration fonctionnelle rénale telle qu'azote uréique du sang.

Autopsie

Un examen complet sera effectué sur tous les animaux, y compris ceux qui sont morts en cours d'expérience ou qui ont été sacrifiés à l'état moribond. Avant de sacrifier les animaux, des échantillons de sang seront prélevés afin d'établir la formule leucocytaire. Tous les organes ou tissus présentant des lésions macroscopiques visibles, des tumeurs ou des lésions soupçonnées d'être des tumeurs seront conservés. On tentera de mettre en corrélation les observations macroscopiques et microscopiques.

Tous les organes et tissus seront conservés en vue d'un examen au microscope. Il s'agit habituellement des organes et tissus ci-après: encéphale ⁽³⁾ (moelle/pont de Varole, cortex cérébelleux, cortex cérébral), hypophyse, thyroïde (y compris parathyroïdes), thymus, poumons (y compris trachée), cœur, aorte, glandes salivaires, foie ⁽³⁾, rate, reins ⁽³⁾, glandes surrénales ⁽³⁾, œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, cæcum, colon, rectum, utérus, vessie urinaire, ganglions lymphatiques, pancréas, gonades ⁽³⁾, organes génitaux annexes, femelle: glande mammaire, peau, musculature, nerf périphérique, moelle épinière (cervicale, thoracique, lombaire), sternum avec moelle osseuse et fémur (y compris articulation), yeux. Bien que l'inflation des poumons et de la vessie urinaire au moyen d'un fixateur constitue la meilleure manière de conserver ces tissus, l'inflation des poumons est essentielle dans les études d'inhalation si l'on veut effectuer les examens histopathologiques appropriés. Dans des études particulières telles que des études d'inhalation, tout le tractus respiratoire sera étudié y compris le nez, le pharynx et le larynx.

Si d'autres examens cliniques sont effectués, les informations obtenues seront communiquées avant de commencer les examens au microscope car elles peuvent fournir des indications précieuses au pathologiste.

Examen histopathologique

Toutes les modifications visibles, en particulier les tumeurs et autres lésions, observées sur un organe feront l'objet d'un examen au microscope. De plus, il est recommandée d'effectuer les examens suivants:

- a) Examen au microscope de tous les organes et tissus conservés et description complète de toutes les lésions observées
 - 1) sur tous les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude
 - et
 - 2) sur tous les animaux du(des) groupe(s) exposé(s) à la dose la plus élevée et sur tous les témoins.
- b) Les organes ou tissus présentant des anomalies spontanées ou éventuellement induites par la substance à tester seront également examinés dans les groupes exposés aux doses plus faibles.
- c) Si l'expérience met en évidence une altération substantielle de la longévité normale des animaux ou l'induction d'effets susceptibles d'affecter la réponse toxique, les animaux exposés à la dose immédiatement inférieure seront soumis à l'examen mentionné ci-dessus.
- d) L'incidence des lésions atteignant normalement la souche d'animaux utilisée (dans les mêmes conditions d'expérience, c'est-à-dire références antérieures) est indispensable pour évaluer correctement la signification des modifications observées sur les animaux exposés.

⁽¹⁾ Connue actuellement sous le nom d'alanine transaminase sérique.

⁽²⁾ Connue actuellement sous le nom d'aspartate transaminase sérique.

⁽³⁾ Ces organes prélevés sur 10 animaux par sexe et par groupe dans le cas des rongeurs et sur tous les non-rongeurs seront pesés de même que la thyroïde (et la parathyroïde) chez tous les non-rongeurs.

2. RÉSULTATS

Les données seront résumées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque groupe d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux atteints 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:
 - description de l'appareil d'exposition:
 - y compris conception, type, dimensions, source d'air, système générateur de particules et d'aérosols, méthode de conditionnement d'air, traitement de l'air évacué et, le cas échéant, mode de stabulation des animaux en chambre d'essai. L'équipement utilisé pour mesurer la température et, si nécessaire, l'humidité, la stabilité de la concentration d'aérosol ou la granulométrie, seront décrits;
 - données relatives à l'exposition:
 - elles seront présentées sous forme de tableaux indiquant des valeurs moyennes ainsi qu'une mesure de la variabilité (par exemple écart type) et porteront sur:
 - a) les débits d'air à travers le dispositif d'inhalation;
 - b) la température et l'humidité de l'air;
 - c) les concentrations nominales (quantité totale de substance à tester introduite dans le dispositif d'inhalation, divisée par le volume d'air);
 - d) le cas échéant, la nature du véhicule;
 - e) les concentrations réelles dans la zone de respiration;
 - f) les dimensions médianes des particules (si nécessaire),
- doses (y compris, le cas échéant, véhicule) et concentrations,
- réponse toxique par sexe et dose,
- dose ou concentration dépourvues d'effet,
- moment de la mort en cours d'expérience ou indication que l'animal était encore en vie à la fin de l'expérience,
- description des effets toxiques ou autres,
- moment de l'observation de tout signe anormal et évolution de celui-ci,
- quantité de nourriture et poids corporel,
- observations ophtalmologiques,
- épreuves hématologiques pratiquées et résultats complets,
- épreuves biochimiques cliniques pratiquées et résultats complets (y compris résultats de l'examen des urines),
- résultats d'autopsie,
- description détaillée de toutes les observations histopathologiques,
- traitement 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.

ÉTUDE DE CANCÉROGÈNESE

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 substance à tester est administrée normalement 7 jours sur 7, par une voie appropriée, à plusieurs groupes d'animaux d'expérience, à raison d'une dose par groupe, pendant la majeure partie de leur vie. Durant l'exposition à la substance à tester et après celle-ci, les animaux d'expérience sont observés quotidiennement afin de déceler les signes de toxicité, en particulier la formation de tumeurs.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Les animaux sont maintenus dans les conditions expérimentales d'encagement et d'alimentation pendant au moins 5 jours avant le début de l'étude. Avant de commencer l'étude, les animaux jeunes et en bonne santé sont randomisés et répartis entre le nombre de groupes requis.

Animaux d'expérience

L'espèce préférée est le rat.

Compte tenu des résultats d'études antérieures, d'autres espèces (rongeurs ou autres) peuvent être utilisées. De jeunes animaux sains de souches courantes de laboratoire doivent être utilisés et le traitement doit commencer dès que possible après sevrage.

Au début de l'étude, la différence de poids entre les animaux utilisés ne doit pas dépasser $\pm 20\%$ de la valeur moyenne. Si un essai de toxicité subchronique par voie orale a été réalisé antérieurement à l'essai à long terme, la même espèce, race/souche doit être utilisée pour les deux essais.

Nombre et sexe

S'agissant de rongeurs, au moins 100 animaux (50 femelles et 50 mâles) doivent être utilisés pour chaque niveau de dose et chaque groupe témoin correspondant. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Si l'on prévoit des sacrifices d'animaux en cours d'expérience, les effectifs doivent être augmentés en conséquence du nombre d'animaux qu'il est prévu de sacrifier avant la fin de l'expérience.

Doses et fréquence d'exposition

Outre les groupes témoins correspondants, trois niveaux de dose au moins devraient être utilisés. La dose supérieure devrait être suffisamment élevée pour montrer un effet de toxicité minimale tel qu'un faible ralentissement de la croissance du poids corporel (moins de 10%), sans altération notable de la durée de vie normale due à des effets autres que les tumeurs.

La dose la plus faible n'aura aucun effet sur la croissance, le développement et la longévité normale de l'animal et ne produira aucun effet toxique quelconque. En général, cette dose ne sera pas inférieure à 10% de la dose élevée.

La dose (les doses) intermédiaire(s) aura (auront) une valeur proche de la moyenne entre la dose forte et la dose faible.

Les niveaux de dose prendront en compte les données fournies par les essais et les études de toxicité effectués antérieurement.

L'exposition est de façon générale quotidienne.

Si le produit chimique est administré dans l'eau de boisson ou incorporé à la nourriture, il devra être constamment disponible.

Témoins

Les groupes témoins devront être en tout point identiques aux groupes traités, exception faite de l'exposition à la substance à tester.

Dans des conditions particulières, comme au cours des études par inhalation impliquant l'emploi d'aérosols ou l'utilisation d'un émulsifiant à activité biologique non étudiée au cours d'études par voie orale, on utilisera un groupe témoin supplémentaire non exposé au véhicule.

Voie d'administration

Les trois principales voies d'administration sont la voie orale, la voie cutanée (percutanée) et la voie respiratoire (inhalation). Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance à tester ainsi que de la voie probable d'exposition humaine.

Études par voie orale:

La voie orale d'administration est préférée, sauf contre-indications, si la substance est absorbée par voie gastro-intestinale, et si l'ingestion est une voie d'exposition humaine. Les animaux devront recevoir la substance à tester dans leur nourriture, dissoute dans l'eau de boisson ou sous la forme de capsule.

Dans les conditions idéales, la dose quotidienne sera administrée 7 jours sur 7 car l'administration 5 jours sur 7 peut permettre à l'animal de récupérer ou à la toxicité de décroître durant la période où le traitement est interrompu et affecter, par conséquent, les résultats et l'évaluation ultérieure. Cependant, pour des raisons essentiellement pratiques, on peut accepter que la substance soit administrée 5 jours sur 7.

Études par voie cutanée:

L'exposition cutanée par badigeonnage de la peau peut être retenue pour simuler une voie d'exposition importante pour l'homme et comme une façon d'induire des lésions cutanées.

Études d'inhalation:

Les études d'inhalation posant des problèmes techniques beaucoup plus complexes que les autres voies d'administration, des recommandations plus détaillées sont données ici. Il convient également de noter que l'instillation intratrachéale peut constituer une méthode valable dans certains cas spécifiques.

Les expositions prolongées sont habituellement établies en fonction de l'exposition humaine possible: les animaux sont soit exposés 5 jours sur 7 (exposition intermittente) à raison de 6 heures par jour après équilibrage des concentrations dans la cage d'expérimentation soit, si une exposition environnementale est possible chez l'homme, exposés 7 jours sur 7 (exposition continue) à raison de 22 à 24 heures par jour, une heure par jour environ étant consacrée à l'alimentation des animaux, selon un horaire régulier, et à l'entretien des cages d'expérimentation. Dans les deux cas, les animaux sont habituellement exposés à une concentration fixe de produits à tester. Une différence essentielle entre l'exposition intermittente et l'exposition continue réside dans le fait que dans le premier cas les animaux disposent d'une période de 17 à 18 heures pour récupérer des effets de l'exposition quotidienne et même d'une période plus longue durant les week-ends.

L'exposition intermittente ou permanente sera choisie en fonction des objectifs de l'étude et de l'exposition de l'être humain qui doit être simulée. Il convient toutefois de tenir compte de certaines difficultés techniques: par exemple, les avantages qu'offre l'exposition continue pour simuler les conditions ambiantes peuvent être contrebalancés par la nécessité d'alimenter et de faire boire les animaux durant l'exposition ainsi que par les contraintes inhérentes à la complexité (et fiabilité) de la génération des aérosols ou des vapeurs et des moyens de contrôle.

Enceintes d'exposition

Les animaux seront exposés à la substance à tester dans des cages d'inhalation conçues pour assurer un flux d'air dynamique d'au moins 12 renouvellements de l'air par heure, une teneur en oxygène appropriée et une répartition uniforme du produit à tester dans l'air. Les enceintes d'exposition et les enceintes témoins seront identiques du point de vue de la construction et de la conception afin de garantir des conditions d'exposition en tous points comparables, exception faite de l'exposition aux substances à tester. Une pression légèrement négative est

généralement maintenue à l'intérieur de la chambre afin d'empêcher les fuites de la substance à tester dans la zone environnante. Les enceintes seront conçues de manière à réduire l'entassement des animaux d'expérience. En règle générale, pour assurer la stabilité de l'atmosphère de l'enceinte, le volume total des animaux d'expérience ne doit pas dépasser 5 % du volume de l'enceinte d'exposition.

Mesures et contrôles à effectuer:

- (i) le débit d'air: le débit d'air dans la chambre fera, de préférence, l'objet d'un contrôle continu;
- (ii) concentration: durant la période d'exposition quotidienne, la concentration de la substance à tester ne variera pas de $\pm 15\%$ de la valeur moyenne. Durant toute la durée de l'étude, les concentrations quotidiennes seront maintenues aussi constantes que possible;
- (iii) température et humidité: pour les rongeurs, la température sera maintenue à $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) et l'humidité à l'intérieur de l'enceinte sera de 30 à 70 %, sauf lorsqu'on utilise de l'eau pour mettre la substance à tester en suspension dans l'air de la cage d'exposition. Ces deux paramètres seront, de préférence, contrôlés en permanence;
- (iv) analyse granulométrique des particules: une répartition granulométrique des particules sera effectuée pour les atmosphères des chambres où des aérosols liquides ou solides sont utilisés. Les particules de l'aérosol seront d'une taille inhalable pour l'animal d'expérience utilisé. Des échantillons de l'air des cages d'exposition seront prélevés à la hauteur des voies respiratoires des animaux. L'échantillon d'air prélevé sera représentatif de la répartition des particules auxquelles les animaux sont exposés et représentera, sur une base gravimétrique, l'ensemble de l'aérosol en suspension, même si une grande partie de celui-ci n'est pas inhalable. Les analyses granulométriques seront effectuées fréquemment durant la mise au point du système de génération afin de veiller à la stabilité de l'aérosol, et ensuite aussi souvent que nécessaire pendant les expositions pour déterminer de façon adéquate la stabilité de la répartition des particules auxquelles les animaux ont été exposés.

Durée de l'étude

Un essai de cancérogénicité couvre la majeure partie de la durée de vie normale des animaux d'expérience: 18 mois pour la souris et le hamster et 24 mois pour le rat; cependant pour certaines souches d'animaux ayant une plus grande longévité et/ou un faible taux de tumeur spontanée, l'essai sera de 24 mois pour la souris et le hamster et de 30 mois pour le rat. Il peut également être mis fin à une telle étude lorsque le nombre de survivants dans le groupe exposé à la dose la plus faible ou dans le groupe témoin atteint 25 %. S'il y a manifestement une réponse différente par sexe, chaque sexe sera considéré comme faisant l'objet d'une étude distincte. Lorsque seuls les sujets du groupe exposé à la dose élevée meurent prématurément pour des raisons de toxicité évidentes, il n'est pas nécessaire de mettre fin à l'essai à condition que les manifestations toxiques ne posent pas de problèmes dans les autres groupes. Pour qu'un résultat d'essai négatif soit acceptable, il faut que, par lot, il n'y ait pas plus de 10 % d'animaux perdus pour l'étude en raison d'autolyse, de cannibalisme ou de problèmes organisationnels et que le taux de survie dans tous les lots ne soit pas inférieur à 50 % après 18 mois en ce qui concerne la souris et le hamster et après 24 mois en ce qui concerne le rat.

Mode opératoire

Observations

Les observations quotidiennes sur les animaux en cage porteront notamment sur les modifications de la peau et du poil, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice ainsi que du comportement.

Il convient de surveiller régulièrement les animaux afin d'éviter, autant que possible, toute perte pour des raisons telles que cannibalisme, autolyse des tissus ou erreur d'encagement. Les animaux moribonds seront immédiatement mis à part et autopsiés.

Les signes cliniques ainsi que la mortalité seront notés pour tous les animaux. On attachera une attention spéciale à la formation de tumeur; le moment d'apparition, la localisation, les dimensions, l'apparence et l'évolution de toute tumeur nettement visible ou palpable seront notés.

La consommation alimentaire (ainsi que la consommation d'eau lorsque la substance à tester est administrée dans l'eau de boisson) sera déterminée chaque semaine durant les 13 premières semaines de l'étude, puis tous les trois mois environ, à moins que l'état de santé ou les modifications de poids corporel nécessitent une autre fréquence.

Les poids corporels seront relevés individuellement pour tous les animaux une fois par semaine durant les 13 premières semaines de l'étude, puis une fois toutes les 4 semaines au moins.

Examen clinique

Hématologie

Si les observations effectuées pendant la période d'encagement indiquent une détérioration de l'état de santé de certains animaux au cours de l'étude, on établira la formule sanguine des animaux affectés.

Un frottis sanguin est effectué pour tous les animaux au douzième et au dix-huitième mois ainsi qu'avant de les sacrifier. La formule sanguine est établie à partir des échantillons prélevés sur les témoins ainsi que sur les animaux du groupe exposé à la dose la plus élevée. Si ces données, en particulier celles obtenues avant de sacrifier les animaux, ou les données provenant de l'examen histopathologique en font apparaître le besoin, les formules sanguines sont également établies pour les animaux appartenant aux groupes exposés aux doses immédiatement inférieures.

Autopsie

Une autopsie complète sera effectuée pour tous les animaux, y compris ceux morts en cours d'expérience ou sacrifiés à l'état moribond. Tous les organes ou tissus présentant des tumeurs ou des lésions nettement visibles ou des lésions soupçonnées d'être des tumeurs seront conservés.

Les organes et tissus ci-après seront conservés dans un milieu approprié permettant d'éventuels examens histopathologiques ultérieurs: l'encéphale (y compris sections de la moelle/du pont de Varole, cortex cérébelleux et cortex cérébral), hypophyse, thyroïde/parathyroïde, tout tissu thymique, trachée et poumons, cœur, aorte, glandes salivaires, foie, rate, reins, glandes surrénales, pancréas, gonades, utérus, organes génitaux annexes, peau, œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, cæcum, colon, rectum, vessie, ganglions lymphatiques représentatifs, glande mammaire femelle, musculature de la cuisse, nerf périphérique, sternum avec moelle osseuse, fémur (y compris les articulations), moelle épinière à trois niveaux (cervical, médiathoracique et lombaire), yeux.

L'insufflation d'un fixateur dans les poumons et la vessie constitue la meilleure façon de conserver ces tissus; l'insufflation des poumons est absolument nécessaire dans les études d'inhalation si l'on veut procéder à des examens histopathologiques appropriés. Dans les études par inhalation, tout le tractus respiratoire sera conservé, y compris la cavité nasale, le pharynx et le larynx.

Examen histopathologique

- a) Les organes et tissus de tous les animaux morts ou sacrifiés en cours d'expérience ainsi que de tous les animaux du groupe témoin et du groupe exposé à la dose élevée seront soumis à un examen histopathologique complet.
- b) Toutes les tumeurs nettement visibles ou les lésions soupçonnées d'être des tumeurs dans tous les groupes feront l'objet d'un examen microscopique.
- c) Si l'on observe une différence significative dans l'incidence des lésions néoplasiques entre le groupe exposé à la dose la plus élevée et le groupe témoin, un examen histopathologique sera effectué pour l'organe ou le tissu concerné dans les autres groupes.
- d) Si le taux de survie dans le groupe exposé à la dose élevée est nettement inférieur à celui observé pour le groupe témoin, les animaux du groupe exposé à la dose immédiatement inférieure seront soumis à un examen complet.
- e) Si, dans le groupe exposé à la dose élevée, on observe une induction d'effets toxiques ou autres susceptibles d'affecter la réponse néoplasique, les animaux exposés à la dose immédiatement inférieure feront l'objet d'un examen complet.

2. RÉSULTATS

Les données seront résumées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux atteints de tumeurs décelées en cours d'expérience, le moment où celles-ci sont décelées et le nombre d'animaux sur lesquels des tumeurs sont observées à l'autopsie. Les résultats seront évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique validée peut être utilisée.

3. RAPPORT

3.1. Procès-verbal d'essai

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

- espèces souche, origine, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.,

- conditions d'essai:
 - description du système d'exposition:
y compris conception, type, dimensions, source d'air, système générateur de particules et d'aérosols, méthode de conditionnement d'air, traitement de l'air expiré et, le cas échéant, mode de stabulation des animaux en chambre d'essai. L'équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité et, si nécessaire, la stabilité des concentrations d'aérosol ou la granulométrie seront décrits;
 - données relatives à l'exposition:
elles seront présentées sous forme de tableaux indiquant des valeurs moyennes ainsi qu'une mesure de la variabilité (par exemple écart type) et porteront sur:
 - a) les débits d'air à travers le dispositif d'inhalation;
 - b) la température et l'humidité de l'air;
 - c) les concentrations nominales (quantité totale de substance à tester introduite dans le dispositif d'inhalation, divisée par le volume d'air);
 - d) le cas échéant, la nature du véhicule;
 - e) les concentrations réelles dans la zone de respiration;
 - f) les dimensions médianes des particules (si nécessaire),
- niveaux de dose (y compris, le cas échéant, véhicule) et concentrations,
- incidence des tumeurs par sexe, dose et type de tumeur,
- moment de la mort en cours d'expérience ou indication que l'animal était encore en vie à la fin de l'expérience,
- réponse toxique par sexe et dose,
- description des effets toxiques ou autres,
- le moment de l'observation de tout signe anormal et évolution de celui-ci,
- consommation alimentaire et poids corporel,
- résultats de l'examen hématologique,
- résultats d'autopsie,
- description détaillée de toutes les observations histopathologiques,
- traitement statistique des résultats et description des méthodes utilisées,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B.

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B.

ÉTUDE COMBINÉE DE CANCÉROGÉNÈSE ET DE TOXICITÉ CHRONIQUE**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 but d'une étude combinée de la toxicité chronique et de la cancérogénèse est de déterminer les effets chroniques et cancérogènes d'une substance sur une espèce mammifère à l'issue d'une exposition prolongée (à long terme).

C'est pourquoi une étude de cancérogénèse est complétée par au moins un groupe satellite traité et un groupe satellite témoin. La dose utilisée pour le groupe satellite soumis à la dose élevée peut être supérieure à celle utilisée pour le groupe soumis à la dose élevée dans l'étude de cancérogénèse. Dans cette dernière étude, les animaux sont examinés du point de vue de la toxicité générale ainsi que de la réponse cancérogène. Les animaux du groupe satellite traité sont examinés du point de vue de la toxicité générale.

La substance à tester est normalement administrée 7 jours sur 7 par une voie appropriée, à plusieurs groupes d'animaux d'expérience, à raison d'une dose par groupe, pendant la majeure partie de leur vie. Au cours et après l'exposition à la substance, les animaux d'expérience sont observés quotidiennement afin de déceler les signes de toxicité et le développement de tumeurs.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode

Les animaux sont maintenus dans les conditions expérimentales de stabulation et d'alimentation pendant au moins 5 jours avant l'expérience. Avant de commencer l'essai, les jeunes animaux sains sont randomisés et répartis entre les groupes requis (traités et témoins).

Animaux d'expérience

L'espèce préférée est le rat. Compte tenu des résultats d'études antérieures, d'autres espèces (rongeurs ou autres) peuvent être utilisées. De jeunes animaux sains de souches courantes de laboratoire doivent être utilisés et le traitement doit commencer dès que possible après sevrage.

Au début de l'étude, la différence de poids entre les animaux utilisés ne doit pas dépasser $\pm 20\%$ de la valeur moyenne. Si un essai de toxicité subchronique par voie orale a été réalisé à titre préliminaire à l'essai à long terme, la même espèce, race/souche doit être utilisée pour les deux essais.

Nombre et sexe

S'agissant de rongeurs, au moins 100 animaux (50 femelles et 50 mâles) seront utilisés pour chaque niveau de dose et chaque groupe témoin correspondant. Les femelles seront nullipares et non gravides. Si l'on prévoit des sacrifices d'animaux en cours d'expérience, il y a lieu d'augmenter les effectifs en conséquence.

Le(s) groupe(s) satellite(s) traité(s) pour évaluer les effets pathologiques autres que les tumeurs comprendra(ont) 20 animaux de chaque sexe, tandis que le groupe satellite témoin comprendra 10 animaux de chaque sexe.

Doses et fréquence d'exposition

Pour l'étude de la cancérogénèse, trois doses au moins seront utilisées, outre les groupes témoins correspondants. La dose supérieure devrait être suffisamment élevée pour montrer un effet de toxicité minimale tel qu'un faible ralentissement de la croissance du poids corporel (moins de 10%), sans altération notable de la durée de vie normale due à des effets autres que les tumeurs.

La dose la plus faible n'aura aucun effet sur la croissance, le développement et la longévité normale de l'animal et ne produira aucun effet toxique. En général, cette dose ne sera pas inférieure à 10% de la dose élevée.

La (les) dose(s) intermédiaire(s) aura (auront) une valeur proche de la moyenne entre la dose forte et la dose faible.

Les niveaux de dose prendront en compte les données fournies par les essais et les études de toxicité effectués antérieurement.

Pour l'étude de la toxicité chronique, on inclut dans l'étude d'autres groupes traités ainsi qu'un groupe satellite témoin correspondant. Pour les animaux du groupe satellite traité, la dose élevée sera choisie de manière à produire un effet toxique certain.

L'exposition est de façon générale quotidienne.

Si le produit chimique est administré dans l'eau de boisson ou incorporé à la nourriture, il devra être constamment disponible.

Témoins

Le groupe témoin sera en tous points identique au groupe traité, exception faite de l'exposition à la substance à tester.

Dans des conditions particulières, comme au cours des études par inhalation impliquant l'emploi d'aérosols ou l'utilisation d'un émulsifiant à activité biologique non étudiée au cours d'études par voie orale, on utilisera un groupe témoin supplémentaire non exposé au véhicule.

Voie d'administration

Les trois principales voies d'administration sont la voie orale, la voie dermique et la voie respiratoire (inhalation). Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance à tester ainsi que du mode probable de l'exposition humaine.

Études par voie orale:

La voie orale d'administration est préférée, sauf contre-indications, si la substance est absorbée par voie gastro-intestinale, et si l'ingestion est une voie d'exposition humaine. La substance à traiter sera administrée aux animaux dans leur nourriture, dissoute dans l'eau de boisson ou sous la forme de capsules.

Dans les conditions idéales, la dose quotidienne sera administrée 7 jours sur 7, car l'administration 5 jours sur 7 peut permettre à l'animal de récupérer ou à la toxicité de décroître durant la période où le traitement est interrompu et affecte, par conséquent, les résultats et l'évaluation ultérieure. Toutefois, pour des raisons essentiellement pratiques, on peut accepter que la substance soit administrée 5 jours sur 7.

Études par voie dermique:

L'exposition cutanée par badigeonnage de la peau peut être retenue pour simuler une voie d'exposition importante pour l'homme et comme une façon d'induire des lésions cutanées.

Études d'inhalation:

Les études d'inhalation posent des problèmes techniques beaucoup plus complexes que les autres voies d'administration, des recommandations plus détaillées sont formulées ici. Il convient également de noter que l'instillation intra-trachéale peut constituer une autre méthode valable dans certains cas spécifiques.

Les expositions prolongées sont habituellement établies en fonction de l'exposition humaine possible: les animaux sont soit exposés 5 jours sur 7 (exposition intermittente) à raison de 6 heures par jour après équilibrage des concentrations dans la cage d'expérimentation soit, si une exposition environnementale est possible chez l'homme, exposés 7 jours sur 7 (exposition continue) à raison de 22 à 24 heures par jour, une heure par jour environ étant consacrée à l'alimentation des animaux, selon un horaire régulier, et à l'entretien des cages d'expérimentation. Dans les deux cas, les animaux sont habituellement exposés à une concentration fixe de produits à tester. Une différence essentielle entre l'exposition intermittente et l'exposition continue réside dans le fait que dans le premier cas les animaux disposent d'une période de 17 à 18 heures pour récupérer des effets de l'exposition quotidienne et même d'une période plus longue durant les week-ends.

L'exposition intermittente ou permanente sera choisie en fonction des objectifs de l'étude et de l'exposition de l'être humain qui doit être simulée. Il convient toutefois de tenir compte de certaines difficultés techniques: par exemple, les avantages qu'offre l'exposition continue pour simuler les conditions ambiantes peuvent être contrebalancées par la nécessité d'alimenter et de faire boire les animaux durant l'exposition ainsi que par les contraintes inhérentes à la complexité (et fiabilité) de la génération des aérosols ou des vapeurs et des moyens de contrôle.

Enceintes d'exposition

Les animaux seront exposés à la substance à tester dans des cages d'inhalation conçues pour assurer un flux d'air dynamique d'au moins 12 renouvellements de l'air par heure, une teneur en oxygène appropriée et une répartition uniforme du produit à tester dans l'air. Les enceintes d'exposition et les enceintes témoins seront identiques du point de vue de la construction et de la conception afin de garantir des conditions d'exposition en tous points comparables, exception faite de l'exposition aux substances à tester. Une pression légèrement négative est généralement maintenue à l'intérieur de la chambre afin d'empêcher des fuites de la substance à tester dans la zone environnante. Les enceintes seront conçues de manière à réduire l'entassement des animaux d'expérience. En règle générale, pour assurer la stabilité de l'atmosphère de l'enceinte, le volume total des animaux d'expérience ne doit pas dépasser 5 % du volume de l'enceinte d'exposition.

Mesures et contrôles à effectuer:

- (i) le débit d'air: le débit d'air dans la chambre fera, de préférence, l'objet d'un contrôle continu;
- (ii) concentration: durant la période d'exposition quotidienne, la concentration de la substance à tester ne variera pas de $\pm 15\%$ de la valeur moyenne. Durant toute la durée de l'étude, les concentrations quotidiennes seront maintenues aussi constantes que possible;
- (iii) température et humidité: pour les rongeurs, la température sera maintenue à $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) et l'humidité à l'intérieur de l'enceinte sera de 30 à 70 %, sauf lorsqu'on utilise de l'eau pour mettre la substance à tester en suspension dans l'air de la cage d'exposition. Ces deux paramètres seront, de préférence, contrôlés en permanence;
- (iv) analyse granulométrique des particules: une répartition granulométrique des particules sera effectuée pour les atmosphères des chambres où des aérosols liquides ou solides sont utilisés. Les particules de l'aérosol seront d'une taille inhalable pour l'animal d'expérience utilisé. Des échantillons de l'air des cages d'exposition seront prélevés à la hauteur des voies respiratoires des animaux. L'échantillon d'air prélevé sera représentatif de la répartition des particules auxquelles les animaux sont exposés et représentera, sur une base gravimétrique, l'ensemble de l'aérosol en suspension, même si une grande partie de celui-ci n'est pas inhalable. Les analyses granulométriques seront effectuées fréquemment durant la mise au point du système générateur afin de veiller à la stabilité de l'aérosol, et ensuite aussi souvent que nécessaire pendant les expositions pour déterminer de façon adéquate la stabilité de la répartition des particules auxquelles les animaux ont été exposés.

Durée de l'étude

La partie de l'essai portant sur la cancérogénèse couvre la majeure partie de la durée de vie normale des animaux d'expérience. Elle durera 18 mois pour la souris et le hamster et 24 mois pour le rat; toutefois, pour certaines souches d'animaux ayant une plus grande longévité et/ou un faible taux de tumeurs spontanées, la durée sera de 24 mois pour la souris et le hamster et de 30 mois pour le rat. Il peut également être mis fin à une telle étude prolongée lorsque dans le groupe exposé à la dose la plus élevée ou dans le groupe témoin le nombre de survivants atteint 25 %. Lorsqu'il y a manifestement une réponse différente par sexe, chaque sexe sera considéré comme faisant l'objet d'une étude distincte. Lorsque seuls les sujets du groupe exposé à la dose la plus élevée meurent prématurément pour des raisons évidentes de toxicité, il n'est pas nécessaire de mettre fin à l'essai si les manifestations toxiques ne posent pas de problèmes dans les autres groupes. Pour qu'un résultat d'essai négatif soit acceptable, il faut que, par lot, il n'y ait pas plus de 10 % d'animaux perdus pour l'étude, pour cause d'autolyse, de cannibalisme ou de problèmes organisationnels et que le taux de survie dans tous les lots ne soit pas inférieur à 50 % après 18 mois en ce qui concerne la souris et le hamster et après 24 mois en ce qui concerne le rat.

Les groupes satellites de 20 animaux par sexe traités ainsi que les 10 animaux par sexe témoins qui y sont associés, utilisés pour l'essai de toxicité chronique seront conservés dans l'étude pendant au moins 12 mois. Ces animaux sont destinés à être sacrifiés afin d'évaluer la pathologie liée à la substance à tester en dehors de toute modification imputable au vieillissement.

Mode opératoire

Observations

Les observations quotidiennes sur les animaux en cage porteront notamment sur les modifications de la peau et du poil, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement.

Les animaux du (des) groupe(s) satellite(s) traité(s) seront soumis à un examen clinique à intervalles appropriés.

Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux pour éviter, autant que possible, toute perte pour des raisons telles que cannibalisme, autolyse des tissus ou erreur d'encagement. Les animaux moribonds seront immédiatement mis à part et autopsiés.

Les signes cliniques, y compris les modifications neurologiques et oculaires, ainsi que la mortalité seront notés pour tous les animaux. On accordera une attention spéciale à la formation de tumeurs; la date de formation et l'évolution des effets toxiques seront enregistrées; le moment de formation, la localisation, les dimensions, l'apparence et l'évolution de toute tumeur nettement visible ou palpable seront notés.

La consommation alimentaire (ainsi que la consommation d'eau lorsque la substance à tester est administrée dans l'eau de boisson) sera déterminée chaque semaine durant les 13 premières semaines de l'étude, puis tous les 3 mois environ, à moins que l'état de santé ou les modifications de poids corporel ne nécessitent une autre fréquence.

Les poids corporels seront relevés individuellement pour tous les animaux une fois par semaine durant les 13 premières semaines de l'étude, puis une fois toutes les 4 semaines au moins.

Examen clinique

Examen hématologique

Un examen hématologique (par exemple, teneur en hémoglobine, hématocrite, nombre total d'érythrocytes, nombre total de leucocytes, plaquettes sanguines, ou autres mesures de la coagulation) sera effectué sur des échantillons de sang prélevés sur 10 rats/ sexe de tous les groupes au troisième et au sixième mois, puis tous les six mois environ et enfin à l'issue de l'essai. Ces échantillons seront, si possible, prélevés chaque fois sur les mêmes rats.

Si les observations effectuées pendant la période d'encagement indiquent une détérioration de l'état de santé des animaux au cours de l'étude, la formule sanguine est établie sur les animaux affectés. La formule sanguine est réalisée avec des échantillons du lot à la plus forte dose et des témoins. Pour le (les) groupe(s) exposé(s) à la (aux) dose(s) immédiatement inférieure(s), une telle analyse n'est pratiquée que si l'on constate un écart important entre le groupe exposé à la dose la plus élevée et les témoins, ou si l'examen histopathologique le justifie.

Analyse des urines

Des échantillons d'urine seront collectés pour analyse sur 10 rats/ sexe de tous les lots; ces analyses seront faites si possible en même temps que l'examen hématologique. Les déterminations suivantes seront faites soit sur les animaux individuellement soit, pour les rongeurs, sur un *pool* des urines du même lot et du même sexe:

- apparence: volume et densité pour les animaux pris individuellement,
- protéines, glucose, corps cétoniques, hémorragie occulte (semi-quantitativement),
- microscopie du sédiment urinaire (semi-quantitativement).

Chimie clinique

Tous les 6 mois environ ainsi qu'à l'issue de l'essai, des échantillons de sang sont prélevés, afin d'effectuer des déterminations biologiques, chez tous les animaux n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs ainsi que chez 10 rats/ sexe de tous les lots, si possible, chaque fois sur les mêmes rats. De plus, un échantillon sera prélevé sur tous les animaux n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs avant de commencer l'étude. Le plasma, préparé à partir de ces échantillons, est utilisé pour les déterminations suivantes:

- concentration en protéines totales,
- concentration en albumine,
- tests de la fonction hépatique [tels qu'activité de la phosphatase alcaline, activités SGPT ⁽¹⁾ et SGOT ⁽²⁾], gamma-glutamyl transpeptidase, ornithine-décarboxylase,
- métabolisme glucidique tel que glycémie à jeun,
- tests de la fonction rénale, tels que l'urée sanguine.

(1) Connue actuellement sous le nom d'alanine transaminase sérique.

(2) Connue actuellement sous le nom d'aspartate transaminase sérique.

Autopsie

Un examen complet sera effectué sur tous les animaux, y compris ceux morts en cours d'expérience ou sacrifiés à l'état moribond. Avant de sacrifier les animaux, des échantillons de sang seront prélevés sur tous les animaux afin d'établir la formule sanguine. Tous les organes ou tissus présentant des lésions macroscopiques visibles, des tumeurs ou des lésions soupçonnées d'être des tumeurs seront conservés. On tentera de mettre en corrélation les observations macroscopiques et microscopiques.

Les organes et tissus ci-après seront conservés dans un milieu approprié permettant d'éventuels examens histopathologiques ultérieurs: l'encéphale ⁽¹⁾ (y compris sections de la moelle/du pont de Varole, cortex cérébelleux et cortex cérébral), hypophyse, thyroïde/parathyroïde, tout tissu thymique, trachée et poumons, cœur, aorte, glandes salivaires, foie ⁽¹⁾, rate, reins ⁽¹⁾, glandes surrénales ⁽¹⁾, pancréas, gonades ⁽¹⁾, utérus, organes génitaux annexes, peau, œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, cæcum, colon, rectum, vessie, ganglions lymphatiques représentatifs, glande mammaire femelle, musculature de la cuisse, nerf périphérique, sternum avec moelle osseuse, fémur (y compris les articulations), moelle épinière à trois niveaux (cervical, médiathoracique et lombaire), yeux.

L'insufflation d'un fixateur dans les poumons et la vessie constitue la meilleure façon de conserver ces tissus, l'insufflation des poumons est absolument nécessaire dans les études d'inhalation si l'on veut procéder à des examens histopathologiques appropriés. Dans les études par inhalation, tout le tractus respiratoire sera conservé, y compris la cavité nasale, le pharynx et le larynx.

Si d'autres examens cliniques sont effectués, les informations obtenues seront communiquées avant de commencer les examens microscopiques, car elles peuvent fournir des indications précieuses au pathologiste.

Histopathologie

Pour la partie portant sur l'essai de toxicité chronique:

Tous les organes prélevés chez les animaux du groupe satellite exposé à la dose élevée ainsi que du groupe témoin seront soumis à un examen détaillé. Lorsqu'une pathologie liée à la substance à tester est observée sur le groupe satellite exposé à la dose élevée, les organes cibles de tous les autres animaux de tout autre groupe satellite traité seront soumis à un examen histologique complet et détaillé de même que ceux appartenant aux groupes traités dans le cadre de l'essai de cancérogénèse, à l'issue de cette partie de l'étude.

Pour la partie portant sur l'essai de carcinogénicité:

- a) Les organes et tissus de tous les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'essai ainsi que de tous les animaux du groupe témoin et du groupe exposé à la dose élevée seront soumis à un examen histopathologique complet.
- b) Toutes les tumeurs nettement visibles ou les lésions soupçonnées d'être des tumeurs observées sur tout organe dans tous les groupes feront l'objet d'un examen microscopique.
- c) Si l'on observe une différence significative dans l'incidence des lésions néoplasiques dans le groupe exposé à la dose la plus élevée et le groupe témoin, un examen histopathologique sera effectué pour cet organe ou ce tissu particulier chez les animaux des autres groupes.
- d) Si le taux de survie dans le groupe exposé à la dose élevée est nettement inférieur à celui observé pour le groupe témoin, les animaux du groupe exposé à la dose immédiatement inférieure seront soumis à un examen complet.
- e) Si dans le groupe exposé à la dose élevée, on observe des effets toxiques ou autres susceptibles d'affecter la réponse néoplasique, les animaux exposés à la dose immédiatement inférieure seront soumis à un examen complet.

2. RÉSULTATS

Les données seront résumées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux présentant des tumeurs ou des manifestations toxiques décelées durant l'essai, le moment de cette détection et le nombre d'animaux présentant des tumeurs à l'autopsie. Les résultats seront évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique validée 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.,

⁽¹⁾ Ces organes, prélevés sur 10 animaux par sexe et par lot dans le cas des rongeurs, seront pesés.

— conditions d'essais:

description du système d'exposition:

conception, type, dimensions, source d'air, système générateur de particules et d'aérosols, méthode de conditionnement d'air, traitement de l'air expiré et, le cas échéant, mode de stabulation des animaux en chambres d'essai. L'équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité et, si nécessaire, la stabilité de la concentration d'aérosols ou la granulométrie des particules seront décrits;

données relatives à l'exposition:

elles seront présentées sous forme de tableaux indiquant des valeurs moyennes ainsi qu'une mesure de la variabilité (par exemple écart type) et porteront sur:

- a) les débits d'air à travers le dispositif d'inhalation;
- b) la température et l'humidité de l'air;
- c) les concentrations nominales (quantité totale de substance à tester introduite dans le dispositif d'inhalation, divisée par le volume d'air);
- d) le cas échéant, la nature du véhicule;
- e) les concentrations réelles dans la zone de respiration;
- f) les dimensions médianes des particules (si nécessaire),

— niveaux de doses (y compris, le cas échéant, véhicule) et concentrations,

— incidence des tumeurs par sexe, dose et type de tumeur,

— moment de la mort en cours d'expérience ou indication que l'animal était encore vivant à la fin de l'expérience, y compris animaux du groupe satellite,

— réponse toxique par sexe et dose,

— description des effets toxiques ou autres,

— moment de l'observation de tout signe anormal et évolution de celui-ci,

— observations ophtalmologiques,

— consommation alimentaire et poids corporel,

— résultats de l'examen hématologique,

— résultats des épreuves de biochimie clinique (y compris analyse des urines),

— résultats d'autopsie,

— description détaillée de toutes les observations histopathologiques,

— traitement statistique des résultats et description des méthodes utilisées,

— discussion des résultats,

— interprétation des résultats.

3.2. **Évaluation et interprétation**

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

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 à 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.

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 F₁, 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.

Mode opératoire

Plan d'expérience

On devrait commencer à administrer quotidiennement la substance aux mâles géniteurs (P) lorsqu'ils auront atteint 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 F₁. 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 oestral 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.

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.

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.

TEST DE REPRODUCTION SUR DEUX GÉNÉRATIONS**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 graduées à plusieurs groupes d'animaux mâles et femelles. Les mâles de la génération P devraient être traités durant leur croissance et pendant au moins un cycle spermatogène complet (environ 56 jours chez la souris et 70 jours chez le rat) de manière à déclencher un éventuel effet nocif de la substance à tester sur la spermatogenèse. Les femelles de la génération P devraient être traitées aux mêmes fins pendant au moins 2 cycles oestriques complets afin de permettre à la substance testée de produire quelques effets nocifs sur l'oestrus. Les animaux sont alors accouplés. La substance testée est administrée aux deux sexes pendant la période d'accouplement et ensuite seulement aux femelles pendant la gestation et la durée de la période d'allaitement. Au moment du sevrage, on continue à administrer la substance à la descendance F₁ durant sa croissance jusqu'à l'âge adulte, l'accouplement et la production d'une génération F₂, jusqu'au sevrage de la génération F₂. Si l'on veut administrer la substance à tester par voie respiratoire (inhalation), il faudra modifier la méthode.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai*Préparations*

Avant l'essai, les animaux sains sont randomisés et répartis en groupes traités et témoins. Les animaux géniteurs (P) 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 l'eau de boisson. D'autres voies d'administration sont également acceptables. La même méthode d'administration sera utilisée pour tous les animaux durant toute l'expérience. Si un véhicule ou d'autres additifs sont utilisés pour faciliter le dosage, ils devraient être reconnus sans effets toxiques. Le traitement devrait être effectué pendant les 7 jours de la semaine.

Animaux d'expérience: sélection de l'espèce

L'espèce convenant le mieux est celle du rat ou de la souris. Des lignées 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'effet de la substance sur la fécondité, la

gestation, le comportement maternel ainsi que l'allaitement, la croissance et le développement de la génération F₁ de la conception à la maternité, ainsi que le développement de leur descendance (F₂) jusqu'au sevrage.

Conditions d'essai

La nourriture et l'eau seront fournies à satiété. Lorsqu'elles seront proches du terme, les femelles gravides devraient être placées dans des cages de parturition ou de maternité individuelles et il peut leur être fourni les matériaux de nidification nécessaires.

Doses

On utilisera au moins 3 groupes traités et un groupe témoin. Si un véhicule est utilisé pour administrer la substance testée, le groupe témoin recevra le volume maximum de véhicule ayant été utilisé. Si une substance à tester entraîne une réduction de la consommation alimentaire et de l'assimilation, il peut être nécessaire d'utiliser un groupe témoin négatif. Dans les conditions idéales et à moins que la nature physique/chimique ou les effets biologiques de la substance testée ne s'y opposent, le niveau de doses le plus élevé produira un effet toxique mais pas la mort des animaux géniteurs (P). La (les) dose(s) intermédiaire(s) devrait(ent) produire les effets toxiques minimaux imputables à la substance à tester 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 celui-ci 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.

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 F₁. Des modifications du schéma thérapeutique 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.

Le traitement des animaux F₁ commence au sevrage et se termine lorsqu'ils sont sacrifiés.

Procédure d'accouplement

Dans les études de la toxicité sur la fonction de reproduction, les accouplements seront réalisés soit 1:1 (1 mâle, 1 femelle) soit 1:2 (1 mâle, 2 femelles).

Dans le cas d'un accouplement 1:1, une femelle devrait être placée avec le même mâle jusqu'à ce qu'elle soit gravide ou que les trois semaines se soient écoulées. Les femelles seront examinées chaque matin afin d'observer 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.

Compte tenu de la spermatogenèse, la descendance F₁ ne sera pas accouplée avant au moins l'âge de onze semaines pour les souris, de treize semaines pour les rats. Pour accoupler la descendance F₁, on sélectionne au hasard un mâle et une femelle de chaque portée en vue d'un accouplement croisé avec un petit d'une autre portée du groupe exposé à la même dose afin de produire la génération F₂. Les mâles et les femelles F₁ non sélectionnés pour l'accouplement sont sacrifiés au moment du sevrage.

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 animaux ayant déjà procréé, de procéder à un examen microscopique des organes de reproduction ou à l'examen du cycle oestral ou de la spermatogenèse.

Taille de la portée

On laisse les animaux traités durant l'étude de fertilité mettre bas naturellement et élever librement leur progéniture jusqu'au sevrage.

Quand une méthode d'homogénéisation des portées est faite, il est suggéré de procéder ainsi: entre le jour 1 et le jour 4 après la naissance, la taille de chaque portée peut être adaptée en éliminant, par sélection, les petits supplémentaires afin d'obtenir, dans toute la mesure du possible, 4 femelles et 4 mâles 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. Pour les portées F_2 , l'ajustement s'effectue de la même manière.

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 tout signe de toxicité, y compris la mortalité, devraient être enregistrés. Pendant les périodes de pré-accouplement et d'accouplement, on déterminera chaque jour la consommation alimentaire. Après la parturition et durant la lactation, la consommation alimentaire devrait être déterminée le jour de la pesée des petits. Les animaux géniteurs (P et F_1) devraient être pesés le premier jour du traitement, puis toutes les semaines. Ces observations seront notées individuellement pour chaque animal adulte.

La durée de la gestation sera calculée à partir du jour 0 de la gravidité. Chaque portée devrait être examinée dès que possible après la parturition 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 ainsi que ceux sacrifiés le quatrième jour devraient être conservés et examinés en vue de déceler d'éventuelles anomalies.

Les petits en vie seront 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 leur progéniture seront enregistrées.

Pathologie

Autopsie

Tous les animaux adultes P et F_1 devraient être sacrifiés lorsqu'ils cessent d'être nécessaires pour évaluer les effets sur la reproduction. La progéniture F_1 non retenue pour l'accouplement ainsi que toute la descendance F_2 devraient être sacrifiées au moment du sevrage.

Au moment du sacrifice ou de la mort en cours d'étude, tous les animaux géniteurs (P et F_1) devraient être soumis à un examen histologique afin de déceler toute anomalie structurelle ou toute modification pathologique, une attention particulière étant accordée aux organes de l'appareil de reproduction. Chez les petits, morts ou moribonds, on recherchera d'éventuelles malformations.

Histopathologie

Les ovaires, l'utérus, le col utérin, le vagin, les testicules, l'épididyme, les vésicules séminales, la glande coagulante, la prostate, l'hypophyse et l'(les) organe(s) cible(s) de tous les animaux P et F_1 sélectionnés pour l'accouplement seront conservés, le cas échéant, pour un examen microscopique. Si ces organes n'ont pas été examinés dans d'autres études à dose multiple, ils devraient être soumis à un examen histologique pour tous les animaux P et F_1 du groupe traité à la dose élevée et du groupe témoin sélectionnés pour l'accouplement ainsi que pour les animaux morts durant l'étude, lorsque c'est faisable. Les organes présentant des anomalies chez ces animaux seront examinés chez tous les animaux des groupes traités avec d'autres doses. Dans ce cas, un examen microscopique devrait être effectué pour tous les tissus présentant des modifications pathologiques macroscopiques. Comme suggéré dans les procédures d'accouplement, les organes de reproduction des animaux soupçonnés de stérilité peuvent être soumis à un examen microscopique.

2. RÉSULTATS*Traitement des 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 d'animaux gravides, le type de modification 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 indice de fécondité, de gestation et viabilité,
- moment de la mort en cours d'étude ou indication que l'animal était encore en vie au terme de l'étude,
- tableau présentant les poids de chaque portée, le poids moyen 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 et F₁ sélectionnés pour l'accouplement,
- résultats d'autopsie,
- description détaillée des observations microscopiques,
- traitement statistique des résultats, si nécessaire,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B.

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B.

TOXICOCINÉTIQUE

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 substance à tester est administrée par une voie appropriée. Suivant l'objectif poursuivi dans l'étude, la substance peut être administrée de façon unique ou répétée, pendant des périodes de temps déterminées, à un ou plusieurs groupes d'animaux d'expérience. La substance et/ou ses métabolites sont ensuite étudiés dans les liquides de l'organisme, les tissus et/ou les excréta.

Les études peuvent être effectuées avec des formes «marquées» ou «non marquées» de la substance à tester. En cas d'utilisation d'un marquage, la position de celui-ci dans la substance doit fournir un maximum d'informations sur le devenir du composé.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

De jeunes animaux adultes et en bonne santé sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours avant l'expérience. Avant de commencer l'essai, les animaux sont randomisés et répartis entre les groupes soumis au traitement. Dans des conditions particulières, des animaux très jeunes, gravides ou prétraités peuvent être utilisés.

*Conditions d'essai**Animaux d'expérience*

Les études toxicocinétiques peuvent être effectuées sur une ou plusieurs espèces animales appropriées et il sera tenu compte des espèces utilisées ou qu'il est prévu d'utiliser dans d'autres études toxicologiques portant sur la même substance à tester. Lorsque des rongeurs sont utilisés pour un essai, la différence de poids entre les animaux ne dépassera pas $\pm 20\%$ de la valeur moyenne.

Nombre et sexe

Pour les études d'absorption et d'excrétion, on utilisera au départ un lot de 4 animaux pour chaque dose. Le choix d'un sexe déterminé n'est pas obligatoire mais, dans certains cas, il peut s'avérer nécessaire d'étudier des animaux des deux sexes. En cas de réponses différentes selon le sexe, 4 animaux de chaque sexe seront testés. S'il s'agit de non-rongeurs, un plus petit nombre d'animaux peut être utilisé. Lors de l'étude de la distribution dans les tissus, il sera tenu compte, pour fixer la taille initiale de l'échantillon traité, du nombre d'animaux à sacrifier à chaque date d'examen fixé, ainsi que du nombre d'examen à envisager.

Pour l'étude du métabolisme, la taille de l'échantillon traité sera adaptée aux besoins de cette étude. Pour les études à doses multiples et à plusieurs examens intermédiaires, il sera tenu compte, pour la taille de l'échantillon traité, du nombre d'examens et de sacrifices prévus; le groupe doit, toutefois, se composer d'au moins deux animaux. La taille de l'échantillon traité sera suffisante pour permettre une évaluation acceptable de l'augmentation du taux, du plateau et de la diminution du taux (le cas échéant) de la substance à tester et/ou de ses métabolites.

Doses

Dans le cas d'une administration unique, on utilisera au moins deux niveaux de dose, à savoir une dose faible pour laquelle on n'observe aucun effet toxique et une dose élevée susceptible de modifier les paramètres toxicocinétiques ou pour laquelle on observe des effets toxiques.

Dans le cas d'une administration répétée, la dose faible est habituellement suffisante mais, dans certaines circonstances, une dose élevée peut aussi s'avérer nécessaire.

Voie d'administration

Les études toxicocinétiques seront effectuées par la même voie et, le cas échéant, avec le même véhicule que celui utilisé ou envisagé pour les autres études de toxicité. La substance à tester est habituellement administrée par voie orale (gavage ou incorporation dans l'alimentation) par application sur la peau ou par inhalation, pendant des périodes de temps déterminées, à plusieurs lots d'animaux d'expérience. L'administration de la substance à tester par voie intraveineuse peut être utile pour déterminer l'absorption relative par les autres voies. De plus, des informations utiles sur le mode de distribution peuvent être obtenues peu après l'administration intraveineuse d'une substance.

La possibilité d'une interférence du véhicule avec la substance à tester sera prise en considération. Une attention particulière sera portée aux différences d'absorption selon que la substance à tester est administrée par gavage ou dans l'alimentation et l'on veillera à déterminer la dose avec précision, en particulier lorsque la substance à tester est incorporée à l'alimentation.

Période d'observation

Tous les animaux feront l'objet d'une observation journalière; les signes de toxicité et autres manifestations cliniques notables ainsi que le moment de leur apparition, leur gravité et leur durée, seront signalés.

Conduite de l'essai

Après avoir pesé les animaux d'expérience, on administre la substance à tester par une voie appropriée.

Absorption

Le taux et le degré d'absorption de la substance administrée peuvent être évalués par différentes méthodes, en présence et en l'absence de groupes de référence ⁽¹⁾, par exemple:

- détermination de la quantité de substance à tester et/ou de ses métabolites dans les *excreta*, tels que urine, bile, fèces, air expiré et dans le contenu de la carcasse,
- comparaison de la réponse biologique (par exemple, étude de toxicité aiguë) obtenue pour les groupes d'expérience, les groupes témoins et/ou les groupes de référence,
- comparaison de la quantité de substance et/ou de métabolites excrétés par les reins dans les groupes d'expérience et de référence,
- détermination de l'aire sous la courbe taux plasmatique/temps, de la substance à tester et/ou de ses métabolites et comparaison avec les données obtenues pour un groupe de référence.

⁽¹⁾ Dans cette méthode, on entend par groupe de référence un groupe auquel la substance à tester est administrée par une autre voie garantissant une disponibilité complète de la dose.

Distribution

Il existe actuellement deux méthodes pour analyser les modes de distribution, l'une des deux ou toutes les deux pouvant être utilisées:

- les techniques d'autoradiographie du corps entier fournissent des informations qualitatives utiles,
- le sacrifice des animaux, à des périodes différentes après leur exposition et la détermination de la concentration et de la quantité de substance à tester et/ou de ses métabolites dans les tissus et les organes fournissent des informations quantitatives.

Excrétion

Dans les études d'excrétion, on collecte l'urine, les fèces, l'air expiré et, dans certains cas, la bile. La quantité de substance à tester et/ou de métabolites présents dans ces *excreta* sera mesurée à plusieurs reprises après l'exposition, jusqu'à ce que 95% environ de la dose administrée aient été éliminés, ou pendant sept jours consécutifs, si ce pourcentage n'est pas atteint avant.

Dans certains cas, il peut être nécessaire de tenir compte de la substance à tester éliminée dans le lait des animaux d'expérience qui allaitent.

Métabolisme

Des échantillons biologiques seront analysés par des méthodes adéquates afin de déterminer la voie métabolique et son intensité. Les structures des métabolites seront étudiées et des voies métaboliques appropriées seront proposées lorsqu'il y a lieu de répondre à des questions soulevées par des études toxicologiques antérieures. Il peut s'avérer utile d'effectuer des études *in vitro* en vue d'obtenir des informations sur les voies métaboliques.

Des informations complémentaires sur la relation entre le métabolisme et la toxicité peuvent être obtenues grâce à des études biochimiques telles que la détermination des effets sur des systèmes d'enzymes métabolisants, de la déplétion en composés endogènes à groupements sulfhydryles non protéiques, de la liaison avec les macromolécules.

2. RÉSULTATS

Selon le type d'étude effectuée, les données seront résumées sous la forme de tableaux étayés, le cas échéant, par des graphiques. Pour chaque groupe d'expérience, les variations moyennes et statistiques des mesures en fonction du temps, des doses, des tissus et des organes seront, le cas échéant, indiquées. Le degré d'absorption ainsi que les quantités excrétées et le rythme de l'excrétion seront déterminés par des méthodes appropriées. Lorsque des études du métabolisme sont effectuées, la structure des métabolites identifiés sera indiquée et les voies métaboliques possibles seront présentées.

3. RAPPORT

3.1. Procès-verbal d'essai

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

- espèces, souche, source, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.,
- caractéristiques des produits marqués, si ceux-ci sont utilisés,
- niveaux de dose et intervalles utilisés,
- voie(s) d'administration et tout véhicule utilisé,
- effets toxiques et autres observés,
- méthodes permettant de déterminer la substance d'essai et/ou ses métabolites dans les échantillons biologiques, y compris l'air expiré,
- mise en tableaux des mesures effectuées par sexe, dose, régime, temps, tissus et organes,

- indication du degré d'absorption et d'excrétion en fonction du temps,
- méthodes de caractérisation et d'identification des métabolites dans les échantillons biologiques,
- méthodes utilisées pour les mesures biochimiques en rapport avec le métabolisme,
- voies proposées pour le métabolisme,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. **Évaluation et interprétation**

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCE**

Voir introduction générale, partie B.

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 cycloheximide.

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 contre-sens 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 D₇, 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.

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 D₇ sont les plus fréquemment utilisées dans les études de mutation génique. D'autres souches peuvent également convenir.

Milieus

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.

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.

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 *crossing-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 D₄ (hétéroallélique pour *ade 2* et *trp 5*), D₇ (hétéroallélique pour *trp 5*), BZ₃₄ (hétéroallélique pour *arg 4*) et JD1 (hétéroallélique pour *his 4* et *trp 5*). Le *crossing-over* mitotique produisant des secteurs homozygotes de couleur rouge et rosé peut être déterminé dans D₅ ou dans D₇ (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), à 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.

*Conditions d'essai**Souches d'expérience*

Les souches les plus fréquemment utilisées sont les diploïdes D₄, D₅, D₇ 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 *crossing-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.

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 *crossing-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. $1 - 5 \times 10^7$ 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.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B.

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B.

CELLULES DE MAMMIFÈRE *IN VITRO* — ESSAI DE MUTATION GÉNIQUE

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

Les systèmes de culture de cellules de mammifères peuvent être utilisés pour déceler des mutations induites par des substances chimiques. Parmi les lignées cellulaires largement utilisées figurent les cellules de lymphome de souris L5178Y et les lignées cellulaires CHO et V-79 de hamsters chinois. Dans ces lignées cellulaires, les systèmes les plus fréquemment utilisés mesurent des mutations aux loci de la thymidine kinase (TK), de l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HPRT) ⁽¹⁾ et de Na⁺/K⁺ ATPase. Les systèmes mutationnels TK et HPRT décèlent des mutations de paire de bases, des mutations par décalage du cadre de lecture du code génétique (*frameshift mutations*) ainsi que de petites délétions; le système Na⁺/K⁺ décèle uniquement des mutations de paire de bases.

Les cellules déficientes en thymidine kinase (TK) du fait de la mutation directe TK⁺ → TK⁻ sont résistantes à la bromodéoxyuridine (BrdU), à la fluoro-déoxyuridine (FdU) ou à la trifluorothymidine (TFT) étant donné que ces antimétabolites ne sont pas incorporés dans les nucléotides cellulaires par la thymidine kinase du système enzymatique «de sauvetage»; les nucléotides nécessaires au métabolisme cellulaire sont uniquement obtenus à partir d'une synthèse *de novo*. Cependant, en présence de thymidine kinase, BrdU, FdU ou TFT sont incorporés dans les nucléotides, ce qui provoque une inhibition du métabolisme cellulaire et une cytotoxicité. Les cellules mutantes sont donc aptes à proliférer en présence de BrdU, FdU ou TFT contrairement aux cellules normales qui possèdent la thymidine kinase. De même, les cellules déficientes en HPRT sont sélectionnées par résistance à l'aza-8guanine (AG) ou à la thio-6 guanine (TG). Les cellules ayant une Na⁺/K⁺ ATPase altérée sont sélectionnées par résistance à l'ouabaïne.

La cytotoxicité se détermine en mesurant l'effet de la substance d'essai sur les aptitudes à former une colonie (efficacité de clonage) ou les taux de croissance des cultures. On établit la fréquence des mutants en ensemençant un nombre connu de cellules dans un milieu contenant l'agent sélectif afin de déceler les cellules mutantes et dans un milieu ne contenant pas d'agent sélectif afin de dénombrer les cellules survivantes. Après une période d'incubation adéquate, les colonies sont comptées. Les fréquences de mutants sont calculées à partir du nombre de colonies mutantes en fonction du taux de survie cellulaire.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparations

Cellules

Diverses lignées cellulaires peuvent être utilisées pour cet essai, notamment les sous-clones de L5178Y, les cellules CHO ou V-79 ayant une sensibilité prouvée aux mutagènes chimiques, une grande efficacité de clonage et une faible fréquence de mutation spontanée. Les cellules peuvent être périodiquement examinées afin de vérifier la stabilité du karyotype et seront contrôlées du point de vue de la contamination du mycoplasme. D'autres types de cellules peuvent être utilisés pour autant que leur validité en tant que révélateur de mutations géniques induites par voie chimique puisse être justifiée.

⁽¹⁾ Précédemment HGPRT.

Milieu

Des milieux de culture et des conditions d'incubation adéquates (par exemple température, matériel de culture utilisés, concentrations en CO₂ et humidité) seront utilisés. Les milieux et les sérums seront choisis en fonction des méthodes sélectives et du type de cellules utilisés pour l'essai.

Substance d'essai

Les substances d'essai peuvent être soit préparées dans les milieux de culture, soit dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés avant de procéder au traitement des cellules. La concentration finale du véhicule dans le milieu de culture ne devrait affecter ni la viabilité des cellules ni le taux de croissance.

Activation métabolique

Les cellules seront exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène de mammifère. Si on utilise des types de cellules ayant une activité métabolique intrinsèque, le taux et la nature de l'activité devraient être réputés convenir 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 devraient être inclus dans chaque expérience: un témoin négatif (véhicule) devrait être également utilisé.

Les substances ci-après pourront, par exemple, être utilisées comme témoins positifs:

- substances à action directe:
 - méthanesulfonate d'éthyle,
 - hycanthone,
- substances à action indirecte:
 - 2-acétylamino-fluorène,
 - 7, 12-diméthylbenzanthracène,
 - N-nitrosodiméthylamine.

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 seront utilisées. Ces concentrations devraient produire un effet toxique en rapport avec la concentration: la concentration maximale provoquant un faible taux de survie, la concentration minimale un taux de survie voisin de celui du témoin négatif. Les substances relativement insolubles dans l'eau seront testées jusqu'à leur limite de solubilité par des méthodes appropriées. Pour les 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

Le nombre de cellules utilisées par culture devrait être en rapport avec la fréquence de mutations spontanées; la règle générale consiste à utiliser un nombre de cellules viables égal à dix fois l'inverse de la fréquence de mutations spontanées.

Les cellules seront exposées pendant un laps de temps adéquat, une période de 2 à 5 heures étant, dans la plupart des cas, suffisante. 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, elles sont ensuite mises en culture afin de déterminer la viabilité et de permettre l'expression du phénotype mutant.

À l'issue de la période d'expression qui sera suffisamment longue pour permettre une expression phénotypique quasi optimale des mutants induits, les cellules sont cultivées dans un milieu comportant et ne comportant pas d'agents sélectifs en vue de déterminer le nombre de mutants ainsi que la viabilité.

Tous les résultats sont confirmés au cours d'une expérience indépendante.

2. RÉSULTATS

Les résultats devraient être présentés sous la forme de tableaux. Les comptages par boîte devraient être indiqués pour l'induction de mutation et la survie tant pour la substance d'essai que pour les témoins. Le nombre moyen de colonies par boîte ainsi que l'écart type devraient être également donnés. La fréquence de mutation sera exprimée en nombre de mutants par nombre de cellules survivantes. Le taux de survie et les efficacités de clonage sont exprimés en pourcentage du taux témoin.

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:

- lignée cellulaire utilisée, nombre de cultures cellulaires, méthodes d'entretien des cultures cellulaires,
- conditions d'essai: composition des milieux, concentration en CO₂, concentration de la substance d'essai, véhicule utilisé, température d'incubation, temps d'incubation, longueur de la période d'expression (y compris nombre de cellulesensemencées, sous-cultures et programmes d'apport nutritionnel, le cas échéant), durée du traitement, densité cellulaire pendant le traitement, type de système d'activation métabolique de mammifère utilisé, témoins positifs et négatifs, agent sélectif utilisé,
- justification du choix des doses,
- méthode utilisée pour dénombrer les cellules viables et mutantes,
- 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.

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 ($^3\text{H-TdR}$) dans l'ADN de cellules de mammifère ne se trouvant pas en phase S du cycle cellulaire. On peut déterminer l'incorporation de $^3\text{H-TdR}$ 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.

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 CO₂, 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 °C.

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.

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 ³H-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 autoradiographiques: Les cultures cellulaires sont exposées à la substance d'essai pendant des périodes de temps adéquates, puis traitées à la ³H-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 ³H-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 ³H-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 LSC 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 ³H-TdR incorporée sont déterminées.

Il faut noter que lorsque des lymphocytes humains sont utilisés, il n'est pas nécessaire de supprimer la réplication semi-conservatrice 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 lames 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 ^3H -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.

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 ^3H -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 ^3H -TdR incorporée dans le cytoplasme ainsi que le nombre de grains par noyau.

2.2. Déterminations LSC

Pour les déterminations LSC, l'incorporation de ^3H -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.

3.2. **Évaluation et interprétation**

Voir introduction générale, partie B.

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B.

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 CO₂ 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.
- 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:
 - méthanesulfonate d'éthyle,
- substance à action indirecte:
 - cyclophosphamide.

Le cas échéant, 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 °C. 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 °C.

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.

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 CO₂, 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.

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 (p.ex. 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.

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 germinale 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 spermatozoaires et les spermatogonies au moment du traitement.

Les femelles F₁ hétérozygotes provenant des croisements susmentionnés sont accouplées individuellement (c'est-à-dire une femelle par flacon) avec leurs frères. À la génération F₂, chaque culture est examinée afin de déceler l'absence de mâles du type sauvage. Si une culture s'avère provenir d'une femelle F₁ 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.

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 F₂ établies, nombre de cultures F₂ 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 traités,
- 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.

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 à 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.

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.

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 pour 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.

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 germinale 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 spermatozoïdes 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.

*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.

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.

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,
- 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.

CYTOGÉNÉTIQUE DES CELLULES GERMINALES DE MAMMIFÈRE *IN VIVO***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

Cette épreuve cytogénétique *in vivo* décèle les aberrations chromosomiques structurales dans les spermatogonies. Elle consiste à rechercher les aberrations de type chromatidiennes et chromosomiques par l'analyse des mitoses des spermatogonies.

La méthode utilise des préparations de testicules de mammifères exposés à la substance d'essai par des voies appropriées et sacrifiés à différents intervalles. Avant le sacrifice, les animaux sont, en outre, traités avec des inhibiteurs du fuseau, comme la colchicine, afin d'accumuler des cellules en phase de mitose de type métaphasique (c-métaphase). Des préparations de chromosomes sont réalisées et séchées à l'air, colorées et analysées au microscope.

L'analyse de spermatocytes en diacinèse-métaphase I pour des multivalents de translocation après traitement des cellules-souches des spermatogonies peut fournir des informations complémentaires utiles.

1.5. Critère qualitatif

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai**Préparations**

Les substances d'essai sont dissoutes dans une solution physiologique. Si elles sont insolubles, elles sont dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés. Des solutions de la substance d'essai fraîchement préparées seront utilisées. Si un véhicule est utilisé pour faciliter le traitement, il ne doit ni interférer avec la substance d'essai ni produire des effets toxiques.

Voie d'administration

En général, les substances d'essai ne seront administrées qu'une seule fois. En fonction des informations toxicologiques dont on dispose, un programme d'administration répétée peut être appliqué. Il ne peut toutefois l'être que si la substance d'essai ne produit pas d'effet cytotoxique sur les spermatogonies en différenciation.

Les voies d'administration sont en général par voie orale et par injection intrapéritonéale. D'autres voies d'administration peuvent être appropriées.

Animaux d'expérience

On utilise le plus couramment des souris et des hamsters chinois. Toute autre espèce de mammifère peut être utilisée.

Des mâles, ayant atteint la maturité sexuelle, sont utilisés et répartis au hasard dans les groupes traités et témoins.

Nombre d'animaux

Au moins 5 mâles par groupe d'expérience et par groupe témoin sont utilisés.

Utilisation de témoins négatifs et positifs

En général, des témoins positifs et négatifs (véhicule) sont simultanément inclus dans chaque expérience.

En ce qui concerne les substances témoins, on utilisera une dose faible appropriée afin de démontrer la sensibilité du test (par exemple mitomycine C, i.p., à raison de 0,3 mg/kg).

Doses

On utilise une dose de la substance d'essai, à savoir la dose maximale tolérée ou celle produisant des signes de cytotoxicité. Si cette dose entraîne la destruction d'un grand nombre de cellules, on devrait utiliser une dose plus faible produisant une cytotoxicité. S'il faut établir une relation dose-réponse, trois doses au moins sont nécessaires (par exemple pour confirmer une réponse légèrement positive). Les substances non toxiques sont testées à la dose maximale possible qu'il s'agisse d'administration unique ou répétée.

Conduite de l'essai

En général, la substance d'essai n'est administrée qu'une seule fois. Dans le groupe exposé à la dose maximale, des échantillons sont prélevés à trois reprises après le traitement. Le prélèvement central a lieu après 24 heures. Comme la cinétique du cycle cellulaire peut être influencée par la substance d'essai, le premier prélèvement et le dernier prélèvement ont lieu, à des intervalles appropriés, dans un délai de 6 à 48 heures après l'administration de la substance. Lorsque des doses supplémentaires sont utilisées, des échantillons sont prélevés durant la phase particulièrement sensible ou, lorsque celle-ci n'est pas connue, 24 heures après le traitement.

Alternativement un programme de traitement répété peut être appliqué. Dans ce cas, les animaux sont sacrifiés 24 heures après le dernier traitement. Des échantillons additionnels peuvent être prélevés entre 6 et 24 heures après le dernier traitement.

Préparation des testicules

Afin d'analyser les mitoses des spermatogonies, on injecte aux animaux, par voie intrapéritonéale, une dose appropriée d'un inhibiteur du fuseau tel que la colchicine. Les animaux sont ensuite sacrifiés dans un délai approprié. Dans le cas des souris, ce délai varie entre 3 à 5 heures; pour les hamsters chinois, il peut être supérieur à 5 heures.

La méthode utilisée est celle du séchage à l'air. Suivant l'espèce, il peut s'avérer nécessaire de modifier la méthode standard. Des suspensions cellulaires sont obtenues et traitées avec une solution hypotonique, puis fixées. Les cellules sont étalées sur des lames et colorées. Les lames sont codées avant d'être analysées au microscope.

Analyse

Au moins 100 métaphases mitotiques, bien étalées, ayant le nombre correct de centromères, sont analysées en vue de déceler des aberrations chromosomiques structurales. De plus, le taux de mitoses des spermatogonies par rapport à la première et à la seconde métaphase méiotique peut être déterminé dans un échantillon total de 100 cellules en division par animal, afin de mettre en évidence un éventuel effet cytotoxique.

2. RÉSULTATS

Les données sont présentées sous la forme de tableaux, Tous les types d'aberration sont répertoriés séparément pour chaque animal traité et témoin. Le nombre total de cellules analysées et le nombre total de cellules aberrantes par groupe sont inclus. Les moyennes et l'écart-type sont indiqués pour tous les paramètres. Le taux moyen des mitoses des spermatogonies par rapport à la première et à la seconde métaphase méiotique est présenté, sous la forme de tableaux, pour chaque groupe d'expérience et chaque groupe témoin.

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 et souche des mâles, âge et poids des mâles,
- nombre d'animaux de chaque groupe d'expérience et de chaque groupe témoin,
- conditions d'essai, description, détaillée du traitement, doses, solvants, inhibiteur du fuseau utilisé,
- nombre de cellules analysées par testicule et par animal dans chaque groupe,
- séparément pour chaque animal traité et témoin, type et nombre d'aberrations indiquées,
- 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.

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, ln 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.

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 la 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)
et
- c) les taches pigmentées et blanches, réparties au hasard sur le pelage, présumées être dues à des mutations somatiques (RS).

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.

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_1 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.

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.

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 le 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 diacynèses 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 diacynèse 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.

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 diacynèse-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.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B.

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B.

PARTIE C: MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE L'ÉCOTOXICITÉ**INTRODUCTION GÉNÉRALE: PARTIE C**

Les méthodes d'essai décrites ci-après sont utilisées pour la détermination de certaines propriétés écotoxicologiques énumérées à l'annexe VIII de la directive 79/831/CEE. Les déclarants doivent savoir que les méthodes de détermination des propriétés suivantes prévues au niveau 1 de l'annexe VIII ne sont pas incluses dans le texte:

- étude de toxicité prolongée avec *Daphnia magna*,
- essai sur une plante supérieure,
- étude de toxicité prolongée avec un poisson,
- essai pour accumulation dans une espèce.

Lorsque des méthodes d'essai pour la détermination de ces propriétés auront été mises au point, elles seront publiées sous forme de nouvelle adaptation au progrès technique. Dans l'intervalle, les notifiants doivent utiliser des méthodes adéquates et reconnues à l'échelon international qui auront été communiquées à l'autorité compétente.

ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE DES ALGUES

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Le but de cet essai est de déterminer les effets d'une substance sur la croissance d'une espèce d'algue verte unicellulaire. Des essais relativement courts permettent d'évaluer ces effets sur plusieurs générations. Cette méthode peut être adaptée à des espèces d'algues unicellulaires différentes, auquel cas une description de la méthode utilisée doit être fournie avec le procès-verbal d'essai.

Cette méthode s'applique le plus facilement à des substances solubles dans l'eau, qui, dans les conditions de l'essai, sont susceptibles de rester dans l'eau.

Pour les substances qui ont une solubilité limitée dans le milieu d'essai, il peut s'avérer impossible de déterminer quantitativement la CE_{50} (voir définitions ci-dessous).

Cette méthode peut être utilisée pour les substances qui n'interfèrent pas directement sur la mesure de la croissance des algues.

Les informations suivantes peuvent s'avérer utiles pour l'exécution de l'essai:

- solubilité dans l'eau,
- pression de vapeur,
- formule développée,
- pureté de la substance,
- stabilité chimique dans l'eau et à la lumière,
- méthodes d'analyse quantitative de la substance dans l'eau,
- valeur du pKa,
- coefficient de partage n-octanol/eau,
- résultats d'un essai de biodégradabilité dite «facile».

1.2. Définitions et unités

La concentration cellulaire est le nombre des cellules par millilitre.

La croissance est l'augmentation de la concentration cellulaire pendant la durée de l'essai.

Le taux de croissance est l'augmentation de la concentration cellulaire par unité de temps.

La CE_{50} , dans la présente méthode, est la concentration de la substance d'essai qui entraîne une réduction de 50 % de la croissance ou du taux de croissance par rapport au témoin.

La concentration sans effet observé (CSEO), dans la présente méthode, est la concentration testée la plus élevée pour laquelle le(s) paramètre(s) mesuré(s) n'indique(nt) aucune inhibition de la croissance significative par rapport aux valeurs du témoin.

1.3. Substances de référence

Une substance de référence peut servir à détecter des conditions d'essai non satisfaisantes. Si une substance de référence est utilisée, les résultats doivent être indiqués dans le procès-verbal d'essai. Le dichromate de potassium peut être utilisé comme substance de référence.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Des cultures d'une algue verte sélectionnée, en phase exponentielle de croissance, sont exposées dans des conditions définies à différentes concentrations de la substance d'essai sur plusieurs générations. On détermine sur une période définie l'inhibition de la croissance par rapport à une culture témoin.

1.5. Critères de qualité

1.5.1. Conditions de validité de l'essai

La concentration cellulaire dans les cultures témoins doit être multipliée par un facteur au moins égal à 16 sur une période de trois jours.

Le fait que la substance d'essai passe de l'eau à la biomasse n'invalide pas nécessairement l'essai.

1.6. Description de la méthode d'essai

1.6.1. Préparations

1.6.1.1. Équipement et matériel

- Équipement habituel de laboratoire
- Flacons d'essai de volumes adéquats (par exemple des erlenmeyers de 250 ml conviennent lorsque le volume de la solution d'essai est de 100 ml)
- Appareillage destiné aux cultures: hotte ou enceinte où on peut maintenir à plus ou moins deux degrés près une température constante comprise entre 21 et 25 °C et un éclairage uniforme continu dans le domaine de longueur d'onde de 400 à 700 nm. [Un flux quantique de $0,72 \times 10^{20}$ photons/m²s \pm 20 % est recommandé. Ce flux quantique équivaut à 120 μ E/m²s et peut être obtenu à l'aide de lampes universelles à fluorescence blanche (température de la lumière: environ 4 200 K) fournissant approximativement 8 000 lux (mesure effectuée avec un collecteur sphérique)]
- Appareillage permettant de déterminer les concentrations cellulaires, par exemple compteur électronique de particules, microscope avec chambre de comptage, fluorimètre, spectrophotomètre, colorimètre (*Note:* pour obtenir des mesures utiles pour de faibles concentrations cellulaires quand on utilise un spectrophotomètre, il peut s'avérer nécessaire d'utiliser des cuves d'une longueur d'au moins 4 cm)

1.6.1.2. Milieu pour les algues

Le milieu suivant est recommandé:

NH ₄ Cl:	15	mg/l,
MgCl ₂ .6H ₂ O:	12	mg/l,
CaCl ₂ .2H ₂ O:	18	mg/l,
MgSO ₄ .7H ₂ O:	15	mg/l,
KH ₂ PO ₄ :	1,6	mg/l,
FeCl ₃ .6H ₂ O:	0,08	mg/l,
Na ₂ EDTA.2H ₂ O:	0,1	mg/l,
H ₃ BO ₃	0,185	mg/l,
MnCl ₂ .4H ₂ O:	0,415	mg/l,
ZnCl ₂ :	3×10^{-3}	mg/l,
CoCl ₂ .6H ₂ O:	$1,5 \times 10^{-3}$	mg/l,
CuCl ₂ .2H ₂ O:	10^{-5}	mg/l,
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O:	7×10^{-3}	mg/l,
NaHCO ₃ :	50	mg/l.

Le pH de ce milieu après mise en équilibre l'air est d'environ 8.

L'utilisation d'autres milieux n'est pas exclue par la recommandation ci-dessus, à condition toutefois que les limites suivantes pour les constituants essentiels soient respectées:

P:	≤ 0,7 mg/l,
N:	≤ 10 mg/l,
Chelateurs:	≤ 10^{-3} mmol/l,
Dureté (Ca + Mg):	≤ 0,6 mmol/l.

Le milieu recommandé et le milieu indiqué en référence (1) répondent à ces conditions.

1.6.1.3. Organismes d'essai

Sélection des espèces:

Il est proposé que l'espèce d'algue verte utilisée soit une espèce à croissance rapide qui soit commode à cultiver et à tester. Les espèces suivantes sont considérées comme adéquates:

- *Selenastrum capricornutum* ATCC 22662,
- *Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG,
- *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11b.

Si d'autres espèces sont utilisées, on doit en mentionner la souche.

1.6.1.4. Conception de l'essai

Concentration cellulaire initiale:

Pour *Selenastrum capricornutum* et *Scenedesmus subspicatus*, il est recommandé que la concentration cellulaire initiale dans les cultures d'essai soit approximativement de 10^4 cellules/ml. Quand d'autres espèces sont utilisées, la biomasse doit être comparable.

Concentrations de la substance d'essai:

Le domaine de concentration à l'intérieur duquel des effets sont susceptibles de survenir est déterminé en se basant sur des résultats provenant d'essais de détermination des ordres de grandeur. Pour l'essai on doit choisir au moins cinq concentrations variant selon une série géométrique. La concentration testée la plus faible ne doit avoir aucun effet observé sur la croissance des algues. La concentration testée la plus élevée doit inhiber la croissance d'au moins 50 % par rapport au témoin et elle doit de préférence arrêter complètement la croissance.

Essais en double et témoins:

Le plan d'expérience doit inclure de préférence trois essais en parallèle pour chaque concentration d'essai et normalement deux fois plus de témoins. Si cela est justifié, le protocole d'essai peut être modifié en augmentant le nombre de concentrations et en réduisant le nombre d'essais en parallèle par concentration.

Quand on utilise un véhicule pour solubiliser la substance à étudier, le protocole d'essai doit inclure des témoins supplémentaires contenant le véhicule à la concentration la plus élevée utilisée dans les cultures d'essai.

1.6.2. Exécution de l'essai

Les paragraphes suivants contiennent des indications pour l'étude de substances facilement solubles, de substances faiblement solubles et de substances volatiles.

1.6.2.1. Essai de substances facilement solubles dans l'eau

Des cultures d'essai contenant les concentrations voulues de la substance d'essai et la quantité désirée d'*inoculum* d'algue sont préparées en diluant la solution mère de la substance d'essai et la suspension d'algues avec le milieu pour algue filtré.

Les flacons de culture 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, on peut agiter, remuer ou aérer. Les cultures doivent être maintenues à une température comprise entre 21 et 25 °C, contrôle à ± 2 °C près.

On détermine la concentration cellulaire dans chaque flacon au moins 24, 48 et 72 heures après le début de l'essai. On utilise le milieu pour algue filtré pour déterminer le bruit de fond quand on emploie des compteurs de particules ou comme blanc quand on emploie des spectrophotomètres.

Le pH est mesuré au début de l'essai et au bout de 72 heures. Normalement le pH des solutions ne doit pas varier de plus d'une unité au cours de l'essai.

1.6.2.2. Essai de substances ayant une solubilité limitée dans l'eau

Quand la solubilité de la substance d'essai est de l'ordre de grandeur de la concentration la plus élevée utilisée dans l'essai, seules de légères différences par rapport au mode opératoire ci-dessus sont nécessaires pour préparer les solutions d'essai. Une solution saturée peut servir de solution mère de la substance d'essai. Une autre méthode peut consister à dissoudre la substance d'essai à la concentration désirée dans le milieu pour algue avant d'introduire la suspension d'algues.

Des solutions mères de substances faiblement solubles dans l'eau peuvent être préparées par dispersion mécanique ou en utilisant des véhicules de faible toxicité pour les algues, tels que des solvants organiques, des émulsifiants ou des dispersants. Quand on utilise un véhicule, sa concentration ne doit pas dépasser 100 mg/l et on doit inclure dans la conception de l'essai des témoins supplémentaires dans lesquels le véhicule est incorporé à la concentration la plus élevée présente dans les solutions d'essai.

1.6.2.3. Essai de substances volatiles

À l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode universellement agréée pour tester les substances volatiles. Quand une substance est connue pour sa tendance à se vaporiser, on peut utiliser des flacons d'essai fermés avec un espace libre plus grand au dessus du mélange. Des variantes à cette méthode ont été proposées [voir la référence (1)]. On doit essayer de déterminer la quantité de substance qui reste dans la solution, et il est conseillé d'interpréter avec une extrême prudence les résultats des essais effectués avec des produits chimiques volatils dans des systèmes clos.

2. RÉSULTATS ET ÉVALUATION

On porte dans un tableau les concentrations cellulaires mesurées dans les cultures d'essai et dans les témoins, les concentrations de la substance d'essai et les horaires des mesures. Afin d'obtenir des courbes de croissance, on porte sur un graphique la valeur moyenne de la concentration cellulaire pour chaque concentration de la substance d'essai et pour les témoins, en fonction du temps.

Pour déterminer la relation existant entre l'effet et la concentration, on doit utiliser l'une des méthodes ci-dessous.

2.1. Comparaison des surfaces sous les courbes de croissance

L'aire existant sous les courbes de croissance peut être calculée d'après la formule:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

où

A = l'aire,

N_0 = le nombre nominal de cellules/ml à l'instant t_0 ,

N_1 = le nombre mesuré de cellules/ml à l'instant t_1 ,

N_n = le nombre mesuré de cellules/ml à l'instant t_n ,

t_1 = l'instant de la première mesure après le début de l'essai,

t_n = l'instant de la $n^{\text{ième}}$ mesure après le début de l'essai.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire à chaque concentration de la substance d'essai (I_A) est calculé comme la différence entre l'aire située sous la courbe de croissance témoin (A_c) et l'aire située sous la courbe de croissance pour chacune des concentrations de la substance d'essai (A_t) selon:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

Les valeurs de I_A sont portées sur papier semi-logarithmique ou sur papier semi-logarithmique avec probits en fonction des concentrations correspondantes. Si les points sont portés sur du papier en «probits», ils sont reliés par une droite, ou bien quand il y a lieu de supposer qu'il existe une distribution log-nominale des valeurs, on peut déterminer la droite de régression.

On obtient la valeur de la CE_{50} à l'intersection de la droite (de régression) et de la parallèle à l'axe des abscisses $I_A = 50\%$. Pour désigner sans ambiguïté la valeur obtenue par cette méthode de calcul, il est proposé d'utiliser le symbole $CE_{b,50}$. Dans cette méthode qui préconise des mesures à 24, 48 et 72 heures, le symbole devient $CE_{b,50}$ (0-72 h).

D'autres valeurs de la CE , comme la $CE_{b,10}$ peuvent également être obtenues à partir du graphe de I_A en fonction du logarithme de la concentration.

2.2. Comparaison des taux de croissance

Le taux de croissance spécifique moyen (μ) pour des cultures en phase exponentielle de croissance peut être calculé comme suit:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

Le taux de croissance spécifique moyen peut également être obtenu à partir de la pente de la droite de régression du graphe de $\ln N$ en fonction du temps.

Le pourcentage de réduction du taux de croissance moyen pour chaque concentration de la substance d'essai par rapport à la valeur témoin est porté sur un graphique en fonction du logarithme de la concentration. On peut lire les valeurs de la CE_{50} sur la courbe obtenue. Pour désigner sans ambiguïté la CE_{50} obtenue par cette méthode, il est proposé d'utiliser le symbole $CE_{r,50}$. On doit indiquer les instants de mesures, par exemple si la valeur est relative à des observations faites à 24 et à 48 heures, le symbole devient $CE_{r,50}$ (24-48 h).

Note: Le taux de croissance est une fonction logarithmique, et de petites modifications de ce taux de croissance peuvent conduire à des modifications importantes de la biomasse. Les valeurs de la CE_b et de la CE_r ne sont donc pas numériquement comparables.

3. RAPPORT

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

- substance d'essai: données relatives à l'identification chimique,
- organismes d'essai: origine, culture de laboratoire, numéro de souche, méthode de culture,
- conditions d'essai:
 - date du début et de la fin de l'essai, ainsi que sa durée,
 - température,
 - composition du milieu,

- appareil permettant la culture,
- pH des solutions au début et à la fin de l'essai (si on observe des variations de pH supérieures à une unité, on doit fournir une explication),
- véhicule et méthode utilisés pour solubiliser la substance d'essai et concentration du véhicule dans les solutions d'essai,
- intensité et nature de la lumière,
- concentrations testées (mesurées ou nominales),
- résultats:
 - concentration cellulaire pour chaque flacon à chaque point de mesure et méthode utilisée pour mesurer la concentration cellulaire,
 - valeurs moyennes des concentrations cellulaires,
 - courbes de croissance,
 - représentation graphique de la relation concentration/effet,
 - valeurs de la CE et méthode de calcul,
 - CSEO,
 - autres effets observés.

4.

RÉFÉRENCES

- (1) OCDE, Paris, 1981, *Ligne directrice 201*, décision du Conseil C(81) 30 final.
- (2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, *Verfahrensvorschlag «Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge Scenedesmus subspicatus»*, in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

*Appendice***EXEMPLE DE MÉTHODE DE CULTURE DES ALGUES****Observations générales**

Afin d'obtenir des cultures d'algues sur lesquelles on peut réaliser des essais de toxicité, on se base sur le procédé suivant:

On doit utiliser des méthodes adéquates afin de s'assurer que les cultures d'algues ne sont pas infectées par des bactéries (ISO 4833). Il peut être souhaitable de disposer de cultures axéniques, mais il est essentiel d'avoir des cultures d'une seule espèce d'algue.

Toutes les opérations doivent être effectuées dans des conditions stériles afin d'éviter toute contamination par des bactéries et par d'autres algues.

Équipement et matériel

Voir au point 1.6.1: Préparations et organismes d'essai.

Méthodes permettant d'obtenir des cultures d'algues*Préparation des solutions nutritives (milieux)*

Tous les sels nutritifs du milieu sont préparés sous forme de solution mère concentrée et ils sont stockés à l'obscurité et au froid. Ces solutions sont stérilisées par filtration ou par passage à l'autoclave.

Le milieu est préparé en ajoutant la quantité correcte de solution mère à de l'eau distillée stérile, en prenant soin qu'il n'y ait pas de risque d'infection. Pour les milieux solides, on ajoute 0,8% d'agar.

Cultures souches

Les cultures souches sont de petites cultures d'algues qui sont régulièrement transférées dans un milieu frais afin de servir de matériel d'essai initial. Si ces cultures ne sont pas utilisées régulièrement, elles sontensemencées à la surface de tubes d'agar inclinés. Elles sont transférées dans un milieu frais au moins une fois tous les deux mois.

Les cultures de départ sont cultivées dans des récipients coniques contenant le milieu approprié (volume d'environ 100 ml). Quand les algues sont incubées à 20 °C avec un éclairage continu, un transfert hebdomadaire est nécessaire.

Au cours du transfert, une certaine quantité de «vienne» culture est transférée dans un flacon de milieu frais à l'aide de pipettes stériles, de telle façon que, pour les espèces à croissance rapide, la concentration initiale soit environ 100 fois inférieure à celle de la vieille culture.

Le taux de croissance d'une espèce peut être déterminé à partir de la courbe de croissance. Si celui-ci est connu, il est possible d'évaluer la densité à laquelle la culture doit être transférée dans un milieu frais. Ceci doit être fait avant que la culture n'atteigne la phase létale.

Préculture

La préculture est destinée à donner une quantité d'algues adéquate pour l'inoculation des cultures d'essai. La préculture est incubée dans les conditions de l'essai et elle est utilisée quand elle est encore en phase exponentielle de croissance, normalement après une période d'incubation d'environ trois jours. Quand les cultures d'algues contiennent des cellules déformées ou anormales, elles doivent être éliminées.

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

CL₅₀: 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),
- 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 (CaCO₃) 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 $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, sous éclairage 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.

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.

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),
- 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. **RÉFÉRENCES**

- (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, pages 99.
- (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 für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, *Verfahrensvorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden»*, in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

*Appendice***Élevage des vers avant les essais**

30 à 50 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 \pm 2 °C, de préférence sous éclairage 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, *Eisenia 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.

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.

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).

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 mmol/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_4Cl , P.A.: 38,40 g,

Dihydrogénophosphate de sodium, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 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.

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, à une température de 20 à 25 °C. 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.

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 diéthylène-glycol 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.

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.

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 à 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 $^{14}\text{CO}_2$ 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.

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:	diéthylèneglycol
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 3 déterminations.

Figure 1

Exemples de courbes de biodégradation

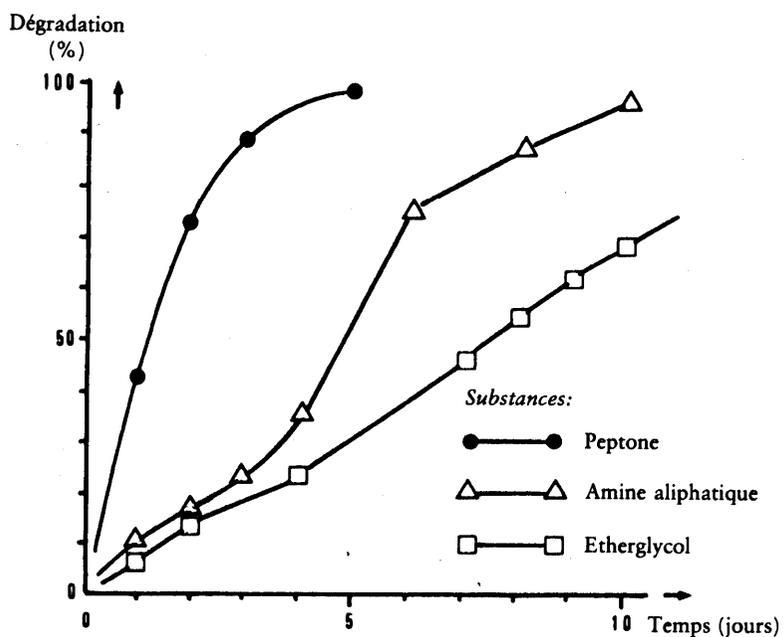
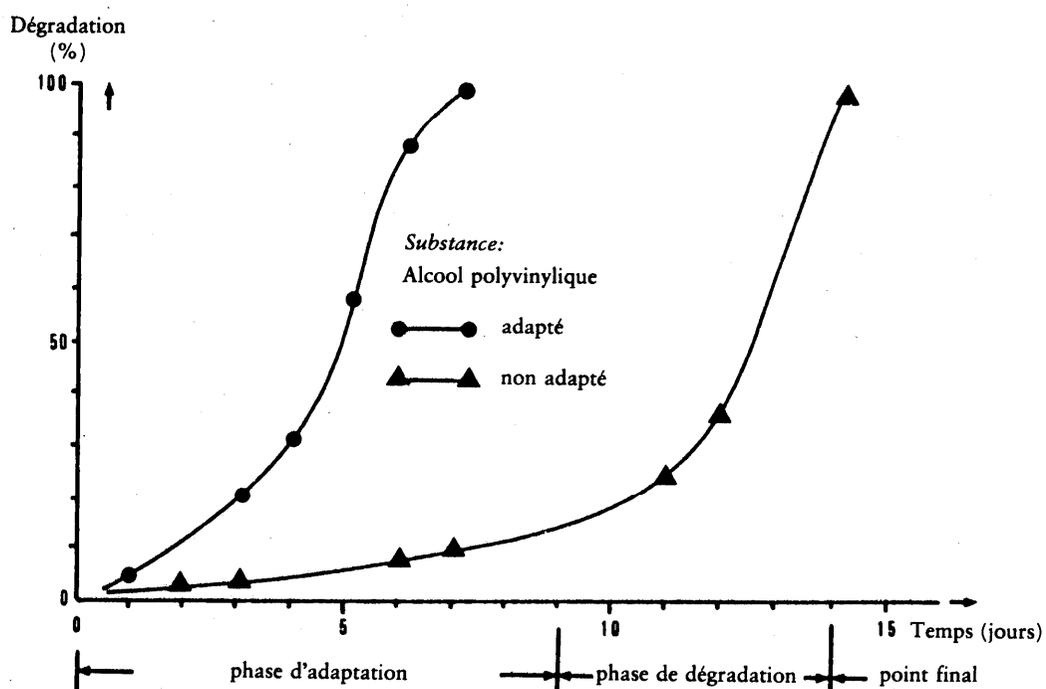


Figure 2

Exemples d'adaptation d'une boue



BIODÉGRADATION

ESSAIS DE SIMULATION DE BOUES ACTIVÉES

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

1.1.1. Remarques générales

Cette méthode n'est applicable qu'aux substances organiques qui, à la concentration d'essai:

- sont suffisamment solubles dans l'eau pour permettre la préparation des solutions d'essai,
- ont une pression de vapeur négligeable dans les conditions de l'essai,
- n'ont pas d'effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries.

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.

1.1.2. Détermination de la biodégradabilité totale (analyse COD/DCO)

Le but de la méthode est de déterminer la biodégradabilité totale en mesurant la disparition de la substance et de tout métabolite de la substance dans une maquette d'installation de traitement de boues activées à une concentration correspondant à > 12 mg de COD/L (ou approximativement 40 mg de DCO/l). 20 mg de COD/l semble un chiffre optimal (COD = carbone organique dissout, DCO = demande chimique en oxygène).

La teneur en carbone organique (ou la demande chimique en oxygène) de la substance d'essai doit être établie.

1.1.3. Détermination de la biodégradabilité primaire (analyse spécifique)

Le but de la méthode est de déterminer la biodégradabilité primaire d'une substance dans une maquette d'installation de traitement de boues activées à une concentration d'environ 20 mg/l, à l'aide d'une méthode d'analyse spécifique (une concentration plus faible ou plus élevée peut être utilisée si la méthode d'analyse et les limites de toxicité le permettent). Cela permet d'évaluer la biodégradabilité primaire de la substance (disparition de la structure chimique initiale).

Le but de cette méthode n'est pas de déterminer le degré de minéralisation de la substance d'essai.

Une méthode adéquate d'analyse doit être disponible pour la détermination de la substance d'essai.

1.2. Définitions et unités

1.2.1. Analyse COD/DCO

Le taux de dégradation de la substance est donné par la formule

$$TD = \frac{T - (E - E_0)}{T} \times 100\% \quad [1 (a)]$$

où:

TD = taux de dégradation en pourcentage de COD (ou de DCO) pendant le temps de rétention moyen donné de la substance d'essai,

T = concentration de la substance d'essai dans le milieu entrant dans l'unité d'essai en mg de COD/l (ou mg de DCO/l),

E = concentration de COD (ou DCO) dans le milieu sortant de l'unité d'essai en mg de COD/l (ou de DCO/l),

E₀ = concentration de COD (ou DCO) dans le milieu sortant de l'unité témoin en mg de COD/l (ou DCO/l).

La dégradation est exprimée en pourcentage de disparition du COD (ou de la DCO) pendant le temps de rétention donné de la substance d'essai.

1.2.2. Analyse spécifique

Le pourcentage d'élimination de la substance d'essai de la phase aqueuse (R_w) pendant le temps de rétention moyen donné s'obtient à l'aide de la formule

$$R_w = \frac{C_i - C_o}{C_i} \times 100\% \quad [1 (b)]$$

où:

C_i = concentration de la substance dans le milieu entrant dans l'unité d'essai (mg de substance/l, déterminée par l'analyse spécifique),

C_o = concentration de la substance dans le milieu sortant de l'unité d'essai (mg de substance/l, déterminée par l'analyse spécifique).

1.3. Substances de référence

Quand on étudie une nouvelle substance, des produits de référence peuvent parfois se révéler utiles; on ne peut cependant pas encore recommander de produits de référence particuliers.

1.4. Principe des méthodes d'essai

Pour la détermination de la biodégradabilité totale, deux unités pilotes de traitement de boues activées sont utilisées en parallèle [unités d'essai de confirmation de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) ou vases poreux]. Dans l'une des unités, la substance d'essai est ajoutée au milieu entrant (eaux résiduelles synthétiques ou domestiques), tandis que l'autre est uniquement alimenté avec le milieu. Pour la détermination de la biodégradabilité primaire avec analyse spécifique dans les milieux d'entrées et de sortie, seule une unité est utilisée.

On mesure les concentrations de COD (ou la DCO) dans les effluents ou bien on détermine les concentrations de la substance par analyse spécifique.

Le COD dû à la substance d'essai n'est pas mesuré, mais simplement mentionné.

Lorsque l'on mesure le COD (ou la DCO), la différence de concentration moyenne entre l'effluent d'essai et l'effluent témoin est censée être due à la substance d'essai non dégradée.

Lorsque l'on effectue des analyses spécifiques, la modification de la concentration de la molécule mère peut être mesurée (biodégradation primaire).

Les unités peuvent fonctionner en «couplage», selon un procédé de transinoculation.

1.5. Critères de qualité

La concentration initiale de la substance dépend du type d'analyse effectué et de ses limites.

1.6. Description de la méthode d'essai**1.6.1. Préparation****1.6.1.1. Appareillage**

Deux unités de même type sont nécessaires, sauf pour les analyses spécifiques. Deux types de dispositif peuvent être utilisés:

Essai de confirmation de l'OCDE:

L'équipement (appendice 1) se compose d'un récipient (A) pour stocker les eaux résiduelles synthétiques, d'une pompe doseuse (B), d'une cuve d'aération (C), d'un décanteur (D), d'une pompe à air comprimé (E) pour recycler la boue activée et d'un récipient (F) pour recueillir l'effluent traité.

Les récipients (A) et (F) doivent être en verre ou en matière plastique appropriée et contenir au moins 24 litres. La pompe (B) doit assurer une alimentation régulière de la cuve d'aération en effluent synthétique; tout système approprié peut être utilisé, à condition que le débit d'entrée et la concentration soient assurés.

En fonctionnement normal, le décanteur (D) est fixé à une hauteur telle que la cuve d'aération contienne 3 litres de liqueur mixte. Un aérateur fritté (G) est suspendu dans la cuve (C) au-dessus du cône. La quantité d'air insufflée par le dispositif d'aération doit être contrôlée par un débitmètre. La pompe à air comprimé (E) est réglée de façon que la boue activée provenant du décanteur soit continuellement et régulièrement recyclée dans la cuve d'aération (C).

«Vase poreux»:

Le vase poreux est réalisé à partir de feuilles de polyéthylène poreux (2 mm d'épaisseur, taille maximale des pores: 95 μ) formant des cylindres de 14 cm de diamètre à base conique de 45° (figures 1 et 2 de l'appendice 27). Le vase poreux se trouve dans une cuve étanche en matière plastique appropriée de 15 cm de diamètre, pourvue dans la partie cylindrique, à la hauteur de 17,2 cm, d'un orifice qui détermine la capacité du vase (3 l). Un anneau de support rigide réalisé en matière plastique appropriée entoure le sommet du vase, de sorte qu'il y a un espace de 0,5 cm entre le vase et la cuve.

Les vases poreux peuvent être montés à la base d'un bain-marie thermostaté. À la base du vase est prévue une alimentation en air sur laquelle sont placés des diffuseurs.

Les récipients (A) et (E) doivent être en verre ou en matière plastique appropriée et avoir une capacité d'au moins 24 litres. La pompe (B) doit assurer une alimentation régulière de la cuve d'aération en effluent synthétique; tout système approprié peut être utilisé, à condition que le débit d'entrée et la concentration soient assurés.

Des vases poreux de rechange doivent être disponibles pour remplacer ceux qui pourraient se boucher à l'usage; les vases bouchés sont nettoyés par immersion pendant 24 heures dans une solution d'hypochlorite suivie d'un rinçage à l'eau du robinet.

1.6.1.2. Filtration

Appareil de filtration sur membranes filtrantes avec des pores de 0,45 μ m. 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.

1.6.1.3. Eaux résiduaires

On peut utiliser soit des effluents synthétiques appropriés, soit des eaux résiduaires domestiques.

Exemple d'effluent synthétique:

Dissoudre par litre d'eau du robinet:

Peptone:	160 mg,
Extrait de viande:	110 mg,
Urée:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
CaCl ₂ .2H ₂ O:	4 mg,
MgSO ₄ .7H ₂ O:	2 mg,
K ₂ HPO ₄ :	28 mg.

Eaux résiduaires domestiques:

Les eaux résiduaires domestiques doivent être recueillies chaque jour au niveau du trop-plein de la cuve de décantation primaire d'une installation de traitement d'eaux résiduaires essentiellement domestiques.

1.6.1.4. Solution de réserve de la substance d'essai

Une solution de la substance d'essai, par exemple à 1 %, doit être préparée pour être introduite dans l'unité d'essai. La concentration de la substance doit être déterminée de façon que soit connu le volume approprié à ajouter aux eaux résiduaires ou directement à l'unité par le moyen d'une pompe secondaire afin d'obtenir la concentration d'essai requise.

1.6.1.5. Inoculum

Remarque: Avec des eaux résiduaires domestiques, il serait superflu d'utiliser un inoculum à faible concentration bactérienne, mais on peut utiliser des boues activées.

On peut utiliser plusieurs types d'inoculum. Nous donnons ici trois exemples d'inoculum appropriés:

a) Inoculum à base d'effluent secondaire:

L'inoculum doit être obtenu à partir d'un effluent secondaire de bonne qualité, provenant d'une installation de traitement d'eaux résiduaires essentiellement domestiques. Cet effluent doit être aéré depuis le prélèvement jusqu'à l'utilisation. Il est filtré sur un filtre grossier, les 200 premiers millilitres étant éliminés. Le filtrat, convenablement aéré, doit être utilisé le jour même. Il faut utiliser au moins 3 ml pour l'inoculation.

b) Inoculum composite:

Inoculum à base d'effluent secondaire:

Voir description ci-dessus.

Inoculum à base de terre:

100 g de terre de jardin (fertile, non stérile) sont mis en suspension dans 1 000 ml d'eau potable exempt de chlore (les terres à très forte teneur en argile, sable ou humus ne peuvent être utilisées). Après agitation, il y a lieu de laisser reposer la suspension durant 30 minutes. Le surnageant est alors filtré sur un papier filtre grossier, les 200 premiers millilitres étant éliminés. Le filtrat est aéré immédiatement, et cela jusqu'à son utilisation. Il doit être utilisé le jour même.

Inoculum à base d'eau de surface:

Un échantillon d'eau de surface mésosaprobe est filtré sur un papier filtre grossier, les 200 premiers millilitres étant éliminés. Le filtrat, convenablement aéré jusqu'à son utilisation, doit être utilisé le jour même.

Pour obtenir l'inoculum final, on mélange avec soin des volumes égaux de ces trois types d'échantillons d'inoculum. Il faut utiliser au moins 3 ml pour l'inoculation.

c) Inoculum à base de boue activée:

On peut utiliser comme inoculum un volume (ne dépassant pas 3 l) de boue activée (dont la teneur en solides en suspension peut atteindre jusqu'à 2,5 g/l), prélevé dans le bassin d'aération d'une installation de traitement d'eaux résiduaires essentiellement domestiques.

1.6.2. *Mode opératoire*

L'essai est effectué à la température ambiante; celle-ci doit être maintenue entre 18 °C et 25 °C.

L'essai peut être effectué s'il y a lieu à une température inférieure (qui peut descendre jusqu'à 10 °C): si la substance est dégradée, on peut s'en tenir là. Si toutefois la substance n'est pas dégradée, l'essai doit être effectué à une température constante située entre 18 °C et 25 °C.

1.6.2.1. *Période initiale: formation des boues/stabilisation des unités*

La période de formation des boues/stabilisation est la période pendant laquelle la concentration des solides en suspension dans les boues activées et les performances des unités augmentent jusqu'à atteindre un état stationnaire dans les conditions de fonctionnement utilisées.

La période initiale est la période qui s'écoule entre la première addition de substance d'essai et le moment où la dégradation atteint un plateau (valeur relativement constante). Cette période ne doit pas dépasser 6 semaines.

La période d'évaluation est une période de 3 semaines à compter du moment où la dégradation de la substance d'essai atteint une valeur relativement constante, habituellement élevée. Pour les substances qui ne se dégradent pas ou se dégradent peu au cours des 6 premières semaines, on prend comme période d'évaluation les 3 semaines suivantes.

Tout d'abord, remplir les unités nécessaires pour un essai avec l'inoculum mélangé au liquide entrant.

Mettre ensuite en marche le dispositif d'admission d'air [et la pompe à air comprimé (E) dans le cas des unités d'essai de confirmation de l'OCDE], ainsi que le doseur (B).

Le liquide entrant ne contenant pas la substance d'essai doit traverser la cuve d'aération à un débit horaire de 1 l ou de 1/2 l, ce qui donne un temps moyen de rétention de 3 ou 6 heures.

Il faut régler le débit d'air de façon que le contenu de la cuve (C) reste constamment en suspension et que le taux d'oxygène dissout soit au minimum de 2 mg/l.

La formation de mousse doit être empêchée par des moyens appropriés. On n'utilisera cependant pas d'agents antimousse ayant une action inhibitrice sur la boue activée.

La boue qui s'est accumulée au sommet de la cuve d'aération (C) [et, dans le cas des unités d'essai de confirmation de l'OCDE, au fond du décanteur (D) et dans le circuit] doit être renvoyée dans la liqueur mixte au moins une fois par jour par brossage ou par tout autre moyen approprié.

Quand la boue ne décante pas, on peut en augmenter la densité par addition, répétée si nécessaire, de fractions de 2 ml d'une solution à 5% de chlorure ferrique.

L'effluent est recueilli dans le récipient (E ou F) pendant 20 à 24 heures et on prélève un échantillon après avoir procédé à l'homogénéisation du mélange. Le récipient (E ou F) doit être nettoyé soigneusement.

Pour vérifier l'efficacité du procédé, on mesure au moins deux fois par semaine la demande chimique en oxygène (DCO) ou le carbone organique dissout (COD) du filtrat de l'effluent collecté, ainsi que du liquide entrant filtré [à l'aide d'une membrane dont les pores ont 0,45 µm de diamètre, les 20 premiers millilitres (environ) du filtrat étant éliminés].

La diminution de la DCO ou du COD doit se stabiliser lorsque la dégradation journalière est à peu près régulière.

La teneur en matières sèches de la boue activée contenue dans la cuve d'aération doit être déterminée deux fois par semaine (en g/l). On peut faire fonctionner les installations de deux manières: ou bien la teneur en matières sèches de la boue activée est déterminée deux fois par semaine et si elle est supérieure à 2,5 g/l, il faut éliminer l'excès de boue activée; ou bien on enlève 500 ml de liqueur mixte de chaque vase tous les jours pour obtenir un temps moyen de rétention de la boue de six jours.

Quand les paramètres mesurés et estimés [efficacité du procédé (disparition de la DCO ou du COD), concentration de la boue, sédimentabilité de la boue, turbidité des effluents, etc.] des deux unités sont suffisamment stables, la substance d'essai peut être introduite dans le liquide entrant dans l'une des unités suivant 1.6.2.2.

Une autre solution consiste à ajouter la substance d'essai au début de la période de formation de la boue (1.6.2.1.), notamment lorsque la boue est ajoutée comme inoculum.

1.6.2.2. Essai

Les conditions de fonctionnement de la période initiale sont maintenues et une quantité suffisante de solution de réserve de la substance d'essai (à environ 1 %) est ajoutée au liquide entrant dans l'unité d'essai, de façon à obtenir la concentration désirée de la substance d'essai (approximativement 10 ou 20 mg de COD/l ou 40 mg de DOC/l) dans les eaux résiduaires. Pour ce faire, on peut soit mélanger quotidiennement la solution de réserve aux eaux résiduaires, soit utiliser un système de pompage séparé. Cette concentration peut être atteinte progressivement. Si la substance d'essai n'a pas d'effets toxiques sur la boue activée, des concentrations plus fortes peuvent être essayées.

Dans l'unité témoin ne sont injectées que les eaux résiduaires. Des volumes adéquats des effluents sont prélevés pour analyse et filtrés sur membrane (0,45 µm), les 20 premiers millilitres (environ) du filtrat étant éliminés.

Les échantillons filtrés doivent être analysés le jour même; sinon, ils doivent être conservés d'une manière adéquate, par exemple à l'aide de 0,05 ml d'une solution de chlorure mercurique à 1 % (HgCl₂) pour 10 ml de filtrat ou par stockage à 2 à 4 °C pendant 24 heures ou à moins de -18 °C pendant plus longtemps.

La période initiale, qui comprend l'addition de la substance d'essai, ne doit pas dépasser 6 semaines et la période d'évaluation ne doit pas être inférieure à 3 semaines, c'est-à-dire qu'environ 14 à 20 déterminations doivent être pratiquées pour le calcul du résultat final.

Couplage des unités:

On réalise le couplage des unités en interchangeant une fois par jour 1,5 l de liqueur mixte (y compris la boue) provenant des cuves d'aération des boues activées entre les deux unités. Dans le cas de substances d'essai très absorbantes, on prélève seulement un volume de 1,5 l de surnageant dans les cuves de décantation pour le verser dans le récipient de boue activée de l'autre unité.

1.6.2.3. Analyse

Deux types d'analyses peuvent être effectuées en vue de suivre le comportement de la substance:

COD et DCO:

Les concentrations de COD sont déterminées en double avec l'analyseur de carbone et/ou les valeurs de la DCO sont déterminées conformément à la référence (2).

Analyse spécifique:

Les concentrations de la substance d'essai sont déterminées par une méthode d'analyse appropriée. On doit si possible procéder à une détermination spécifique de la substance absorbée sur la boue.

2. DONNÉES ET ÉVALUATION

2.1. Couplage d'unités

Dans le cas du «couplage des unités», les pourcentages quotidiens de dégradation TD sont calculés conformément à 1.2.1.

Ces taux journaliers de dégradation TD sont, en raison du transfert de matière dû au procédé de transinoculation, corrigés en TDc à l'aide de l'équation (2) pour un temps moyen de rétention de 3 heures ou à l'aide de l'équation (3) pour un temps moyen de rétention de 6 heures.

$$TD_c = \frac{8}{7} TD - \frac{100}{7} \quad (2)$$

$$TD_c = \frac{4}{3} TD - \frac{100}{3} \quad (3)$$

On calcule la moyenne de la série des valeurs de TD_c et, en plus, l'écart type selon d'équation (4).

$$S_{TD_c} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{TD_c} - TD_{c_i})^2}{n-1}} \quad (4)$$

où:

S_{TD_c} = écart type de la série des valeurs de TD_c ,

$\overline{TD_c}$ = moyenne des valeurs de TD_c ,

n = nombre de déterminations.

On élimine les valeurs extrêmes de la série des TD_c conformément à une méthode de statistique appropriée, par exemple celle de Nalimov (-6), au niveau de probabilité de 95 % et on recalcule la moyenne et l'écart type de la série des données TD_c moins ces valeurs extrêmes.

Le résultat final est donné par l'équation (5):

$$TD_c = \overline{TD_c} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{TD_c} \quad (5)$$

où:

$t_{n-1;\alpha}$ = valeur du tableau de t pour n paires de valeurs de E et E_0 et le niveau de confiance statistique P ($P = 1 - \alpha$), où P est fixé à 95 % (1).

Le résultat est exprimé par la moyenne avec les limites de tolérance au niveau de probabilité de 95 %, l'écart type et le nombre de données de la série des TD_c , moins les valeurs extrêmes, par exemple:

$TD_c = 98,6 \pm 2,3\%$ de disparition de COD,

$s = 4,65\%$ de disparition de COD,

$n = 18$,

x = nombre de valeurs extrêmes.

2.2. Unités non couplées

La performance des unités peut être vérifiée comme suit:

$$\text{Pourcentage de disparition de DCO ou de COD} = \frac{\text{DCO ou COD des eaux résiduares} - \text{DCO ou COD de l'effluent}}{\text{DCO ou COD des eaux résiduares}} \times 100$$

Cette dégradation quotidienne peut être portée sur un graphique montrant par exemple les tendances à l'acclimatation.

2.2.1. Détermination de la DCO/du COD

On calcule le taux quotidien de dégradation TD conformément à 1.2.1.

On calcule la moyenne de la série des valeurs TD et, en plus, son écart type conformément à la formule suivante:

$$S_{TD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{TD} - TD_i)^2}{n-1}} \quad (6)$$

où:

S_{TD} = écart type de la série des valeurs TD_i ,

\overline{TD} = moyenne des valeurs TD_i ,

n = nombre de déterminations.

On élimine les valeurs extrêmes de la série des TD conformément à une méthode de statistique appropriée, par exemple celle de Nalimov (6), au niveau de probabilité de 95 % et on recalcule la moyenne et l'écart type de la série des données TD, moins les valeurs extrêmes.

Le résultat final est donné par l'équation (7):

$$TD = \overline{TD} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{TD} \quad (7)$$

où:

$t_{n-1;\alpha}$ = valeur du tableau de t pour n paires de valeurs de E et de E_0 et le niveau de confiance statistique P ($P = 1 - \alpha$), où α est fixé à 95 % (1).

Le résultat est exprimé par la moyenne avec les limites de tolérance au niveau de probabilité de 95 %, l'écart type et le nombre de données de la série des TD moins les valeurs extrêmes, par exemple:

TD = (98,6 ± 2,3%) de disparition de COD,

s = 4,65 % de disparition de COD,

n = 18,

x = nombre de valeurs extrêmes.

2.2.2. Analyse spécifique

On calcule le pourcentage d'élimination de la substance d'essai et de la phase aqueuse (R_w) conformément à 1.2.2.

3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible:

- le formulaire donné à l'annexe III, indiquant les conditions de fonctionnement de l'essai,
- l'appareillage choisi (essai de confirmation de l'OCDE ou vase poreux),
- le mode de fonctionnement choisi: unités couplées ou non,
- les eaux résiduaires: synthétiques ou domestiques. Dans le cas d'eaux résiduaires domestiques: date et lieu de prélèvement de l'échantillon,
- l'inoculum, avec date et lieu de prélèvement de l'échantillon,
- une description de la méthode d'analyse si des analyses spécifiques ont été effectuées,
- le diagramme de la disparition de la DCO ou du COD en fonction du temps pendant la période initiale et la période d'évaluation,
- une mesure analytique de la substance d'essai sous la forme de DCO ou de COD dans la solution de réserve,
- si des analyses spécifiques ont été effectuées, le diagramme du pourcentage d'élimination de la substance d'essai de la phase aqueuse en fonction du temps (période initiale et période d'évaluation),
- la disparition moyenne du COD ou de la DCO de la substance d'essai et l'écart type sont calculés à partir des résultats de la période d'évaluation, c'est-à-dire lorsqu'il y a disparition régulière de la substance d'essai ou qu'on se trouve en période de fonctionnement stationnaire,
- un diagramme de la concentration des boues activées en fonction du temps,
- toute remarque concernant les boues activées (rejet d'un excès de boues, présence d'un agglomérat, $FeCl_3$, etc.),
- la concentration de la substance utilisée pour l'essai,
- tous les résultats concernant l'analyse faite sur la boue,
- toutes informations et tous résultats expérimentaux concernant la substance d'essai et, les cas échéant, la substance de référence,
- les raisons scientifiques de toutes modifications de mode opératoire.

3.2. Interprétation des résultats

Une faible élimination de la substance d'essai de la phase aqueuse peut être due à une inhibition des micro-organismes par la substance d'essai. Celle-ci peut également être révélée par une lyse et une perte de boue, donnant un surnageant turbide, et par une diminution de l'efficacité de l'installation pilote au point de vue de l'élimination de la DCO (ou du COD).

L'adsorption physico-chimique peut parfois jouer un rôle. Des différences entre l'action biologique sur la molécule et l'adsorption physico-chimique peuvent être révélées par une analyse effectuée sur la boue après une désorption adéquate.

Des essais complémentaires sont nécessaires si l'on veut faire une distinction entre biodégradation (ou biodégradation partielle) et adsorption.

On peut y procéder de différentes façons, mais la plus convaincante consiste à utiliser le surnageant comme inoculum dans un essai du niveau de base de préférence (essai respirométrique).

Les fortes pertes de COD et de DCO éventuellement observées sont dues à la biodégradation, tandis que pour de faibles pertes, on ne peut distinguer la biodégradation de l'élimination. Par exemple, si un composé soluble présente une constante d'adsorption de 98 % et si le taux d'enlèvement de boues excédentaires est de 10 % par jour, une élimination atteignant jusqu'à 40 % est possible; pour un taux d'enlèvement de boues excédentaires de 30 %, l'élimination due à l'adsorption et à l'enlèvement de boues excédentaires peut atteindre jusqu'à 65 % (4).

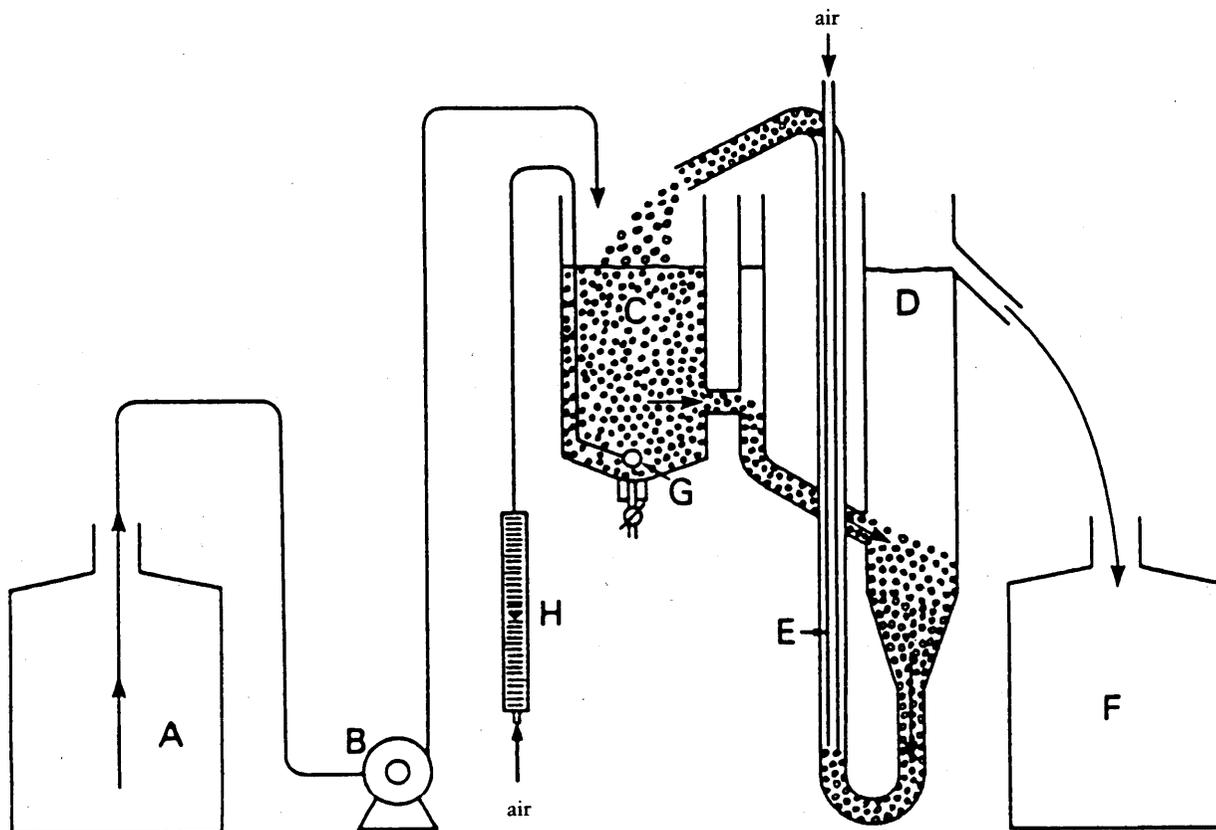
Dans le cas d'une analyse spécifique, il convient d'accorder une grande attention à la relation entre la structure de la substance et l'analyse spécifique effectuée. Dans ce cas, le phénomène observé ne peut être interprété comme une minéralisation de la substance.

4. RÉFÉRENCES

- (1) OCDE, Paris, 1981, *Ligne directrice 303 A*, décision du Conseil C(81) 30 final.
- (2) Annexe V, C. 9. «Essai de dégradation — demande chimique en oxygène», de la directive 84/449/CCE, *Journal officiel des Communautés européennes* n° L 251 du 19 septembre 1984.
- (3) Painter, H. A., King, E. F., *WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability*, Technical Report TR70, June 1978, Water Research Center, United Kingdom.
- (4) Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No 2, June 1981, p. 161 à 171.
- (5) Directives 82/242/CEE et 82/423/CEE du Conseil *Journal officiel des Communautés européennes* n° L 109 du 22 avril 1982, modifiant les directives 73/404/CEE et 73/405/CEE du Conseil sur la biodégradabilité des détergents *Journal officiel des Communautés européennes* n° L 347 du 17 décembre 1973.
- (6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980), p. 406 à 409.

Appendice 1

Figure 1



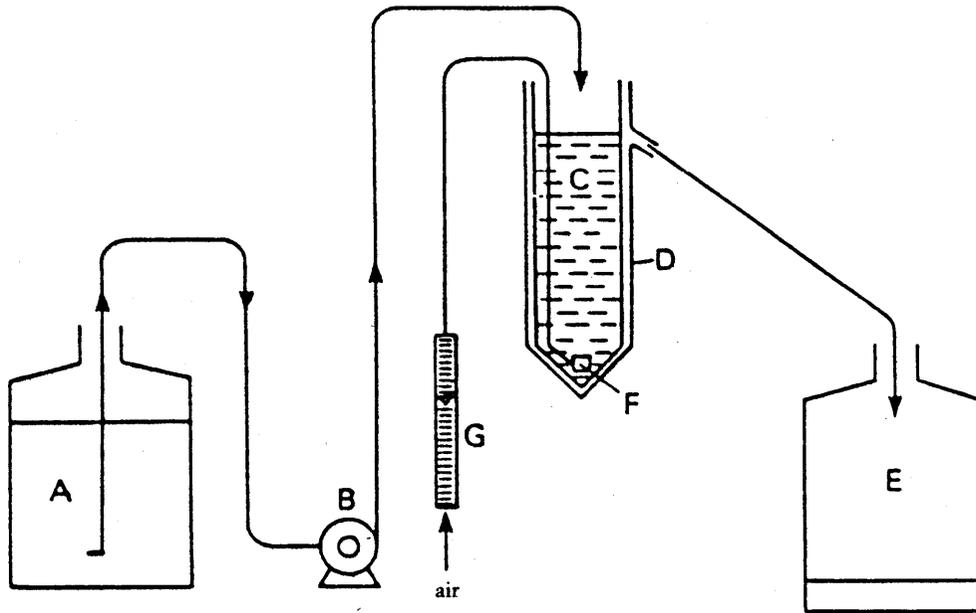
Légende: A: récipient de stockage;
B: pompe doseuse;
C: cuve d'aération (capacité: 3 l);

E: pompe à air comprimé;
F: récipient collecteur;
G: aérateur;
H: débitmètre à air (option)

Appendice 2

Figure 1

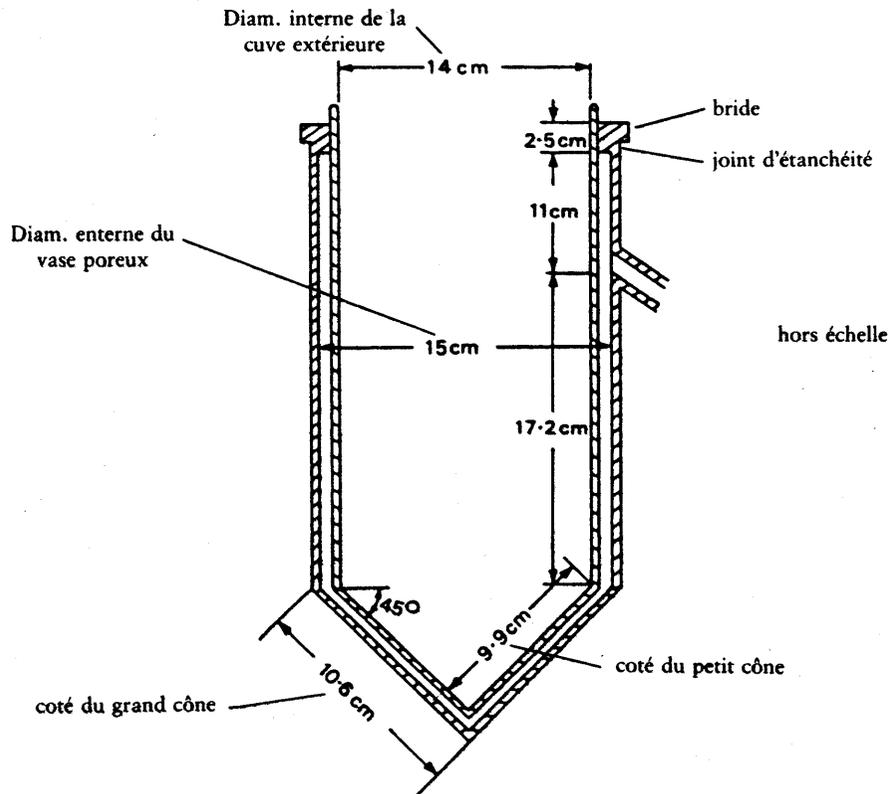
Équipement utilisé pour évaluer la biodégradabilité



- Légende: A: récipient de stockage;
 B: pompe doseuse;
 C: vase d'aération poreux;
 D: cuve étanche;
 E: collecteur de l'effluent;
 F: aérateur à diffuseur;
 G: rotamètre (option)

Figure 2

Détail du vase d'aération poreux de 3 litres



Appendice 3

Conditions de l'essai de simulation des boues activées

Vérifier dans chaque groupe

*Appareillage*Confirmation OCDE
Vase poreux

*Mode de fonctionnement*Unité simple
Unités couplées
Unités non couplées

*Transinoculation*Néant
Boues activées
Surnageant

*Temps moyen de rétention*3 heures
6 heures

*Élément nutritif de base*Eaux résiduaires domestiques
Eaux résiduaires synthétiques

*Inoculum*Effluent secondaire
Composite
Boue activée

*Addition de la substance d'essai*Dès le début
Augmentation progressive
Après formation de la boue

*Analyse*Spécifique
DCO
COD

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 O_2 par milligramme de boue, par heure.

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:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{R_{c1} + R_{c2}}\right) \times 100 = \text{pourcentage d'inhibition}$$

où:

R_s = taux de consommation de l'oxygène à une concentration donnée en substance étudiée,

R_{c1} = taux de consommation d'oxygène du témoin C_1 ,

R_{c2} = 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.

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,
- 11 g d'extrait de viande,
- 3 g d'urée,
- 0,7 g de NaCl,
- 0,4 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,
- 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,
- 2,8 g de K_2HPO_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.

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 $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. 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 50 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 à 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-dichlorophénol (au moins 3 concentrations)
Témoins:	Échantillon inoculé, sans substance d'essai
Température:	$20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

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 bechers 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 gradué 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 C₁).

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 (C₂).

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 $\text{mg O}_2/\text{l.h}$ pour les concentrations comprises approximativement entre 6,5 mg de O_2/l et 2,5 mg de O_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.

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_{80} ,
 - 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.

RÉFÉRENCES

- (1) Normes internationales 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 Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method* n° 103, décrite aussi par :
 - (5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, p. 80.
 - (6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, p. 247.
 - (7) OCDE, Paris, 1981, *Ligne directrice 209*, décision du Conseil C(81) 30 final.
-

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 °C. 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 $C_{\text{total}} - C_{\text{minéral}}$.

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.

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 biologique peut être exprimée en:

- 1) pourcentage d'élimination de D_{da} de l'apport journalier de la substance:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

où:

D_{da} = dégradation/apport journalier;

- 2) pourcentage d'élimination des substances présentes en début de journée:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2(a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2(b)]$$

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.

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.

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 journalièrement 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 ml 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.

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 journalièrement 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, à 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.

3.2. Interprétation des résultats

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 $^{14}\text{CO}_2$ 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 le résultat obtenu dans le milieu de l'essai témoin.

4. RÉFÉRENCES

- (1) OCDE, Paris, *Lignes directrices 302 A*, décision du Conseil C(81) 30 final.

Appendice 1

Test S.C.A.S.: exemple de résultats

Substance	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Pourcentage biodegradation D_{da}	Durée de l'essai (jours)
4-acétyl aminobenzène sulphonate	17,2	2,0	85	40
Tétra 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

Appendice 2

Exemple d'appareil d'essai

