

II

(Actes non législatifs)

RÈGLEMENTS

RÈGLEMENT (UE) N° 260/2014 DE LA COMMISSION

du 24 janvier 2014

modifiant, aux fins de son adaptation au progrès technique, le règlement (CE) n° 440/2008 établissant des méthodes d'essai conformément au règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH)

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

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne,

vu le règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission⁽¹⁾, et notamment son article 13, paragraphe 3,

considérant ce qui suit:

- (1) Le règlement (CE) n° 440/2008 de la Commission⁽²⁾ définit les méthodes d'essai à appliquer pour déterminer les propriétés physicochimiques ainsi que la toxicité et l'écotoxicité des substances, aux fins du règlement (CE) n° 1907/2006.
- (2) Il est nécessaire de mettre à jour le règlement (CE) n° 440/2008 pour y inclure en priorité les méthodes d'essai alternatives nouvelles et actualisées qui ont été adoptées récemment par l'OCDE afin de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales, conformément à la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à

la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques⁽³⁾ et à la directive 86/609/CEE du Conseil du 24 novembre 1986 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques⁽⁴⁾.

- (3) L'adaptation consiste en deux méthodes de détermination des propriétés physicochimiques, notamment une mise à jour de la méthode de détermination de la solubilité dans l'eau et une nouvelle méthode d'essai du coefficient de partage applicable à l'évaluation de la persistance, de la bioaccumulation et de la toxicité (PBT); quatre nouvelles méthodes et une méthode mise à jour pour la détermination de l'écotoxicité ainsi que du devenir et du comportement dans l'environnement; neuf méthodes de détermination de la toxicité et des autres effets sur la santé, dont quatre méthodes d'essai portant sur la toxicité par inhalation, à savoir trois méthodes mises à jour et une nouvelle méthode destinées à réduire le nombre d'animaux utilisés et à améliorer l'évaluation des effets, une mise à jour de la méthode d'essai concernant la toxicité orale à doses répétées sur 28 jours visant à inclure des paramètres d'évaluation de l'activité endocrine, une mise à jour de la méthode d'essai toxicocinétique applicable à la conception et à la compréhension des études toxicologiques et une mise à jour des méthodes portant sur la toxicité chronique, la cancérogénicité et l'évaluation combinée de la toxicité chronique et de la cancérogénicité.
- (4) Il convient dès lors de modifier le règlement (CE) n° 440/2008 en conséquence.
- (5) Les mesures prévues par le présent règlement sont conformes à l'avis du comité institué par l'article 133 du règlement (CE) n° 1907/2006,

⁽¹⁾ JO L 396 du 30.12.2006, p. 1.⁽²⁾ JO L 142 du 31.5.2008, p. 1.⁽³⁾ JO L 276 du 20.10.2010, p. 33.⁽⁴⁾ JO L 358 du 18.12.1986, p. 1.

A ADOPTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

L'annexe du règlement (CE) n° 440/2008 est modifiée conformément à l'annexe du présent règlement.

Article 2

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

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 24 janvier 2014.

Par la Commission
Le président
José Manuel BARROSO

ANNEXE

L'annexe du règlement (CE) n° 440/2008 est modifiée comme suit:

- 1) le chapitre A.6 est remplacé par le texte suivant:

«A.6. SOLUBILITÉ DANS L'EAU

INTRODUCTION

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

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

2. La présence d'impuretés peut considérablement modifier la solubilité d'une substance dans l'eau. La présente méthode d'essai porte sur la mesure de la solubilité de substances essentiellement pures, stables dans l'eau et non volatiles. Avant de déterminer la solubilité dans l'eau, il est utile de disposer d'informations sur la substance telles que la formule développée, la pression de vapeur, la constante de dissociation et l'hydrolyse en fonction du pH.
3. Les deux méthodes décrites dans cette méthode d'essai, la méthode par élution sur colonne et la méthode du flacon, couvrent respectivement les solubilités inférieures et supérieures à 10^{-2} g/l. Un essai préliminaire simple est également décrit. Il permet de déterminer approximativement la quantité de substance à utiliser dans l'essai proprement dit, ainsi que le temps nécessaire pour atteindre la saturation.

DÉFINITIONS ET UNITÉS

4. La solubilité d'une substance dans l'eau est la concentration massique de saturation de cette substance dans l'eau à une température donnée.
5. La solubilité dans l'eau est exprimée en masse de soluté par volume de solution. L'unité SI est le kg/m^3 , mais on utilise également le g/l.

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

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

DESCRIPTION DES MÉTHODES

Conditions de l'essai

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

Essai préliminaire

8. Des volumes d'eau croissants sont ajoutés progressivement à environ 0,1 g d'échantillon (les solides doivent être pulvérisés), à température ambiante, dans un flacon gradué de 10 ml fermé par un bouchon en verre. Après chaque ajout d'eau, le mélange est agité pendant 10 minutes. On vérifie ensuite visuellement si l'échantillon est complètement dissous. Si des parties non dissoutes de l'échantillon subsistent après l'addition de 10 ml d'eau, l'essai se poursuit dans un flacon gradué de 100 ml. La solubilité approximative est indiquée dans le tableau 1, au-dessous du volume d'eau qui dissout complètement l'échantillon. Si la solubilité est faible, le temps requis pour dissoudre la substance peut être long et il faut attendre au moins 24 heures. Si après 24 heures la substance n'est toujours pas dissoute, il y a lieu d'attendre jusqu'à 96 heures ou de procéder à une dilution plus poussée, afin de déterminer s'il convient d'utiliser la méthode par élution sur colonne ou la méthode du flacon.

Tableau 1

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

Méthode par élution sur colonne

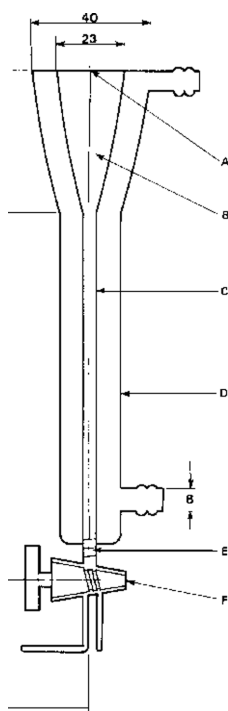
Principe

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

Appareillage

10. L'appareil se compose d'une microcolonne (figure 1) thermostatée, reliée soit à une pompe de recirculation (figure 2), soit à un réservoir de remise à niveau (figure 3). La microcolonne contient un support inerte maintenu en place par un petit tampon de laine de verre, qui sert aussi à filtrer les particules. Divers matériaux peuvent être employés comme support: billes de verre, terre de diatomées ou autres matériaux inertes.
11. La microcolonne représentée à la figure 1 convient au montage comportant une pompe de recirculation. Elle a un volume tampon correspondant à cinq fois le volume de son lit (les premiers cinq volumes de lit sont rejetés au début de l'expérience) et au volume de cinq échantillons (prélevés pour analyse pendant l'expérience). On peut cependant réduire le volume tampon à condition de pouvoir ajouter de l'eau au système pendant l'expérience pour remplacer les premiers cinq volumes de lit éliminés avec les impuretés. La colonne est reliée, par un tuyau en matériau inerte, à une pompe de recirculation capable de pomper environ 25 ml/h. La pompe de recirculation peut être, par exemple, une pompe péristaltique ou une pompe à membrane. Il faut veiller à ce que le matériau du tuyau n'occasionne aucune contamination et/ou adsorption.
12. Un montage comportant un réservoir de remise à niveau est schématisé à la figure 3. Dans ce montage, la microcolonne est munie d'un robinet d'arrêt à une voie. Elle est reliée au réservoir de remise à niveau par un tube en matériau inerte et un raccord en verre rodé. Le débit du réservoir de remise à niveau doit avoisiner 25 ml/h.

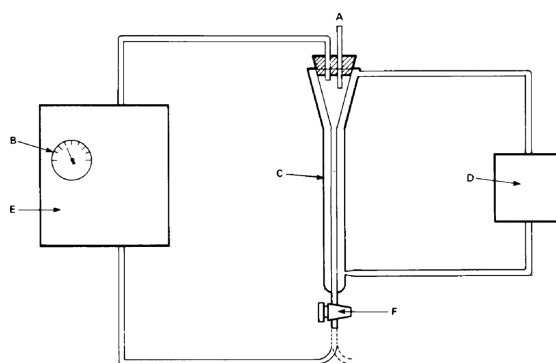
Figure 1



Dimensions en mm

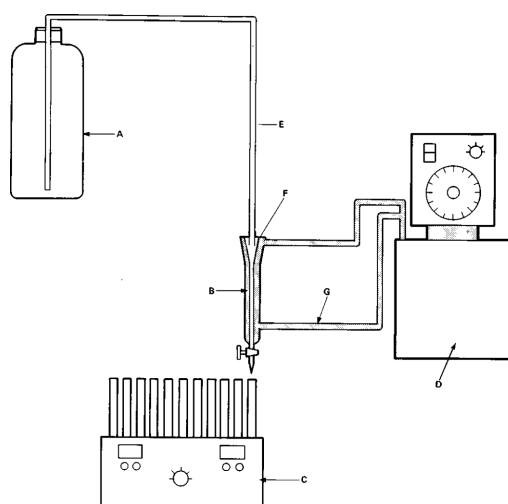
- A. Raccordement pour joint en verre rodé
- B. Volume tampon
- C. Diamètre intérieur 5
- D. Diamètre extérieur 19
- E. Tampon en laine de verre
- F. Robinet d'arrêt

Figure 2



- A. Équilibrage atmosphérique
- B. Débitmètre
- C. Microcolonne
- D. Pompe de circulation thermostatée
- E. Pompe de recirculation
- F. Robinet à deux voies pour l'échantillonnage

Figure 3



- A. Réservoir de remise à niveau (par exemple, un flacon de laboratoire de 2,5 litres)
- B. Colonne
- C. Collecteur de fractions
- D. Thermostat
- E. Tuyau en téflon
- F. Joint en verre rodé
- G. Conduite d'eau (entre le thermostat et la colonne, diamètre intérieur d'environ 8 millimètres)

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

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

Méthode avec une pompe de recirculation

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

Méthode avec réservoir de remise à niveau

16. Des fractions successives d'éluat sont recueillies et analysées suivant la méthode choisie. Les fractions du milieu de l'intervalle d'élution, là où la concentration demeure constante à $\pm 30\%$ près dans au moins cinq prélèvements consécutifs, servent à déterminer la solubilité.
17. L'eau bidistillée est le meilleur éluant. On peut aussi utiliser de l'eau désionisée, caractérisée par une résistivité supérieure à 10 mégohms/cm et une teneur totale en carbone organique inférieure à 0,01 %.
18. Pour chaque méthode, l'opération est répétée en réduisant le débit de moitié. Si les résultats des deux opérations concordent, l'essai est satisfaisant. Si l'on mesure une solubilité plus élevée avec le débit inférieur, il y a lieu de continuer à diminuer le débit de moitié jusqu'à ce que deux essais successifs donnent la même solubilité.
19. Pour chaque méthode, il faut vérifier la présence de matières colloïdales dans les fractions, par détection de l'effet Tyndall. La présence de particules fausse les résultats et l'essai doit être répété après avoir amélioré le pouvoir de filtration de la colonne.
20. Le pH de chaque échantillon doit être mesuré, de préférence au moyen de bandelettes indicatrices spéciales.

Méthode du flacon

Principe

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

Appareillage

22. Le matériel suivant est requis:

- verrerie et instruments courants de laboratoire,
- dispositif pour agiter les solutions à température constante,
- si nécessaire, une centrifugeuse (thermostatée de préférence) pour les émulsions,
- équipement d'analyse.

Mode opératoire

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

de 15 %, l'essai est satisfaisant. Si les résultats obtenus avec les flacons 1, 2 et 3 tendent à croître, il est nécessaire de refaire tout l'essai en appliquant des temps d'équilibrage plus longs.

24. L'essai peut aussi être conduit sans préincubation à 30 °C. Afin d'estimer la rapidité avec laquelle s'établit l'équilibre de saturation, des échantillons sont prélevés jusqu'à ce que la durée de l'agitation n'influence plus les concentrations mesurées.
25. Le pH de chaque échantillon doit être mesuré, de préférence au moyen de bandelettes indicatrices spéciales.

Déterminations analytiques

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

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

Méthode par élution sur colonne

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

Méthode du flacon

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

Rapport d'essai

Méthode par élution sur colonne

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

- résultats de l'essai préliminaire,
- identité chimique de la substance et impuretés (étape de purification préliminaire, le cas échéant),
- concentration, débit et pH pour chaque échantillon,
- moyennes et écarts-type sur au moins cinq échantillons provenant du plateau de saturation pour chaque essai,
- moyenne d'au moins deux essais successifs,
- température de l'eau au cours du processus de saturation,
- méthode d'analyse,
- nature du matériau du support,
- chargement du support,
- solvant utilisé,
- toute manifestation d'instabilité chimique de la substance pendant l'essai,
- toute information utile à l'interprétation des résultats, notamment en ce qui concerne les impuretés et l'état physique de la substance.

Méthode du flacon

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

- résultats de l'essai préliminaire,
- identité chimique de la substance et impuretés (étape de purification préliminaire, le cas échéant),

- résultats d'analyse individuels et moyenne si plus d'une valeur a été déterminée pour un même flacon,
- pH de chaque échantillon,
- moyenne des valeurs de différents flacons lorsque celles-ci concordent,
- température de l'essai,
- méthode d'analyse,
- toute manifestation d'instabilité chimique de la substance pendant l'essai,
- toute information utile à l'interprétation des résultats, notamment en ce qui concerne les impuretés et l'état physique de la substance.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Directive 92/69/CEE de la Commission du 31 juillet 1992 portant dix-septième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses (JO L 383 du 29.12.1992, p. 113).
- (2) NF T 20-045 (AFNOR) (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination de la solubilité dans l'eau des solides et liquides à faible solubilité — Méthode de l'élution sur colonne
- (3) NF T 20-046 (AFNOR) (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination de la solubilité dans l'eau des solides et liquides à forte solubilité — Méthode du flacon.»

2) le chapitre A.23 suivant est ajouté:

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

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 123 (2006) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La méthode du brassage lent a permis de déterminer avec exactitude des valeurs logarithmiques du coefficient de partage 1-octanol/eau (P_{OE}) allant jusqu'à 8,2 ⁽¹⁾. Aussi constitue-t-elle une approche expérimentale appropriée pour la détermination directe du P_{OE} de substances fortement hydrophobes.
2. Les autres méthodes de détermination du coefficient de partage 1-octanol/eau (P_{OE}), sont la méthode par agitation en flacon (2) et la méthode par HPLC phase inverse (3). La méthode par agitation en flacon est sujette à des artefacts dus au transfert de micro-gouttelettes d'octanol dans la phase aqueuse. Lorsque les valeurs du P_{OE} augmentent, la présence de ces gouttelettes dans la phase aqueuse engendre une surestimation croissante de la concentration de la substance d'essai dans l'eau. Aussi l'usage de cette méthode est-il limité aux substances dont le $\log P_{OE}$ est < 4 . À partir de valeurs fiables du P_{OE} directement déterminées, la deuxième méthode étalonne la relation entre le temps de rétention sur la colonne HPLC et des valeurs mesurées du P_{OE} . Il existait un projet de ligne directrice de l'OCDE permettant de déterminer les coefficients de partage 1-octanol/eau de substances ionisables (4), mais il ne doit plus être utilisé.
3. La présente méthode d'essai a été élaborée aux Pays-Bas. La précision des méthodes décrites dans ce pays a été validée et optimisée au cours d'un essai tournant de validation auquel ont participé 15 laboratoires (5).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

Signification et utilisation

4. S'agissant des substances organiques inertes, une relation très significative a été mise en évidence entre leur coefficient de partage 1-octanol/eau (P_{OE}) et leur bioaccumulation dans les poissons. De plus, une corrélation entre le P_{OE} et, d'une part, la toxicité pour les poissons et, d'autre part, la sorption de produits chimiques sur des solides tels que les sols et les sédiments, a également été démontrée. La référence (6) livre un large aperçu de ces relations.

5. Des relations très diverses entre le coefficient de partage 1-octanol/eau et d'autres propriétés des substances intéressant la chimie et la toxicologie environnementales ont été établies. Le coefficient de partage 1-octanol/eau est ainsi devenu un paramètre fondamental dans l'évaluation des risques des substances chimiques pour l'environnement et dans la prédiction du devenir de ces substances dans l'environnement.

Champ d'application

6. La méthode du brassage lent est censée réduire la formation de micro-gouttelettes de 1-octanol dans la phase aqueuse, ce qui écarte le problème de la surestimation de la concentration en phase aqueuse due à la présence de molécules de la substance chimie dans ces gouttelettes. Par conséquent, la méthode du brassage lent convient particulièrement à la détermination du P_{OE} de substances dont le $\log P_{OE}$ est supposé supérieur ou égal à 5, gamme dans laquelle la méthode par agitation en flacon (2) tend à fournir des résultats faussés.

DÉFINITION ET UNITÉS

7. Le coefficient de partage d'une substance entre l'eau et un solvant lipophile (1-octanol) caractérise la répartition à l'équilibre de la substance chimique entre les deux phases. Le coefficient de partage entre l'eau et le 1-octanol (P_{OE}) est défini comme étant le rapport des concentrations à l'équilibre de la substance d'essai dans du 1-octanol saturé avec de l'eau (C_O) et dans de l'eau saturée avec du 1-octanol (C_E).

$$P_{OE} = C_O/C_E$$

Le rapport de deux concentrations est une valeur adimensionnelle. Il est exprimé le plus souvent par son logarithme décimal ($\log P_{OE}$). Le P_{OE} dépend de la température et les résultats rapportés doivent préciser la température de mesure.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

8. En vue de déterminer le coefficient de partage, on laisse le système formé par l'eau, le 1-octanol et la substance d'essai s'équilibrer à température constante. Ensuite, on mesure les concentrations de la substance d'essai dans les deux phases.
9. La méthode du brassage lent, proposée ici, permet de réduire les difficultés expérimentales associées à la formation de micro-gouttelettes dans la méthode par agitation en flacon. Avec le brassage lent, l'eau, le 1-octanol et la substance d'essai s'équilibrent dans un réacteur thermostaté soumis à une agitation douce. Les échanges entre les phases sont accélérés par le brassage. Ce dernier produit une légère turbulence qui favorise les échanges entre le 1-octanol et l'eau sans provoquer la formation de gouttelettes (1).

APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

10. La présence de substances autres que la substance d'essai risquant d'influencer le coefficient d'activité de la substance d'essai, celle-ci doit être testée à l'état pur. Il convient d'employer une substance d'essai présentant le degré de pureté le plus élevé que l'on puisse trouver dans le commerce.
11. Cette méthode s'applique aux substances pures qui ne se dissocient ni s'associent et qui ne manifestent aucune activité interfaciale sensible. Cette méthode convient également aux mélanges. Le cas échéant, les coefficients de partage 1-octanol/eau déterminés varient en fonction de la composition chimique du mélange testé et de la composition électrolytique employée comme phase aqueuse. À condition de prendre certaines mesures supplémentaires, cette méthode peut aussi s'appliquer à des substances qui se dissocient ou s'associent (paragraphe 12).
12. Le partage des substances sujettes à la dissociation, telles que les acides organiques et les phénols, les bases organiques et les composés organométalliques, entre l'eau et le 1-octanol comportant de multiples équilibres dans ces phases, le P_{OE} est une constante conditionnelle qui dépend fortement de la composition électrolytique (7) (8). D'où la nécessité de contrôler le pH et la composition électrolytique lors de la détermination du P_{OE} et de rapporter les valeurs de ces deux paramètres. L'évaluation de ces coefficients de partage doit être confiée à un expert. Il convient de sélectionner des valeurs de pH appropriées d'après la valeur de la ou des constantes de dissociation, afin d'établir un coefficient de partage pour chaque état d'ionisation. Les composés organométalliques doivent être testés à l'aide de tampons non complexants (8). À la lumière des connaissances actuelles en matière de chimie en phase aqueuse (constantes de complexation et de dissociation), on choisira des conditions expérimentales permettant d'estimer la formation d'espèces par la substance d'essai en phase aqueuse. Il faut instaurer une force ionique identique dans toutes les expériences en employant un électrolyte de fond.
13. Les substances peu solubles dans l'eau ou présentant un P_{OE} élevé peuvent engendrer des problèmes dus au fait que leurs concentrations dans l'eau sont si faibles qu'il devient difficile de les déterminer avec exactitude. La présente méthode d'essai livre des indications sur la manière de traiter ce problème.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

14. Le degré de pureté des réactifs chimiques doit au moins correspondre à celui de la qualité pour analyse. Il est recommandé d'utiliser des substances d'essai non marquées de composition chimique connue et d'une pureté d'au moins 99 % ou des substances d'essai radiomarquées de composition chimique et pureté radiochimique connues. S'il s'agit de traceurs à demi-vie courte, on appliquera des corrections pour tenir compte de la désintégration. Si la substance d'essai est radiomarquée, il y a lieu d'employer une méthode analytique spécifique à la substance de telle sorte que la radioactivité mesurée se rapporte directement à la substance d'essai.
15. Il est possible d'estimer le $\log P_{OE}$ avec les logiciels vendus dans le commerce à cet effet, ou en s'appuyant sur le rapport des solubilités dans les deux solvants.
16. Avant de déterminer le P_{OE} par la méthode du brassage lent, il faut disposer des informations suivantes sur la substance d'essai:
 - a) formule structurale;
 - b) méthodes analytiques appropriées à la détermination de la concentration de la substance dans l'eau et dans le 1-octanol;
 - c) constante(s) de dissociation des substances ionisables [ligne directrice 112 de l'OCDE (9)];
 - d) solubilité dans l'eau (10);
 - e) hydrolyse abiotique (11);
 - f) biodégradabilité immédiate (12);
 - g) pression de vapeur (13).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Matériel et appareillage

17. Cette expérience nécessite du matériel courant de laboratoire, et en particulier:
 - des agitateurs magnétiques et des barres d'agitation magnétiques recouvertes de Teflon pour agiter la phase aqueuse,
 - des instruments d'analyse permettant de déterminer la concentration de la substance d'essai aux concentrations attendues,
 - une bouteille à agiter munie d'un robinet à sa base. Suivant l'estimation du $\log P_{OE}$ et le seuil de détection de la substance d'essai, on envisagera d'utiliser un réacteur d'un volume supérieur à un litre, de la même géométrie, de manière à obtenir un volume d'eau suffisant pour l'extraction et l'analyse chimiques de la substance d'essai. La concentration de la substance d'essai dans l'extrait aqueux sera donc plus élevée, ce qui rendra la détermination analytique plus fiable. Un tableau reproduisant des estimations du volume minimal requis, le seuil de détection de la substance, l'estimation de son $\log P_{OE}$ et de sa solubilité dans l'eau figure en appendice 1. Ce tableau se fonde sur la relation entre le $\log P_{OE}$ et le rapport des solubilités dans l'octanol et dans l'eau, telle que présentée par Pinsuwan *et al.* (14):

$$\log P_{OE} = 0,88 \log SR + 0,41$$

avec

$$SR = S_{oct}/S_{eau} \text{ (en molarité),}$$

et sur la relation donnée par Lyman (15) pour prédire la solubilité dans l'eau. Les solubilités dans l'eau calculées avec l'équation donnée à l'appendice 1 sont à considérer comme une première estimation. Notons que l'utilisateur est libre d'estimer la solubilité dans l'eau à l'aide de n'importe quelle autre relation jugée mieux représenter la relation entre l'hydrophobie et la solubilité. S'agissant des substances solides, l'inclusion du point de fusion dans la prédiction de la solubilité est par exemple recommandée. Si l'on utilise une équation modifiée, il faut vérifier que l'équation permettant de calculer la solubilité dans l'octanol est toujours valable. Une bouteille à agiter recouverte d'une enveloppe de verre et d'une capacité d'environ un litre est schématisée en appendice 2. Les proportions de la bouteille représentée en appendice 2 se sont avérées propices et doivent être conservées si la dimension de l'appareil est modifiée,

- il est essentiel de maintenir la température constante durant le brassage lent, à l'aide d'un dispositif adéquat.

18. Les récipients doivent être composés d'un matériau inerte rendant négligeable l'adsorption à la surface des récipients.

Préparation des solutions expérimentales

19. La détermination du P_{OE} requiert un 1-octanol de la qualité la plus pure qui puisse se trouver dans le commerce (au moins 99 %). Il est recommandé de purifier le 1-octanol par une extraction réalisée avec un acide, une base et de l'eau, suivie d'un séchage. Le 1-octanol peut, en plus, être purifié par distillation. Les solutions étalons des substances d'essai doivent être préparées avec du 1-octanol purifié. L'eau destinée à la détermination du P_{OE} doit être distillée à l'aide d'un dispositif en verre ou en quartz, ou traitée par un système de purification, ou encore être de qualité HPLC. Il convient de filtrer l'eau distillée à travers des mailles de 0,22 μm et d'inclure des blancs afin de s'assurer que les extraits concentrés ne renferment pas d'impuretés susceptibles d'interférer avec la substance d'essai. Si l'on emploie un filtre en fibres de verre, il faut le nettoyer en le laissant au moins trois heures dans un four à 400 °C.
20. Afin de saturer chaque solvant par l'autre avant l'expérience, on les équilibre dans un récipient suffisamment grand. Pour ce faire, le système à deux phases est soumis à un brassage lent durant deux jours.
21. Une concentration appropriée de la substance d'essai est choisie et dissoute dans du 1-octanol (saturé avec de l'eau). Il y a lieu de déterminer le coefficient de partage 1-octanol/eau dans des solutions diluées dans du 1-octanol et de l'eau. Aussi la concentration de la substance d'essai ne doit-elle pas excéder 70 % de sa solubilité avec une concentration maximale de 0,1 M dans chaque phase (1). Les solutions de 1-octanol utilisées pour l'expérience seront exemptes de substance d'essai en suspension à l'état solide.
22. La quantité appropriée de substance d'essai est dissoute dans du 1-octanol (saturé avec de l'eau). Si l'estimation du $\log P_{OE}$ est supérieure à 5, il faut s'assurer que les solutions de 1-octanol utilisées pour l'expérience ne renferment pas de substance d'essai en suspension à l'état solide. À cette fin, la procédure suivante est appliquée pour les substances chimiques dont la valeur estimée de $\log P_{OE} > 5$:
- la substance d'essai est dissoute dans du 1-octanol (saturé avec de l'eau),
 - on laisse reposer la solution suffisamment longtemps pour que la substance suspendue à l'état solide se dépose. Durant la décantation, la concentration de la substance d'essai est mesurée en continu,
 - une fois que les concentrations mesurées dans la solution de 1-octanol ont atteint une valeur stable, la solution mère est diluée avec un volume approprié de 1-octanol,
 - la concentration de la solution mère diluée est mesurée. Si la concentration mesurée concorde avec la dilution, la solution mère diluée peut être utilisée dans le processus expérimental du brassage lent.

Extraction et analyse des échantillons

23. Le dosage de la substance d'essai s'effectue par une méthode analytique validée. Les chercheurs doivent prouver que, durant l'essai, les concentrations dans le 1-octanol saturé avec de l'eau et dans la phase aqueuse saturée avec du 1-octanol sont supérieures au seuil de quantification du procédé analytique employé. Il y a lieu d'établir avant l'essai le taux de récupération par l'analyse de la substance d'essai en phase aqueuse et en phase 1-octanol, dans les cas où des méthodes d'extraction s'avèrent nécessaires. Le signal analytique doit être corrigé en fonction des blancs et l'on veillera à éviter tout transfert de la substance à analyser d'un échantillon à l'autre.
24. Les concentrations des substances d'essai hydrophobes étant plutôt faibles en phase aqueuse, il faudra probablement extraire la substance de la phase aqueuse à l'aide d'un solvant organique et préconcentrer l'extrait avant analyse. Pour la même raison, il est nécessaire de réduire les éventuelles concentrations du blanc. À cette fin, on emploie des solvants très purs, de préférence des solvants pour l'analyse des résidus. En outre, un nettoyage soigneux (par exemple lavage au solvant ou cuisson à haute température) de la verrerie avant l'expérience peut diminuer le risque de contamination croisée.
25. Il est possible d'estimer le $\log P_{OE}$ à l'aide d'un programme d'estimation ou en faisant appel à un expert. Si sa valeur est supérieure à six, d'une part il convient d'être très attentif aux corrections en fonction du blanc et à tout transfert de la substance à analyser d'un échantillon à l'autre et, d'autre part, il est impératif d'utiliser un étalon de substitution pour corriger le taux de récupération, de façon à pouvoir atteindre des facteurs de préconcentration élevés. Plusieurs logiciels d'estimation du $\log P_{OE}$ se trouvent dans le commerce⁽¹⁾, par exemple Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) et ACD logP (19). Les références (20-22) décrivent les différents procédés d'estimation.

⁽¹⁾ Cette information n'est fournie qu'à titre indicatif. D'autres logiciels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils produisent les mêmes résultats.

26. Les seuils de quantification pour la détermination de la substance d'essai dans le 1-octanol et dans l'eau sont établis suivant des méthodes acceptées. Comme principe de base, le seuil de quantification de la méthode employée peut être considéré comme étant la concentration dans l'eau ou le 1-octanol qui produit un rapport signal/bruit de dix. Il convient de choisir des méthodes d'extraction et de préconcentration appropriées et de spécifier le taux de récupération de l'analyse. Le facteur de préconcentration doit être choisi de façon à produire un signal de l'intensité requise lors de la détermination analytique.
27. En fonction des paramètres de la méthode analytique et des concentrations escomptées, on détermine le volume de l'échantillon qui permettra de déterminer avec exactitude la concentration de la substance d'essai. L'utilisation d'échantillons aqueux trop petits pour obtenir un signal analytique suffisant est à éviter. Les échantillons aqueux ne doivent pas non plus être trop grands, car le volume d'eau restant risquerait d'être insuffisant pour le nombre minimal d'analyses requises ($n = 5$). L'appendice 1 indique les volumes minimaux des échantillons en fonction du volume du récipient, du seuil de détection de la substance d'essai et de sa solubilité.
28. La quantification des substances d'essai s'effectue par comparaison avec les courbes d'étalonnage des substances d'essai. Les concentrations des étalons doivent figurer entre parenthèses à côté des concentrations relevées dans les échantillons analysés.
29. Pour les substances d'essai dont le $\log P_{OE}$ estimé est supérieur à six, on verse un étalon de substitution dans l'échantillon aqueux avant l'extraction afin de relever les pertes survenues durant l'extraction et la préconcentration des échantillons aqueux. Pour que la correction du taux de récupération soit correcte, les étalons de substitution doivent avoir des propriétés très semblables ou identiques à celles de la substance d'essai. À cette fin, on utilise de préférence des analogues isotopiques (stables) marqués de la substance d'essai (perdeutériés ou marqués au ^{13}C , par exemple). Si l'utilisation d'un isotope marqué stable, c'est-à-dire marqué au ^{13}C ou au 2H , est impossible, il faut démontrer, en s'appuyant sur des données fiables tirées de publications, que les propriétés physico-chimiques de l'étalon de substitution sont très proches de celles de la substance d'essai. Des émulsions peuvent se former au cours de l'extraction liquide-liquide de la phase aqueuse. Pour réduire ce phénomène, on peut ajouter du sel et laisser reposer l'émulsion toute une nuit. Les méthodes utilisées pour extraire et préconcentrer les échantillons doivent être mentionnées.
30. Les échantillons prélevés dans la phase 1-octanol peuvent, si nécessaire, être dilués avec un solvant adéquat avant l'analyse. De plus, l'utilisation d'étalons de substitution pour corriger la récupération est recommandée pour les substances qui se sont avérées présenter un degré de variation élevé lors des essais de récupération (écart-type relatif supérieur à 10 %).
31. Les détails de la méthode analytique devront figurer dans le rapport. Ceux-ci incluent la méthode d'extraction, les facteurs de préconcentration et de dilution, les paramètres des instruments, le processus d'étalonnage, la gamme d'étalonnage, la récupération de la substance d'essai présente dans l'eau par un procédé analytique, l'ajout d'étalons de substitution pour corriger le taux de récupération, les valeurs des blancs, les seuils de détection et les seuils de quantification.

Déroulement de l'essai

Rapports volumiques 1-octanol/eau optimaux

32. Les volumes d'eau et de 1-octanol sont choisis en fonction du seuil de quantification dans le 1-octanol et dans l'eau, des facteurs de préconcentration appliqués aux échantillons aqueux, des volumes prélevés dans le 1-octanol et dans l'eau et des concentrations prévues. Pour des raisons expérimentales, le volume de 1-octanol employé dans le système de brassage lent doit être choisi de telle sorte que la couche de 1-octanol soit suffisamment épaisse ($> 0,5$ cm) pour qu'un prélèvement puisse s'effectuer dans la phase 1-octanol sans la perturber.
33. Les rapports volumiques utilisés couramment pour analyser des substances dont le $\log P_{OE}$ est supérieur ou égal à 4,5 sont de 20 à 50 ml de 1-octanol et de 950 à 980 ml d'eau dans un récipient d'un litre.

Conditions expérimentales

34. Durant l'essai, le réacteur est thermostaté de manière à limiter la variation de température à moins de $1^\circ C$. L'essai doit être conduit à $25^\circ C$.
35. On protège le système expérimental de la lumière du jour en effectuant l'essai dans une pièce obscure ou en recouvrant le réacteur d'une feuille d'aluminium.
36. L'essai doit être mené dans un environnement aussi dépoussiéré que possible.
37. Le système 1-octanol/eau est agité jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. Le temps requis pour atteindre l'équilibre est évalué au moyen d'un essai pilote de brassage lent au cours duquel on prélève de l'eau et de l'octanol périodiquement. Les temps de prélèvement doivent être espacés d'au moins cinq heures.
38. Chaque détermination du P_{OE} doit s'effectuer sur la base d'au moins trois essais de brassage lent indépendants.

Détermination du temps requis pour parvenir à l'équilibre

39. On admet que l'équilibre est atteint lorsque la régression du rapport des concentrations dans le 1-octanol et dans l'eau en fonction du temps (la variable temps comprenant quatre points) se traduit par une pente ne s'écartant pas de manière significative de zéro pour une valeur de p égale à 0,05. Le temps minimal requis pour atteindre l'équilibre avant de pouvoir commencer les prélèvements est d'un jour. En principe, le prélèvement des substances dont le $\log P_{OE}$ estimé est inférieur à cinq peut s'effectuer au cours des deuxième et troisième jours. Il est possible que le temps pour parvenir à l'équilibre soit plus long pour les substances plus hydrophobes. Pour une substance ayant un $\log P_{OE}$ égal à 8,23 (décachlorobiphényle), 144 heures ont été suffisantes pour atteindre l'équilibre. L'équilibre est évalué par une série de prélèvements effectués dans le même récipient.

Début de l'essai

40. On commence par remplir le réacteur avec de l'eau saturée en 1-octanol. Ensuite, on attend que le système atteigne la température requise par le thermostat.
41. La quantité voulue de substance d'essai (dissoute dans le volume requis de 1-octanol saturé en eau) est ajoutée soigneusement au réacteur. Il s'agit d'une étape critique de l'essai car il faut éviter le mélange turbulent des deux phases. À cette fin, la phase 1-octanol peut être versée doucement à l'aide d'une pipette sur la paroi du récipient d'essai, à proximité de la surface de l'eau. Elle ruissellera ainsi le long de la paroi et formera un film au dessus de la phase aqueuse. Il faut toujours éviter de décanter le 1-octanol directement dans la bouteille; on ne peut pas faire tomber des gouttes de 1-octanol directement dans l'eau.

42. Une fois l'agitation lancée, on augmente lentement sa vitesse. Si les moteurs de l'agitateur ne peuvent être réglés correctement, on envisagera d'utiliser un transformateur. La vitesse d'agitation doit être réglée de manière à créer un vortex à l'interface entre l'eau et le 1-octanol d'une profondeur de 0,5 à 2,5 cm au maximum. Il faut diminuer la vitesse d'agitation si la profondeur du vortex dépasse 2,5 cm, sinon des micro-gouttelettes de 1-octanol peuvent se former dans la phase aqueuse et donner lieu à une surestimation de la concentration de la substance d'essai dans l'eau. D'après les résultats d'un essai tournant de validation (5), on recommande d'appliquer une vitesse maximale d'agitation de 2,5 cm. Elle représente un compromis permettant de parvenir rapidement à l'équilibre tout en limitant la formation de microgouttelettes de 1-octanol.

Prélèvement et traitement des échantillons

43. Il convient d'arrêter l'agitateur avant d'effectuer les prélèvements et d'attendre que les liquides s'immobilisent. Lorsque le prélèvement est terminé, l'agitateur est remis en marche doucement, comme décrit plus haut; après quoi on augmente la vitesse d'agitation progressivement.
44. La phase aqueuse est prélevée à un robinet situé à la base du réacteur. Il faut toujours éliminer le volume mort d'eau contenu dans les robinets (environ 5 ml pour le récipient illustré à l'appendice 2). L'eau retenue dans les robinets n'est pas agitée et donc pas en équilibre avec l'ensemble. On note le volume des échantillons aqueux et on vérifie que la quantité de substance d'essai présente dans l'eau éliminée est prise en compte dans l'établissement du bilan massique. Il y a lieu de réduire au minimum les pertes par évaporation en permettant à l'eau de s'écouler doucement dans l'entonnoir séparateur de façon à ne pas perturber la couche eau/1-octanol.
45. On prélève les échantillons de 1-octanol en aspirant une petite aliquote (environ 100 μ l) de la couche 1-octanol au moyen d'une seringue de 100 microlitres en verre et métal. Il faut veiller à ne pas perturber l'interface. Le volume de liquide prélevé est consigné. Une petite aliquote suffit, étant donné que l'échantillon de 1-octanol sera dilué.
46. Les étapes inutiles de transfert d'échantillons sont à éviter. Aussi le volume des échantillons est-il déterminé par gravimétrie. Dans le cas des échantillons aqueux, cette détermination s'effectue par la collecte de l'échantillon aqueux dans un entonnoir séparateur contenant déjà le volume de solvant requis.

RÉSULTATS ET RAPPORT

47. La méthode d'essai prescrit de déterminer le P_{OE} en conduisant trois essais à brassage lent (trois unités expérimentales) dans des conditions expérimentales identiques. La régression utilisée pour démontrer que l'équilibre a été atteint doit s'appuyer sur les résultats d'au moins quatre déterminations du rapport C_O/C_E effectuées à quatre moments ponctuels successifs. La variance ainsi calculée correspond à une mesure de l'incertitude de la valeur moyenne obtenue pour chaque unité expérimentale.
48. Le P_{OE} peut être caractérisé par la variance des données recueillies pour chaque unité expérimentale. Cette information est employée pour calculer le P_{OE} en considérant qu'il équivaut à la moyenne pondérée des résultats de chaque unité expérimentale. Pour ce faire, l'inverse de la variance des résultats des unités expérimentales est employé comme coefficient pondérateur. Ainsi, les données accusant une forte variation (exprimée par la variance), qui sont donc moins fiables, ont moins d'influence sur le résultat que les données offrant une variance faible.

49. L'écart-type pondéré est calculé d'une manière analogue. Il caractérise la répétabilité de la mesure du P_{OE} . Un écart-type pondéré faible traduit une répétabilité élevée de la détermination du P_{OE} au sein d'un même laboratoire. Le traitement statistique formel des données est résumé ci-dessous.

Traitement des résultats

Démonstration de la réalisation de l'équilibre

50. Le logarithme du rapport des concentrations de la substance d'essai dans le 1-octanol et dans l'eau ($\log C_O/C_E$) est calculé pour chaque instant de prélèvement. On démontre que l'équilibre chimique est atteint en traçant une courbe de ce rapport en fonction du temps. L'apparition d'un plateau sur ce tracé, établi à partir d'au moins quatre points consécutifs sur l'axe du temps, indique que l'équilibre a été atteint et que le composé est complètement dissous dans le 1-octanol. Dans le cas contraire, il faut poursuivre l'essai jusqu'à ce que quatre points de temps successifs présentent une pente qui n'est pas significativement différente de zéro, pour une valeur de $p = 0,05$, montrant ainsi que le $\log C_O/C_E$ est indépendant du temps.

Calcul du $\log P_{OE}$

51. La valeur du $\log P_{OE}$ de l'unité expérimentale correspond à la moyenne pondérée du $\log C_O/C_E$ pour la partie de la courbe du $\log C_O/C_E$ en fonction du temps, pour laquelle l'état d'équilibre a été démontré. On calcule la moyenne pondérée en pondérant les données avec l'inverse de la variance de telle sorte que l'influence des données sur le résultat final est inversement proportionnelle à l'incertitude des données.

Moyenne des $\log P_{OE}$

52. La valeur moyenne du $\log P_{OE}$ de différentes unités expérimentales correspond à la moyenne des résultats de chaque unité expérimentale pondérés avec leurs variances respectives.

Le calcul répond à la formule suivante:

$$\log P_{OE, moy} = (\sum w_i \times \log P_{OE, i}) \times (\sum w_i)^{-1}$$

où:

$\log P_{OE, i}$ = est la valeur du $\log P_{OE}$ de chaque unité expérimentale i ;

$\log P_{OE, moy}$ = est la moyenne pondérée de tous les $\log P_{OE}$;

w_i = est le poids statistique attribué à la valeur $\log P_{OE}$ de l'unité expérimentale i .

L'inverse de la variance de $\log P_{OE, i}$ est représentée par w_i ($w_i = \text{var}(\log P_{OE, i})^{-1}$).

53. L'estimation de l'erreur de la moyenne de $\log P_{OE}$ correspond à la répétabilité des $\log C_O/C_E$ déterminés durant la phase d'équilibre dans chaque unité expérimentale. Elle se traduit par l'écart-type pondéré du $\log P_{OE, moy}$ ($\sigma_{\log P_{OE, moy}}$) qui mesure l'erreur associée au $\log P_{OE, moy}$. L'écart-type pondéré peut être calculé à partir de la variance pondérée ($\text{var}_{\log P_{OE, moy}}$) de la façon suivante:

$$\text{var}_{\log P_{OE, moy}} = (\sum w_i \times (\log P_{OE, i} - \log P_{OE, moy})^2) \times (\sum w_i \times (n - 1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log P_{OE, moy}} = (\text{var}_{\log P_{OE, moy}})^{0,5}$$

où n représente le nombre d'unités expérimentales.

Rapport d'essai

54. Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes:

Substance d'essai:

- nom courant, nom chimique, numéro CAS, formule structurale (montrant la position du radiomarqueur, le cas échéant) et propriétés physico-chimiques pertinentes (voir paragraphe 17),
- pureté (impuretés) de la substance d'essai,
- pureté radiochimique des substances marquées et activité molaire (s'il y a lieu),
- estimation préliminaire du $\log P_{OE}$ et méthode utilisée pour ce calcul.

Conditions expérimentales:

- dates de la réalisation des études,
- température à laquelle s'est déroulé l'essai,
- volumes de 1-octanol et d'eau au début de l'essai,
- volumes des échantillons de 1-octanol et d'eau prélevés,
- volumes de 1-octanol et d'eau restant dans les récipients expérimentaux;
- description des récipients expérimentaux et des conditions d'agitation utilisées (géométrie de la barre d'agitation et du récipient expérimental, hauteur du vortex en mm et vitesse d'agitation si elle est connue),
- méthodes analytiques utilisées pour déterminer la substance d'essai et seuil de quantification de la méthode,
- heures de prélèvement,
- pH de la phase aqueuse et tampons utilisés, lorsqu'on a ajusté le pH pour des molécules ionisables,
- nombre d'expériences identiques.

Résultats:

- répétabilité et sensibilité des méthodes analytiques employées,
- concentrations de la substance d'essai déterminées dans le 1-octanol et dans l'eau en fonction du temps,
- démonstration du bilan massique,
- température et écart-type ou gamme de températures appliquée durant l'essai,
- régression du rapport des concentrations en fonction du temps,
- valeur moyenne de $P_{OE\ moy}$ et son écart-type,
- analyse et interprétation des résultats,
- exemples de données brutes d'une analyse représentative (toutes les données brutes doivent être conservées conformément aux bonnes pratiques de laboratoire), notamment le taux de récupération des produits de substitution, le nombre de niveaux appliqué à l'étalonnage (ainsi que les critères régissant le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage) et résultats de l'assurance qualité/contrôle qualité (AQ/CQ),
- s'il est disponible: rapport de validation du protocole expérimental (à mentionner parmi les références).

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) De Bruijn J.H.M., Busser F., Seinen W., Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the 'slow-stirring' method. *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 499-512.
- (2) Chapitre A.8 de la présente annexe, Coefficient de partition.
- (3) Chapter A.8 de la présente annexe, Coefficient de partition.
- (4) OCDE (2000). Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques: 122 – Coefficient de partition (n-octanol/eau): méthode par pH-métrie pour les substances ionisables. Paris.
- (5) Tolls J. (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.
- (6) Boethling R.S., Mackay D. (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

-
- (7) Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M. (1993). *Environmental Organic Chemistry*. Wiley, New York, NY.
- (8) Arnold C.G., Widenhaupt A., David M.M., Müller S.R., Haderlein S.B., Schwarzenbach R.P. (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.
- (9) OCDE (1981) Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques: 112 – Constantes de dissociation dans l'eau. Paris.
- (10) Chapitre A.6 de la présente annexe, Solubilité dans l'eau.
- (11) Chapitre C.7 de la présente annexe, Dégradation – Dégradation abiotique: hydrolyse en fonction du pH.
- (12) Chapitre C.4 – Parties II à VII (Méthode A à F) de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité immédiate.
- (13) Chapitre A.4 de la présente annexe, Pression de vapeur.
- (14) Pinsuan S., Li A. and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.
- (15) Lyman W.J. (1990). Solubility in water. In: *Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds*, Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.
- (16) Leo A., Weininger D. (1989). *Medchem Software Manual*. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.
- (17) Meylan W. (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.
- (18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.
- (19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.
- (20) Lyman W.J. (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, DC.
- (21) Rekker R.F., de Kort H.M. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.
- (22) Jübermann O. (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.
-

Appendice 1

Tables permettant de calculer les volumes d'eau minimaux requis pour détecter des substances d'essai ayant différentes valeurs de log P_{OE} en phase aqueuse

Hypothèses:

- Volume maximal de chaque aliquote = 10 % du volume total; 5 aliquotes = 50 % du volume total.
- Concentration des substances d'essai = $0,7 \times$ solubilité dans chaque phase. Si les concentrations sont inférieures, il faudra utiliser de plus grands volumes.
- Volume utilisé pour la détermination du seuil de détection = 100 ml.
- Log P_{OE} en fonction du log S_E et le log P_{OE} en fonction de SR (S_{oct}/S_e) sont des représentations raisonnables de relations pour les substances d'essai.

Estimation de S_e

log P _{OE}	équation	log S _e	S _e (mg/l)
4	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	0,035	1,084E+00
5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-0,426	3,750E-01
5,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-0,887	1,297E-01
6	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-1,348	4,487E-02
6,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-1,809	1,552E-02
7	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-2,270	5,370E-03
7,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-2,731	1,858E-03
8	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-3,192	6,427E-04

Estimation de S_{oct}

log P _{OE}	équation	S _{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,49$	2,710E+05

Masse totale de la substance d'essai (mg)	Masse _{oct} /Masse _{eau}	Masse _{H2O} (mg)	Conc _{H2O} (mg/l)	Masse _{oct} (mg)	Conc _{oct} (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333

Masse totale de la substance d'essai (mg)	Masse _{oct} /Masse _{eau}	Masse _{H₂O} (mg)	Conc _{H₂O} (mg/l)	Masse _{oct} (mg)	Conc _{oct} (mg/l)
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Calcul des volumes

Volume minimal requis pour la phase H₂O à chaque concentration du seuil de détection

log K _{OE}	Seuil de détection (microgrammes/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volume utilisé pour le seuil de détection (L)	0,1					

Légende pour les calculs

Représente < 10 % du volume total de la phase aqueuse, récipient d'équilibrage de 1 litre.

Représente < 10 % du volume total de la phase aqueuse, récipient d'équilibrage de 2 litres.

Représente < 10 % du volume total de la phase aqueuse, récipient d'équilibrage de 5 litres.

Représente < 10 % du volume total de la phase aqueuse, récipient d'équilibrage de 10 litres.

Dépasse 10 % y compris du récipient d'équilibrage de 10 litres.

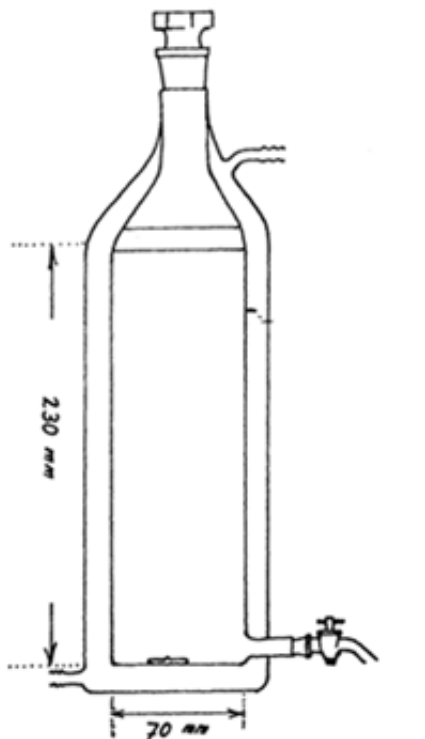
Vue d'ensemble des volumes requis en fonction de la solubilité dans l'eau et du log P_{OE}

Volume minimal requis pour la phase H₂O à chaque concentration du seuil de détection (ml)

log P _{OE}	S _e (mg/l)	Seuil de détection (microgrammes/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86

log P _{OE}	S _e (mg/l)	Seuil de détection (microgrammes/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volume utilisé pour le seuil de détection (L)		0,1					

Appendice 2

Exemple de récipient expérimental à enveloppe de verre destiné à la détermination du P_{OE} par la méthode du brassage lent

3) le chapitre B.2 est remplacé par le texte suivant:

«B.2. TOXICITÉ AIGUË PAR INHALATION**INTRODUCTION**

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 403 (2009) de l'OCDE (1) pour les essais de produits chimiques. Une première ligne directrice 403 pour les essais de toxicité aiguë par inhalation a été adoptée en 1981. La présente méthode d'essai B.2 (équivalente à la ligne directrice 403 révisée) a été conçue afin d'offrir une plus grande souplesse, de réduire l'utilisation d'animaux et de répondre aux exigences réglementaires. Elle décrit deux types d'études: un protocole traditionnel de détermination de la CL_{50} et un protocole "concentration $\times$ temps" ($C \times t$). Les principales caractéristiques de cette ligne directrice tiennent au fait qu'elle permet d'obtenir une relation concentration-réponse pour les effets non létaux à létaux, afin d'en déduire une concentration létale médiane (CL_{50}), une concentration seuil non létale (comme la CL_{01}) et une pente, ainsi que de déterminer si un des sexes est plus sensible à la substance d'essai. Le protocole $C \times t$ est utilisé lorsque s'applique une réglementation particulière ou pour un besoin scientifique qui nécessite un essai sur des animaux pour plusieurs durées d'exposition différentes, par exemple à des fins d'aménagement du territoire ou de planification des interventions d'urgence: calcul des niveaux guides d'exposition aiguë, recommandations pour la planification des mesures d'urgence, niveaux seuil d'exposition aiguë, etc.
2. On trouvera dans le document d'orientation n° 39 sur les essais de toxicité aiguë par inhalation (document d'orientation 39) des indications sur la conduite et l'interprétation des études liées à la présente méthode d'essai (2).
3. Le document d'orientation 39 (2) regroupe les définitions utilisées dans le contexte de la présente méthode d'essai.
4. La présente méthode d'essai permet de caractériser les substances d'essai, de les soumettre à une évaluation quantitative des risques, et de classer conformément au règlement (CE) n° 1272/2008 (3). Le document d'orientation 39 (2) fournit des indications sur le choix de la méthode d'essai appropriée pour les essais de toxicité aiguë. Lorsque seules sont requises des informations sur la classification et l'étiquetage, le chapitre B.52 de la présente annexe (4) est généralement recommandé [voir document d'orientation 39 (2)]. La méthode d'essai B.2 n'est pas spécifiquement destinée à tester des matériaux spéciaux comme les substances isométriques ou fibreuses faiblement solubles ou les nanomatériaux manufacturés.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

5. Avant d'entreprendre un essai conformément à la présente méthode d'essai, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, y compris les études existantes [par exemple, le chapitre B.52 de la présente annexe (4)] dont les résultats éviteraient des essais supplémentaires, afin de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination de l'espèce, de la souche, du sexe, du mode d'exposition et des concentrations d'essai appropriés, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, les résultats de tous les essais de toxicité in vitro ou in vivo auxquels elle a été soumise, son (ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine, les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées, voir document d'orientation 39 (2).
6. Il convient d'éviter autant que possible de tester des substances corrosives et/ou irritantes à des concentrations susceptibles d'engendrer une souffrance sévère et/ou une détresse. Pour déterminer s'il est possible de renoncer à des essais complémentaires, le potentiel de corrosion/d'irritation fait l'objet d'une évaluation reposant sur un jugement d'expert basé sur les éléments suivants: données expérimentales sur l'homme et l'animal (provenant, par exemple, d'essais à doses répétées réalisés à des concentrations non corrosives ou irritantes), données in vitro existantes [par exemple chapitres B.40 (5), B.40 bis (6) de la présente annexe, ou ligne directrice 435 de l'OCDE (7)], valeurs du pH, informations concernant des substances analogues ou toute autre donnée pertinente. À des fins réglementaires spécifiques (par exemple pour l'établissement de plans d'urgence), la présente méthode d'essai peut être utilisée pour exposer des animaux à ces substances car elle donne au directeur de l'étude ou à l'investigateur principal la maîtrise du choix des concentrations cibles. Celles-ci ne doivent cependant pas induire d'effets corrosifs/irritants importants, mais elles sont suffisantes pour prolonger la courbe de concentration-réponse jusqu'à des niveaux correspondant à l'objectif scientifique et réglementaire de l'essai. Ces concentrations sont choisies au cas par cas et une justification du choix des concentrations est apportée, voir document d'orientation 39 (2).

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. La présente méthode d'essai B.2 révisée doit en principe permettre d'obtenir des informations suffisantes sur la toxicité aiguë d'une substance d'essai pour procéder à son classement, et fournir les données sur sa létalité nécessaires aux évaluations quantitatives des risques (CL₅₀, CL₀₁ et pente, par exemple) pour l'un des sexes ou les deux. Cette méthode d'essai propose deux méthodes. La première suit un protocole traditionnel dans lequel des groupes d'animaux sont exposés à une concentration limite (essai limite) ou à une série de concentrations suivant un processus séquentiel pendant une durée prédéterminée de quatre heures en général. Des objectifs réglementaires spécifiques peuvent nécessiter de recourir à d'autres durées d'exposition. La seconde méthode suit un protocole "concentration x temps" (C × t) dans lequel des groupes d'animaux sont exposés à une concentration (concentration limite) ou à une série de concentrations différentes sur des durées différentes.
8. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés. Ils sont pris en compte dans l'interprétation des résultats de l'essai au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente (8).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Choix des espèces animales**

9. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

10. Les femelles sont nullipares et non gravides. Le jour de leur exposition, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 8 à 12 semaines. Leur poids corporel n'excède pas, pour chaque sexe, ± 20 % du poids moyen des animaux du même âge précédemment exposés. Sélectionnés au hasard, les animaux sont marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, ils sont conservés dans leur cage pour une période d'au minimum 5 jours avant le début de l'essai. Les animaux sont également acclimatés aux appareils d'essai, pendant une courte période précédant l'essai, afin d'atténuer le stress causé par leur introduction dans un nouvel environnement.

Conditions d'élevage des animaux

11. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est de 22 ± 3 °C. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal, et ne doit engendrer qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés "nez seul", il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne doivent pas provoquer chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable,

alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés "corps entier" à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour empêcher la filtration de l'aérosol d'essai par la fourrure des congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

Chambre d'inhalation

12. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de la substance d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition "nez seul" (qui inclut les dispositifs "tête seule", "nez seul" et "museau seul") est privilégié. Le mode d'exposition "nez seul" est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition "corps entier" peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais cela est alors justifié dans le rapport d'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition "corps entier", on veille à ce que le volume total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (2) décrit les principes des techniques d'exposition "corps entier" ou "nez seul", ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques.

CONDITIONS D'EXPOSITION

Administration des concentrations

13. Les expositions "nez seul" peuvent durer jusqu'à 6 heures pour les rats. Pour les souris, les expositions "nez seul" ne dépassent pas 4 heures en général. Si des essais d'une durée plus longue sont nécessaires, une justification est apportée, voir document d'orientation 39 (2). Les animaux exposés "corps entier" à des aérosols demeurent seuls dans la chambre afin d'éviter l'ingestion de la substance d'essai par le toilettage de leurs compagnons. Les animaux sont privés de nourriture pendant la période d'exposition. Dans une exposition "corps entier", les animaux peuvent boire de l'eau.
14. Les animaux sont exposés à la substance d'essai présentée sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou sous une forme mixte. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, de la concentration choisie, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion.

Répartition granulométrique

15. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles de se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 4 µm, avec un écart type géométrique (og) compris entre 1,5 et 3,0 (2) (9) (10). Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques peuvent avoir une taille inférieure à cette norme, tandis que les particules chargées, les fibres et les substances hygroscopiques (dont la taille augmente dans l'environnement humide de l'appareil respiratoire) peuvent avoir une taille supérieure.

Préparation de la substance d'essai dans un véhicule

16. Pour atteindre la concentration et la taille granulométrique appropriées de la substance d'essai, il est possible d'avoir recours à un véhicule; en règle générale, l'eau est choisie de préférence. Les substances particulières peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin d'atteindre la répartition granulométrique requise, mais un soin particulier devra être pris de ne pas décomposer ou altérer la substance d'essai. Lorsque les procédés mécaniques sont suspectés d'avoir altéré la composition de la substance d'essai (température extrême due aux frictions d'un broyage excessif, par exemple), la composition de la substance d'essai devra être vérifiée analytiquement. On prendra soin de ne pas contaminer la substance d'essai. Il n'est pas nécessaire de tester les substances granulaires non friables qui sont élaborées précisément pour ne pas être inhalables. Un test d'usure de surface est réalisé pour démontrer que la manipulation de la substance granulaire ne produit pas de particules respirables. Dans le cas contraire, un essai de toxicité par inhalation est réalisé.

Animaux témoins

17. Un groupe témoin négatif (air) n'est pas nécessaire. Lorsqu'un véhicule autre que l'eau est utilisé pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est utilisé seulement quand on ne dispose pas de données historiques sur la toxicité. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude d'une substance d'essai préparée dans un véhicule, ce dernier est considéré comme non toxique à la concentration testée; il n'y a donc pas lieu d'utiliser de témoin du véhicule.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION

Débit d'air dans la chambre d'exposition

18. Le débit d'air dans la chambre est contrôlé avec soin, surveillé en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les

paramètres dynamiques pertinents de production de l'atmosphère d'essai. On prendra particulièrement soin d'éviter toute re-respiration dans les chambres d'exposition "nez seul" lorsque le débit d'air à travers le système d'exposition ne permet pas de produire une circulation dynamique de l'atmosphère contenant la substance d'essai. Des méthodologies sont prévues pour démontrer l'absence de re-respiration dans les conditions expérimentales choisies (2) (11). La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasse pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées.

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

19. La température de la chambre d'exposition est maintenue à 22 ± 3 °C. Dans les cas d'exposition "nez seul" et "corps entier" l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est surveillée et enregistrée trois fois au minimum pour les durées allant jusqu'à 4 heures, et toutes les heures pour des durées plus courtes. L'humidité relative est de préférence comprise entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple lorsque la substance d'essai se présente sous forme de solution aqueuse), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences de la substance d'essai avec la méthode d'essai.

Substance d'essai: concentration nominale

20. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de la substance d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai: concentration réelle

21. La concentration réelle est la concentration de la substance d'essai dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à la substance d'essai sont également effectuées par une préétude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre la substance d'essai (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie. Les concentrations cibles, nominales et réelles sont fournies dans le rapport d'étude, mais seules les concentrations réelles sont utilisées dans les analyses statistiques pour calculer la valeur des concentrations létales.
22. Un seul lot de la substance d'essai est utilisé, si possible, et l'échantillon est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il convient de réaliser une caractérisation de la substance d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes: temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de la substance d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).
23. L'atmosphère d'exposition est maintenue aussi constante que possible et suivie soit en continu, soit de façon intermittente suivant la méthode d'analyse. Lorsque l'injection s'effectue de façon intermittente, les échantillons d'atmosphère de la chambre sont prélevés au moins deux fois sur une étude de quatre heures. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, le recueil d'un échantillon pour toute la période d'exposition est acceptable. Si des fluctuations nettes apparaissent d'un échantillon à un autre, on a recours à quatre échantillons par exposition pour les concentrations d'essai suivantes. Les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas ± 10 % pour les gaz et vapeurs ou ± 20 % pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de la substance d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égénéralisation des concentrations dans la chambre d'exposition t_{95} . Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (2).
24. Pour des systèmes très complexes constitués de gaz ou vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion ou substances d'essai propulsées à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisit donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général la substance active principale dans le mélange. Quand la substance d'essai est un mélange, la concentration analytique devra être indiquée pour le mélange et pas uniquement pour la substance active ou le composant (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Substance d'essai: répartition granulométrique

25. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum deux fois pour chaque exposition de 4 heures à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques. Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade et l'autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, voir document d'orientation 39 (2). Si cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au minimum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter une exposition. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes (voir paragraphe 15).

MODE OPÉRATOIRE

26. Les deux types d'études décrits ci-dessous sont le protocole traditionnel et le protocole $C \times t$. Tous deux peuvent comprendre une étude préliminaire, une étude principale et/ou un essai limite (protocole traditionnel) ou un essai à une concentration limite ($C \times t$). Si l'un des sexes est connu pour être plus sensible à la substance d'essai, le directeur de l'étude peut choisir de réaliser ces essais avec seulement des animaux de ce sexe. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées "nez seul", il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Avant le début de l'étude, toutes les données disponibles sont examinées afin de réduire l'usage des animaux. Par exemple, les données obtenues selon le chapitre B.52 de la présente annexe (4) peuvent supprimer la nécessité d'une étude préliminaire et aussi démontrer si l'un des sexes est plus sensible à la substance d'essai, voir document d'orientation 39 (2).

PROTOCOLE TRADITIONNEL**Considérations générales sur le protocole traditionnel**

27. Dans une étude traditionnelle, des groupes d'animaux sont exposés à une substance d'essai pendant une période de temps fixée (généralement 4 heures) dans une chambre d'exposition "nez seul" ou "corps entier". Les animaux sont exposés soit à une concentration limite (essai limite), soit à trois concentrations au minimum selon une procédure séquentielle (étude principale). Une étude préliminaire peut précéder l'étude principale, sauf s'il existe déjà des informations concernant la substance d'essai, provenant par exemple d'une étude précédente effectuée selon l'étude B.52, voir document d'orientation 39 (2).

Étude préliminaire pour le protocole traditionnel

28. Une étude préliminaire permet d'estimer l'activité de la substance d'essai, d'identifier des différences entre les sexes quant à la sensibilité à cette substance, et de choisir plus facilement les niveaux de concentration pour l'étude principale ou l'essai limite. Lors du choix des niveaux de concentration pour l'étude préliminaire, toutes les informations disponibles sont prises en compte, y compris les données (Q)SAR et les données correspondant à des produits chimiques analogues. Pour chaque concentration, on exposera au maximum trois mâles et trois femelles (il peut être nécessaire d'utiliser 3 animaux par sexe pour établir une différence de sensibilité entre les sexes). Une étude préliminaire peut être effectuée avec une seule concentration, ou plusieurs si nécessaire. Elle ne porte pas sur un nombre d'animaux ou de concentrations tel qu'elle ressemblerait à une étude principale. Il est possible d'utiliser les résultats d'une étude B.52 (4) précédente au lieu de réaliser une étude préliminaire, voir document d'orientation 39 (2).

Essai limite pour le protocole traditionnel

29. L'essai limite est utilisé si l'on sait ou si l'on prévoit que la substance d'essai sera virtuellement non toxique, c'est-à-dire qu'elle ne suscitera une réponse de toxicité qu'au-delà de la concentration limite réglementaire. Dans un essai limite, un seul groupe de trois mâles et trois femelles est exposé à la substance d'essai à une concentration limite. Des informations sur la toxicité de la substance d'essai peuvent être tirées d'essais déjà pratiqués sur des substances analogues, en tenant compte de l'identité et du pourcentage des composants dont la toxicité est avérée. Si l'on manque d'informations sur la toxicité de la substance d'essai, ou si l'on s'attend à ce qu'elle soit toxique, l'essai principal est réalisé.
30. Le choix des concentrations limites dépend généralement des exigences réglementaires. Lorsqu'on applique le règlement (CE) n° 1272/2008, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l (ou, à défaut, la concentration maximale pouvant être atteinte) (3). Il peut s'avérer techniquement difficile d'atteindre les concentrations limites de certaines substances d'essai, en particulier pour les vapeurs et les aérosols. Pour les essais d'aérosols, le principal objectif est d'atteindre une taille de particule qui soit respirable (c'est-à-dire d'un DAMM de 1 à 4 µm), ce qui est possible avec la plupart des substances d'essai à des concentrations de 2 mg/l. Les essais sur des aérosols à des concentrations supérieures à 2 mg/l ne sont tentés que si l'on peut obtenir des particules de taille respirable, voir document d'orientation 39 (2). Selon le règlement (CE) n° 1272/2008, il est déconseillé de réaliser des essais au-delà des concentrations limites pour des raisons de bien-être des animaux (3). Les essais aux concentrations limites ne sont envisagés que s'il est très probable que leurs résultats présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé humaine (3), et une justification est fournie dans le rapport d'étude. En cas de substance potentiellement explosive, on prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de provoquer une explosion. Afin d'éviter le recours inutile à des animaux, un essai sans animaux est effectué avant l'essai limite pour s'assurer qu'il est possible d'atteindre dans la chambre les conditions expérimentales d'un essai limite.

31. Si une mortalité ou un état moribond sont observés à la concentration limite, les résultats de l'essai limite peuvent servir d'étude préliminaire pour les essais suivants à d'autres concentrations (voir étude principale). Si la concentration limite est impossible à atteindre du fait des propriétés physiques ou chimiques de la substance d'essai, c'est la concentration maximale pouvant être atteinte qui devra être testée. Si la létalité à cette concentration est inférieure à 50 %, il n'y a pas lieu de poursuivre l'essai. Si la concentration limite n'a pas pu être atteinte, une explication, étayée par des données, est fournie dans le rapport d'étude. Si la concentration maximale pouvant être atteinte pour une vapeur ne provoque pas de toxicité, il peut être nécessaire de produire la substance d'essai sous la forme d'un aérosol liquide.

Étude principale pour le protocole traditionnel

32. Une étude principale fait en général appel à cinq mâles et cinq femelles (ou cinq animaux du sexe le plus sensible, s'il est connu) par niveau de concentration, avec au minimum trois niveaux de concentration. Les niveaux de concentration sont suffisamment nombreux pour que l'on puisse obtenir une analyse statistique fiable. L'intervalle de temps entre l'exposition des différents groupes est déterminé par le moment d'apparition, la durée et la gravité des signes de toxicité observés. L'exposition au niveau de concentration supérieur est retardée jusqu'à ce que l'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Le directeur de l'étude peut alors ajuster la concentration cible pour le groupe suivant. Pour les essais de toxicité par inhalation, qui nécessitent des technologies sophistiquées, il ne sera pas toujours possible de procéder ainsi, c'est pourquoi l'exposition des animaux à la concentration supérieure devra se baser sur l'expérience acquise et un jugement scientifique. Pour les essais portant sur des mélanges, il convient de se référer au document d'orientation 39 (2).

PROTOCOLE "CONCENTRATION × TEMPS" ($C \times t$)

Considérations générales sur le protocole $C \times t$

33. Une étude séquentielle "concentration × temps" ($C \times t$) peut constituer une alternative au protocole traditionnel lorsqu'il s'agit d'évaluer la toxicité par inhalation (12) (13) (14). Avec cette approche, les animaux sont exposés à la substance d'essai à plusieurs niveaux de concentration et pour des durées d'exposition variables. Tous les essais sont réalisés dans des chambres d'exposition "nez seul", les chambres "corps entier" ne se prêtant pas à ce protocole. Un exemple de procédure séquentielle illustrant ce protocole est présenté à l'appendice 1. Une analyse de simulation a montré que le protocole traditionnel et le protocole $C \times t$ étaient tous les deux capables de donner des valeurs fiables de la CL_{50} , mais que le protocole $C \times t$ permettait en général d'obtenir des valeurs plus sûres pour la CL_{01} et la CL_{10} (15).
34. Une analyse de simulation a démontré qu'il convient généralement d'utiliser deux animaux par intervalle de $C \times t$ (un animal de chaque sexe ou deux animaux du sexe le plus sensible) pour tester 4 concentrations et 5 durées d'exposition lors de l'étude principale. Le directeur de l'étude peut choisir, dans certaines circonstances, d'utiliser deux rats de chaque sexe par intervalle de $C \times t$ (15), de manière à réduire le biais et la variabilité des estimations, augmenter le taux de succès de l'estimation et améliorer la couverture de l'intervalle de confiance. Cependant, en cas d'ajustement insuffisant aux données (en utilisant un animal par sexe ou deux animaux du sexe le plus sensible), une cinquième concentration d'exposition peut également suffire. Pour plus d'informations sur le nombre d'animaux et les concentrations à utiliser pour une étude $C \times t$, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Étude préliminaire pour le protocole $C \times t$

35. Une étude préliminaire permet d'estimer l'activité de la substance d'essai et facilite le choix des niveaux de concentration pour l'étude principale. Une étude préliminaire avec au maximum trois animaux par sexe et par concentration (pour plus de détails, voir l'appendice III du document d'orientation 39) (2) peut être utilisée afin de sélectionner une concentration de départ appropriée pour l'étude principale et de réduire le nombre d'animaux utilisés. Il peut en effet être nécessaire de recourir à trois animaux par sexe pour établir une différence selon le sexe. Ces animaux sont soumis à une exposition unique, d'une durée de 240 minutes en général. Pour évaluer la faisabilité de la production d'atmosphères d'essai appropriées, des essais techniques préliminaires sans animaux sont réalisés. Il n'est généralement pas nécessaire de procéder à une étude préliminaire si l'on dispose de données de mortalité provenant d'une étude effectuée suivant la méthode B.52 (4). Pour choisir la concentration cible initiale dans une étude B.2, le directeur de l'étude tient compte des profils de mortalité observés dans n'importe quelle étude B.52 (4) disponible, pour les deux sexes et pour toutes les concentrations testées, voir document d'orientation 39 (2).

Concentration initiale pour le protocole $C \times t$

36. La concentration initiale (Session d'exposition I) (voir appendice 1) est soit une concentration limite, soit une concentration choisie par le directeur de l'étude sur la base d'une étude préliminaire. Des groupes constitués d'un animal de chaque sexe sont exposés à cette concentration pendant des périodes de durée variable (15, 30, 60, 120 ou 240 minutes, par exemple), soit un total de 10 animaux, pour ce qu'on appelle la Session d'exposition I (voir appendice 1).
37. Le choix des concentrations limites dépend généralement des exigences réglementaires. Lorsqu'on applique le règlement (CE) n° 1272/2008, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l (ou, à défaut, la concentration maximale pouvant être atteinte) (3). Il peut s'avérer techniquement difficile d'atteindre les concentrations limites de certaines substances d'essai, en particulier pour les vapeurs et les aérosols. Pour les essais d'aérosols, l'objectif est d'atteindre une taille de particule qui soit respirable (c'est-à-dire un DAMM de 1 à 4 µm), ce qui est possible avec la plupart des substances d'essai à des concentrations de 2 mg/l. Les essais sur des aérosols à des concentrations supérieures

à 2 mg/l ne sont tentés que si l'on peut obtenir des particules de taille respirable, voir document d'orientation 39 (2). Selon le règlement (CE) n° 1272/2008, il est déconseillé de réaliser des essais au-delà des concentrations limites pour des raisons de bien-être des animaux (3). Les essais au-delà de la concentration limite ne sont envisagés que s'il est très probable que leurs résultats présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé humaine (3), et une justification est alors fournie dans le rapport d'étude. En cas de substance potentiellement explosive, on prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de provoquer une explosion. Afin d'éviter le recours inutile à des animaux, un essai sans animaux est effectué avant l'essai à la concentration initiale pour s'assurer qu'il est possible d'atteindre dans la chambre les conditions expérimentales d'un essai à cette concentration.

38. Si une mortalité ou un état moribond sont observés à la concentration initiale, les résultats obtenus à cette concentration peuvent servir de point de départ pour les essais suivants à d'autres concentrations (voir étude principale). Si la concentration limite est impossible à atteindre du fait des propriétés physiques ou chimiques de la substance d'essai, c'est la concentration maximale pouvant être atteinte qui est testée. Si la létalité à cette concentration est inférieure à 50 %, il n'y a pas lieu de poursuivre l'essai. Si la concentration limite n'a pas pu être atteinte, une explication, étayée par des données, est fournie dans le rapport d'étude. Si la concentration maximale pouvant être atteinte pour une vapeur ne provoque pas de toxicité, il peut être nécessaire de produire la substance d'essai sous la forme d'un aérosol liquide.

Étude principale pour le protocole $C \times t$

39. La concentration initiale (session d'exposition I) (voir appendice 1) testée dans l'étude principale est soit une concentration limite, soit une concentration choisie par le directeur de l'étude sur la base d'une étude préliminaire. Si une mortalité a été observée pendant ou après la session I, l'exposition minimale ($C \times t$) qui a provoqué la mortalité sert de guide pour déterminer la concentration et les périodes d'exposition pour la session II. Chaque session d'exposition suivante dépendra de la session précédente (voir appendice 1).
40. Pour de nombreuses substances d'essai, les résultats obtenus à la concentration initiale, plus ceux obtenus lors de trois sessions d'exposition supplémentaires sur une échelle de temps plus courte (la durée des périodes d'exposition successives suivant une progression géométrique de facteur $\sqrt{2}$), sont suffisants pour établir la relation de mortalité $C \times t$ (15). Nonobstant, il peut être utile de recourir à une cinquième concentration d'exposition [voir appendice 1 et document d'orientation 39 (2)]. Pour le traitement mathématique des résultats concernant le protocole $C \times t$, voir appendice 1.

OBSERVATIONS

41. Un examen clinique des animaux est pratiqué régulièrement pendant la période d'exposition. Après l'exposition, des examens cliniques sont réalisés au minimum deux fois le jour de l'exposition, ou plus fréquemment suivant la réponse des animaux au traitement, et au minimum une fois par jour par la suite pendant une période de 14 jours. La durée de la période d'observation n'est pas fixée, mais est déterminée par la nature et le moment d'apparition des signes cliniques, ainsi que par la durée de la période de récupération. Les moments d'apparition et de disparition des signes de toxicité sont importants, en particulier quand on constate un certain retard dans l'apparition de ces signes. Toutes les observations sont systématiquement enregistrées individuellement pour chaque animal. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés pour des raisons de bien-être animal. Lors de l'examen clinique des signes de toxicité, il convient de veiller à ne pas confondre une piètre apparence initiale et des troubles respiratoires passagers, imputables à la procédure d'exposition, avec une toxicité de la substance d'essai qui impliquerait d'euthanasier les animaux plus tôt. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets mesurés éthiquement acceptables sont pris en considération, voir document d'orientation 19 (7). Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.
42. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, mais aussi sur les changements affectant l'appareil respiratoire, le système circulatoire, les systèmes nerveux autonome et central, ainsi que l'activité somatomotrice et le comportement. Toute différenciation entre les effets locaux et systémiques est consignée autant que possible. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma doivent retenir l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement.

Poids corporel

43. Le poids corporel de chacun des animaux est enregistré une fois lors de la période d'acclimatation, le jour de l'exposition (jour 0) juste avant celle-ci et au moins les jours 1, 3, et 7 (puis de façon hebdomadaire par la suite), ainsi qu'au moment de la mort ou de l'euthanasie, s'il est postérieur au jour 1. Le poids corporel est un indicateur critique reconnu de la toxicité, on surveille donc attentivement les animaux, dont le poids reste constamment inférieur de 20 %, ou plus à celui précédant l'étude. Les animaux survivants sont pesés et euthanasiés à la fin de la période postexposition.

Pathologie

44. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai ou euthanasiés et écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une autopsie macroscopique. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.

45. D'autres observations, ajoutées a priori à dessein, peuvent être envisagées afin d'élargir l'interprétation de l'étude, comme la mesure du poids pulmonaire des rats survivants et/ou la mise en évidence d'une irritation par examen de l'appareil respiratoire au microscope. Peuvent aussi être examinés les organes montrant une pathologie macroscopique chez les animaux survivant au moins 24 heures, et ceux pour lesquels une réaction au traitement est connue ou attendue. Un examen microscopique de l'intégralité de l'appareil respiratoire peut fournir des informations utiles pour les substances d'essai réactives à l'eau, comme les acides et les substances hygroscopiques.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

46. Pour chacun des animaux, le poids corporel et les conclusions de l'autopsie sont fournis. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquer pour chaque groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie.

Rapport d'essai

47. Le rapport d'essai contient, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage:

- description des conditions d'encagement, y compris: nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire,
- espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- méthode de randomisation,
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau),
- description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

Substance d'essai:

- nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation),
- données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule:

- justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau),
- données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation:

- description de la chambre d'inhalation avec ses dimensions et son volume,
- source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère,
- équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle,

- source de l'air, traitement de l'air fourni/évacué et système de climatisation utilisé,
- méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai,
- différence de pression (positive ou négative),
- orifices d'exposition par chambre ("nez seul") ou emplacement des animaux dans la chambre ("corps entier"),
- homogénéité/stabilité temporelle de l'atmosphère d'essai,
- situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition,
- débits d'air, débit d'air par orifice d'exposition ("nez seul") ou rapport du volume de l'animal à la chambre ("corps entier"),
- informations sur l'équipement utilisé, le cas échéant, pour mesurer l'oxygène et le dioxyde de carbone,
- temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}),
- nombre de changements de volume par heure,
- doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition:

- justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale,
- concentrations nominales (masse totale de la substance d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre),
- concentrations réelles de la substance d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges à tester produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément,
- toutes les concentrations atmosphériques sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m³, etc.); les unités de volume (ppm, ppb, etc.) peuvent aussi être indiquées entre parenthèses;
- répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique $\sigma(g)$, ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales:

- détails sur la préparation de la substance d'essai, y compris sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des matériaux solides ou pour préparer les solutions de la substance d'essai. Lorsque des procédés mécaniques sont susceptibles d'avoir altéré la composition de la substance d'essai, inclure les résultats des analyses effectuées pour vérifier la composition de la substance d'essai,
- description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci,
- détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération de la substance d'essai à partir du milieu d'échantillonnage),
- justification du choix des concentrations d'essai.

Résultats:

- tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation,
- tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation,
- tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g ,
- tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de mortalité, et nature, sévérité, moment d'apparition et durée des effets),
- poids corporel de chacun des animaux enregistrés lors de l'essai, date et heure de leur mort si celle-ci intervient avant l'euthanasie prévue; moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et, le cas échéant, leur réversibilité,
- pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques disponibles,
- estimations de la létalité (CL_{50} , DL_{01} par exemple), notamment limites de confiance à 95 % et pente (si elle est fournie par la méthode d'évaluation),
- relation statistique, y compris l'estimation du facteur n (pour le protocole $C \times t$). Le nom du logiciel de statistiques utilisé est indiqué.

Discussion et interprétation des résultats:

- un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente méthode d'essai, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules,
- la respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis,
- une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (8),
- si un essai suivant le chapitre B.52 de la présente annexe (4) a dû être interrompu en faveur de la présente méthode d'essai B.2, les justifications sont fournies,
- la cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude,
- la cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) OCDE (2009). Toxicité aiguë par inhalation. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n° 403, OCDE Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
- (2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 39, Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
- (3) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006 (JO L 353 du 31.12.2008, p. 1).
- (4) Chapitre B.52 de la présente annexe, Toxicité aiguë par inhalation – Méthode par classe de toxicité aiguë (ATC).

- (5) Chapitre B.40 de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: Essai de résistance électrique transcutanée (RET).
- (6) Chapter B.40 bis de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: Essai sur modèle de peau humaine.
- (7) OCDE (2005). Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n° 435, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
- (8) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 19, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
- (9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.
- (10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.
- (11) Pauluhn J. and Thiel A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167.
- (12) Zwart J.H.E., Arts J.M., ten Berge W.F., Appelman L.M. (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278-290.
- (13) Zwart J.H.E., Arts J.M., Klokman-Houweling E.D., Schoen E.D. (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105-117.
- (14) Ten Berge W.F. and Zwart A. (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65-71.
- (15) OCDE (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement - Série sur les essais et évaluations n° 104, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
- (16) Finney D.J. (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DÉFINITION

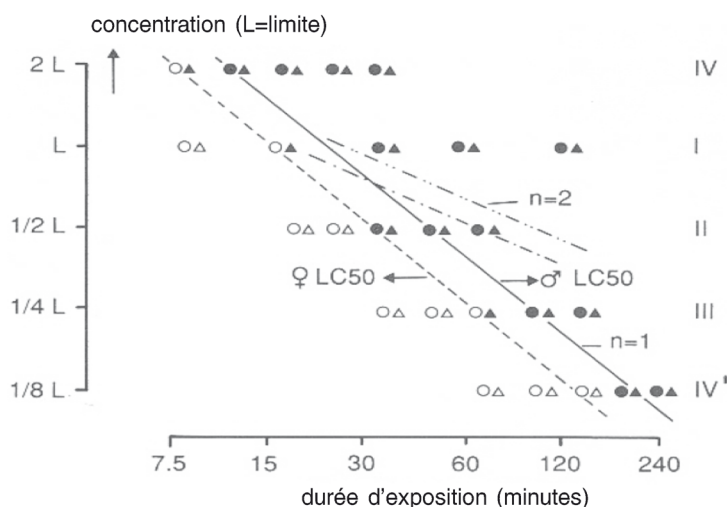
Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Appendice 1

Protocole C × t

1. Une étude séquentielle "Concentration × Temps" (C × t) peut constituer une alternative au protocole traditionnel lorsqu'il s'agit d'évaluer la toxicité par inhalation (12) (13) (14). Elle est privilégiée lorsqu'une réglementation particulière s'applique ou pour un besoin scientifique nécessitant des essais sur animaux portant sur des durées d'exposition multiples, par exemple à des fins d'établissement de plans d'intervention d'urgence ou d'aménagement du territoire. Cette approche débute en général avec un essai à la concentration limite (session d'exposition I) au cours duquel les animaux sont exposés à la substance d'essai pendant cinq périodes de durées différentes (15, 30, 60, 120 et 240 minutes par exemple) de façon à obtenir plusieurs durées d'exposition pour une même séance (voir figure 1). Lorsqu'on applique le règlement (CE) n° 1272/2008, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l. Ces niveaux ne peuvent être dépassés que s'il est indispensable de réaliser des essais à ces niveaux de concentration pour des raisons réglementaires ou scientifiques (voir le paragraphe 37 de la méthode B.2).
2. Si l'on manque d'informations sur la toxicité de la substance d'essai, une étude préliminaire peut être réalisée, au cours de laquelle des groupes d'au maximum 3 animaux par sexe sont exposés à des concentrations cibles sélectionnées par le directeur de l'étude, en général sur une durée de 240 minutes.
3. Si une concentration limite est testée lors de la session d'exposition I et que l'on observe une mortalité inférieure à 50 %, il n'est pas nécessaire d'effectuer des essais supplémentaires. Si, pour des raisons réglementaires ou scientifiques, il est indispensable d'établir la relation concentration/temps/réponse pour des niveaux plus élevés que la concentration limite indiquée, l'exposition suivante est réalisée, par exemple, au double de la concentration limite (c'est-à-dire 2L dans la figure 1).
4. Si une toxicité est observée à la concentration limite, des essais supplémentaires (étude principale) sont nécessaires. Ces expositions supplémentaires sont réalisées soit à des concentrations plus faibles (dans la figure 1: sessions d'exposition II, III ou IV'), soit à des concentrations plus fortes sur des durées plus courtes (dans la figure 1, session d'exposition IV) qui sont adaptées et moins espacées.
5. L'essai (concentration initiale et concentrations supplémentaires) est réalisé avec l'animal de chaque sexe par point concentration/temps, ou avec 2 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai par point concentration/temps. Le directeur de l'étude peut choisir, dans certaines circonstances, d'utiliser 2 rats de chaque sexe par point concentration/temps, ou 4 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai par point concentration/temps (15). L'utilisation de 2 animaux par point concentration/temps réduit en général le biais et la variabilité des estimations, augmente le taux de succès de l'estimation et améliore la couverture de l'intervalle de confiance lié à ce protocole. Pour plus de détails, se reporter au document d'orientation 39 (2).
6. Idéalement, chaque session d'exposition est exécutée sur une seule journée, ce qui donne la possibilité de retarder l'exposition suivante jusqu'à ce qu'on soit raisonnablement sûr de la survie des animaux, et permet au directeur de l'étude d'ajuster la concentration cible et les durées pour la prochaine séance d'exposition. Il est recommandé de commencer chaque séance d'exposition avec le groupe qui sera exposé le plus longtemps, 240 minutes par exemple, suivi du groupe qui sera exposé 120 minutes, et ainsi de suite. Si, par exemple, les animaux du groupe exposé 240 minutes meurent après 90 minutes d'exposition ou montrent des signes importants de toxicité (par exemple, modifications considérables de la respiration, notamment difficultés respiratoires), il est inutile d'exposer un groupe pendant 120 minutes car la mortalité serait très vraisemblablement de 100 %. Le directeur de l'étude choisit alors des durées d'exposition plus courtes pour cette concentration (90, 65, 45, 33 et 25 minutes par exemple).
7. La concentration dans la chambre d'exposition est mesurée régulièrement pour déterminer la concentration moyenne pondérée en fonction du temps pour chaque durée d'exposition. Autant que possible, c'est l'heure de la mort de chaque animal qui est utilisée dans l'analyse statistique (et non la durée d'exposition).
8. Il convient d'examiner les résultats des quatre premières sessions d'exposition pour repérer les éventuelles données manquantes dans la courbe concentration-temps (voir figure 1). S'il manque effectivement des données, une exposition supplémentaire (5^e concentration) peut être réalisée. La concentration et les durées d'exposition de cette 5^e exposition sont choisies de manière à combler cette lacune.
9. Toutes les sessions d'exposition (y compris la première) seront utilisées pour calculer la relation concentration-temps-réponse au moyen d'une analyse statistique (16). On utilisera si possible, pour chaque intervalle C × t, la concentration moyenne pondérée en fonction du temps et la durée d'exposition jusqu'à la mort (si celle-ci intervient durant l'exposition).

Figure 1

Illustration hypothétique d'une relation concentration-temps-mortalité chez des rats

Symboles vides = survivants; symboles pleins = animaux morts

Triangles = femelles; cercles = mâles

Ligne pleine = valeurs de CL_{50} (de 7,5 à 240 minutes) pour les mâles, $n = 1$

Ligne tiretée = valeurs de CL_{50} (de 7,5 à 240 minutes) pour les femelles, $n = 1$

Lignes pointillées = valeurs de CL_{50} hypothétique pour les mâles et les femelles si n avait été égal à 2 (12).

Glossaire

concentration limite.

durée d'exposition.

10. On trouvera ci-dessous un exemple de la procédure séquentielle:

Session d'exposition I – Essai à la concentration limite (voir figure 1)

- 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total ^(a)
- Concentration cible ^(b) = concentration limite
- Exposer cinq groupes d'animaux à cette concentration cible pendant respectivement 15, 30, 60, 120 et 240 minutes.

↓

Session d'exposition II ^(c) – Étude principale

- 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.

^(a) Si aucune information n'est disponible sur la sensibilité de chaque sexe à la substance d'essai, des rats des deux sexes seront utilisés, soit 1 animal de chaque sexe par concentration. À partir d'informations existantes ou s'il apparaît au cours de cette session d'exposition qu'un des sexes est plus sensible, 10 animaux de ce sexe seront utilisés (2 animaux par point concentration/temps) à chaque niveau de concentration pour les essais suivants.

^(b) Lorsqu'on applique le règlement (CE) n° 1272/2008, les concentrations limites pour les gaz, les vapeurs et les aérosols sont respectivement de 20 000 ppm, 20 mg/l et 5 mg/l. Si l'on s'attend à une toxicité ou en raison des résultats de l'étude préliminaire, on choisit des concentrations de départ plus faibles. Pour des besoins réglementaires ou scientifiques, des concentrations plus fortes peuvent être utilisées.

^(c) Idéalement, l'exposition des animaux au niveau de concentration suivant est retardée jusqu'à ce qu'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Le directeur de l'étude peut alors ajuster la concentration cible et les durées pour la session d'exposition suivante.

- Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus faible ^(d) (1/2L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur $\sqrt{2}$, voir figure 1).

↓

Session d'exposition III – Étude principale

- 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.
- Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus faible ^(d) (1/4L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur $\sqrt{2}$, voir figure 1).

↓

Session d'exposition IV' – Étude principale

- 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.
- Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus faible ^(d) (1/8L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur $\sqrt{2}$, voir figure 1).

↓ ou

Session d'exposition IV – Étude principale

- 1 animal/sexe par point concentration/temps; 10 animaux au total.
- Exposer cinq groupes d'animaux à une concentration plus forte ^(e) (2L) pendant des durées légèrement plus longues (d'un facteur $\sqrt{2}$; voir figure 1).

Traitement mathématique des résultats pour le protocole C × t

- Une procédure C × t constituée de 4 ou 5 concentrations d'exposition et de 5 durées d'exposition génère respectivement 20 ou 25 points de données. Avec ces points de données, la relation C × t peut être calculée à l'aide d'une analyse statistique (16):

Équation 1:

$$\text{Probit}(P) = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t$$

où C = concentration; t = durée d'exposition, ou

Équation 2:

$$\text{Response} = f(C^n t)$$

où $n = b_1/b_2$.

Avec l'équation 1, la valeur de la CL_{50} peut être calculée pour une période de temps donnée (par exemple, 4 heures, 1 heure, 30 minutes ou n'importe quelle période de temps comprise dans la plage des périodes de temps testées) avec $P = 5$ (50 % de réponse). À noter que la règle de Haber ne s'applique que lorsque $n = 1$. La CL_{01} est calculée avec $P = 2,67$.

^(d) La dose minimale (concentration × temps) qui provoque la mortalité au cours de l'essai à la concentration initiale (première session d'exposition) servira de guide pour déterminer la prochaine combinaison de concentrations et de durées d'exposition. Généralement, la concentration diminuera de moitié (1/2L) et les animaux seront exposés sur une échelle de temps plus courte, les périodes d'exposition étant réparties selon une progression géométrique de facteur 1,4 ($\sqrt{2}$, voir référence 11) centrée sur le temps correspondant au niveau de la dose létale minimale (temps × concentration) observé lors de la première exposition. Dans la figure 1, la mortalité au cours de la Session d'exposition I a d'abord été observée au bout de 15 minutes; les durées de la Session II ont donc été centrées autour de 30 minutes et sont de 15, 21, 30, 42 et 60 minutes. Après les deux premières expositions, il est fortement recommandé de tracer les résultats dans un graphique similaire, comme indiqué ci-dessus, et de vérifier si la relation entre la concentration et le temps définit un angle de 45 degrés ($n = 1$) ou si la pente de la relation concentration-temps-réponse est moins forte ($n = 2$ par exemple) ou plus forte ($n = 0,8$ par exemple). Dans ces derniers cas, il est fortement recommandé d'adapter en conséquence les concentrations et les durées suivantes.

^(e) Dans certains cas, il peut être nécessaire d'augmenter la concentration (2L) sur une échelle de temps plus courte, les périodes d'exposition étant réparties selon une progression géométrique de facteur 1,4 ($\sqrt{2}$) centrée sur le temps correspondant au niveau de dose létale minimale observé lors de la première exposition. La durée minimale d'exposition est de préférence supérieure à 5 minutes et la durée maximale d'exposition ne dépasse pas 8 heures.»

4) les chapitres B.7 et B.8 sont remplacés par le texte suivant:

«B.7. ÉTUDE DE TOXICITÉ ORALE À DOSE RÉPÉTÉE PENDANT 28 JOURS SUR LES RONGEURS

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 407 (2008) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La ligne directrice 407 originale avait été adoptée en 1981. Des modifications y ont été apportées en 1995 afin de tirer davantage d'informations des animaux utilisés dans l'étude, en particulier en matière de neurotoxicité et d'immunotoxicité.
2. L'OCDE a lancé en 1998 une activité prioritaire destinée à réviser les lignes directrices existantes et à en élaborer de nouvelles pour les essais et le dépistage des perturbateurs endocriniens (8). L'un des objectifs était de mettre à jour la ligne directrice de l'OCDE relative à l'"étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs" (407), en y introduisant des paramètres capables de détecter l'activité endocrinienne des substances d'essai. Le protocole a alors fait l'objet d'un programme international approfondi chargé d'évaluer la pertinence et la praticabilité de ces paramètres additionnels, leur performance pour des produits chimiques à activité (anti)œstrogénique, (anti)androgénique et (anti)thyroïdienne, leur reproductibilité intra- et inter-laboratoires et leur interférence avec les paramètres requis par la version antérieure de la ligne directrice. Les très nombreuses données ainsi recueillies ont été rassemblées et évaluées en détail dans un rapport très complet de l'OCDE (9). La présente mise à jour de la méthode B.7 est le fruit de l'expérience et des résultats accumulés durant le programme international d'essais. Elle permet de mettre certains effets à médiation endocrinienne en perspective avec d'autres effets toxicologiques.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITATIVES

3. Lors de l'appréciation et de l'évaluation des caractéristiques toxiques d'un produit chimique, la détermination de la toxicité orale à doses répétées peut s'effectuer après avoir obtenu des informations préliminaires sur la toxicité à partir d'essais de toxicité aiguë. La présente méthode d'essai vise à étudier les effets toxiques des produits chimiques sur un large spectre de cibles de toxicité. Elle fournit des informations sur les risques pour la santé que peut entraîner une exposition répétée durant une période de temps relativement limitée, notamment pour le système nerveux, le système immunitaire et le système endocrinien. Concernant ces critères d'effet précis, elle devrait permettre d'identifier des produits chimiques potentiellement neurotoxiques, pouvant justifier des études plus approfondies de cet aspect, et des produits chimiques qui interfèrent avec la physiologie de la thyroïde. Elle pourrait également fournir des données sur les produits chimiques qui affectent les organes reproducteurs mâles et/ou femelles des jeunes animaux adultes et donner des indications sur leurs effets immunologiques.
4. Les résultats de la présente méthode d'essai B.7 devraient servir à l'identification des dangers et à l'évaluation des risques. Les résultats obtenus concernant les paramètres endocriniens devraient être interprétés à la lumière du "Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des produits chimiques perturbant le système endocrinien" (11). La méthode prévoit une étude basique de toxicité à dose répétée, pouvant être utilisée sur les produits chimiques pour lesquels une étude de 90 jours n'est pas justifiée (par exemple quand le volume de production ne dépasse pas certaines limites) ou préalablement à une étude à long terme. La durée d'exposition doit être de 28 jours.
5. Le programme international mené afin de valider les paramètres susceptibles de détecter l'activité endocrinienne d'une substance d'essai a montré que la qualité des données obtenues grâce à cette méthode d'essai B.7 dépendra beaucoup de l'expérience du laboratoire pratiquant les essais. Ce constat concerne spécifiquement la détermination histopathologique de changements cycliques dans les organes reproducteurs femelles et la détermination du poids des petits organes hormono-dépendants, difficiles à disséquer. Un document d'orientation a été élaboré en matière d'histopathologie (19). Il est disponible sur le site de l'OCDE à la rubrique consacrée aux lignes directrices pour les essais de produits chimiques. Il vise à aider les pathologistes dans leurs investigations et à améliorer la sensibilité des essais. Un certain nombre de paramètres ont été identifiés comme indicateurs de toxicité endocrinienne et ont été ajoutés à la méthode d'essai. D'autres, dont l'utilité n'a pu être prouvée faute de données suffisantes ou dont la capacité à détecter les perturbateurs endocriniens a été insuffisamment démontrée par le programme de validation, sont proposés comme paramètres facultatifs (voir appendice 2).
6. Sur la base des données produites par le processus de validation, il convient de souligner que la sensibilité de cet essai est insuffisante pour identifier toutes les substances présentant une action (anti)androgénique ou (anti)œstrogénique (9). La présente méthode d'essai ne s'applique pas à un stade de vie très sensible aux perturbations endocriniennes. Elle a pourtant permis, pendant le processus de validation, d'identifier des substances affectant faiblement ou fortement la fonction thyroïdienne, ainsi que des substances agissant fortement ou modérément sur le système endocrinien par le biais des récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes, mais dans la plupart des cas, n'est pas parvenue à identifier les substances agissant sur le système endocrinien en affectant faiblement ces récepteurs. Ainsi ne peut-elle être décrite comme un essai de dépistage de l'activité endocrinienne.
7. Par conséquent, l'absence d'effet lié à ces modes d'action ne peut constituer une preuve de l'absence d'effet sur le système endocrinien. En ce qui concerne les effets à médiation endocrinienne, la caractérisation des substances ne doit donc pas s'appuyer uniquement sur les résultats de la présente méthode d'essai, mais doit être utilisée dans le cadre d'une démarche fondée sur le "poids de la preuve", combinant toutes les données existant sur un produit chimique pour caractériser son action potentielle sur le système endocrinien. C'est pourquoi la prise de décision réglementaire sur l'activité endocrinienne des produits chimiques (caractérisation des substances) doit adopter une méthode large ne s'appuyant pas sur les résultats de cette seule méthode d'essai.

8. Il est entendu que toutes les procédures d'essai utilisant des animaux obéiront aux normes locales en vigueur sur le traitement à leur réserver; la description des soins et traitements prodigués aux animaux utilisés dans le présent essai correspond donc à des normes de performance minimales qui seront le cas échéant adaptées à la législation locale si celle-ci est plus stricte. D'autres recommandations sur l'humanité du traitement à réserver aux animaux ont été formulées par l'OCDE (14).
9. L'appendice 1 présente les définitions utilisées.

PRINCIPE DE L'ESSAI

10. La substance à tester est administrée quotidiennement par voie orale à différents niveaux de dose à plusieurs groupes d'animaux, à raison d'un niveau de dose par groupe, pendant une période de 28 jours. Chaque jour au cours de cette période, les animaux sont examinés soigneusement afin de déceler tout signe de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont euthanasiés au cours de l'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont également euthanasiés et autopsiés. Une étude de 28 jours fournit des informations sur les effets d'une exposition répétée par voie orale et peut indiquer la nécessité d'études ultérieures plus longues. Elle peut également apporter des informations sur la sélection des concentrations en vue d'études plus poussées. Les données tirées de l'application de la méthode d'essai devraient permettre de caractériser la toxicité de la substance d'essai, d'avoir une indication sur la relation dose réponse et de déterminer la concentration sans effet nocif observé (CSENO).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sélection de l'espèce animale

11. L'espèce de rongeur préférée est le rat, bien que d'autres espèces de rongeurs puissent être utilisées. Si les paramètres spécifiés dans la méthode d'essai B.7 sont étudiés sur une autre espèce de rongeur, une justification détaillée devra être donnée. Bien qu'il soit biologiquement plausible que d'autres espèces répondent aux produits toxiques de manière similaire au rat, l'utilisation d'espèces plus petites peut provoquer une variabilité accrue compte tenu de la difficulté technique à disséquer des organes de plus petite taille. Le rat a été la seule espèce utilisée lors du programme international de validation des paramètres pour la détection des perturbateurs endocriniens. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains issus de souches de laboratoire courantes. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. L'administration doit commencer dès que possible après le sevrage et, dans tous les cas, avant l'âge de neuf semaines. Au début de l'étude, les différences de poids entre les animaux utilisés doivent être minimales et ne pas excéder $\pm 20\%$ de la moyenne du poids pour chaque sexe. Lorsque l'essai est conduit à titre d'étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme, il est préférable d'utiliser des animaux issus de la même souche et de la même source dans les deux études.

Encagement et alimentation

12. Toutes les procédures doivent respecter les normes locales en vigueur sur le traitement des animaux de laboratoire. La température dans le local d'expérimentation doit être de $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). L'humidité relative doit être d'au moins 30% et si possible ne pas dépasser 70% , excepté pendant le nettoyage de la pièce, l'idéal étant $50\text{--}60\%$. Pour l'éclairage, on doit utiliser la lumière artificielle et respecter une séquence de 12 heures d'éclairement et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai, lorsqu'elle est administrée dans la nourriture. Les animaux doivent être encagés par petits groupes du même sexe; ils peuvent être encagés individuellement si une nécessité scientifique le justifie. Pour l'encagement de groupe, il convient de ne pas dépasser cinq animaux par cage.
13. La nourriture doit être analysée régulièrement à la recherche de contaminants. Un échantillon en sera conservé jusqu'à la finalisation du rapport.

Préparation des animaux

14. De jeunes animaux adultes sains sont répartis au hasard entre le groupe témoin et les groupes traités. Les cages doivent être placées de façon à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Les animaux sont identifiés individuellement et placés dans les cages au moins cinq jours avant le début de l'étude, pour leur permettre de s'acclimater aux conditions du laboratoire.

Préparation des doses

15. La substance d'essai est administrée par gavage ou dans la nourriture ou l'eau de boisson, la méthode étant choisie en fonction de l'objectif de l'étude et des propriétés physico-chimiques, toxiques et cinétiques de la substance d'essai.
16. Lorsque cela s'avère nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule adéquat. On recommande, de privilégier, dans la mesure du possible, l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse. À défaut, on peut utiliser une solution ou une suspension dans l'huile (par exemple l'huile de maïs) et finalement une solution dans d'autres véhicules. La toxicité des véhicules autres que l'eau doit être connue. La stabilité de la substance d'essai dans le véhicule doit être déterminée.

PROTOCOLE**Nombre et sexe des animaux**

17. Au moins 10 animaux (5 femelles et 5 mâles) doivent être utilisés pour chaque dose. Si on envisage d'euthanasier des animaux au cours de l'essai, il faut accroître le nombre d'animaux d'expérience du nombre d'animaux euthanasiés avant la fin de l'épreuve. On envisagera d'inclure un groupe satellite supplémentaire de 10 animaux (5 par sexe) dans le groupe témoin et dans le groupe traité à la plus forte dose, afin d'observer la réversibilité, la persistance, ou l'apparition tardive des effets toxiques, au moins 14 jours après le traitement.

Dosage

18. De manière générale, au moins trois groupes d'essai et un groupe témoin doivent être utilisés, mais si d'après l'évaluation des autres données aucun effet n'est attendu à la dose de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, un essai limite peut être réalisé. S'il n'existe aucune donnée préalable, une étude préliminaire (animaux de la même souche et de la même provenance) peut être menée pour faciliter la détermination des doses à utiliser. Exception faite de l'exposition avec la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités d'une manière identique à ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé pour administrer la substance d'essai, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé.
19. Les niveaux de dose doivent être déterminés en tenant compte de toutes les informations disponibles concernant les propriétés toxiques ou toxico-cinétiques de la substance d'essai ou de substances analogues. La dose la plus élevée doit provoquer des effets toxiques, sans être létale ou causer de sévères souffrances. Une séquence de doses décroissantes doit ensuite être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une concentration sans effet nocif observé (CSENO) à la dose la plus faible. Des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (par exemple un facteur supérieur à 10) entre les doses.
20. En cas d'observation d'une toxicité générale (par exemple réduction du poids corporel, effets sur le foie, le cœur, les poumons ou les reins, etc.) ou d'autres modifications susceptibles de ne pas constituer une réponse toxique (par exemple diminution de la prise de nourriture, grossissement du foie), les effets observés sur les paramètres neurologiques, endocriniens ou liés au système immunitaire, devront être interprétés avec précaution.

Essai limite

21. Si un essai pratiqué avec une seule dose d'au moins 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, ou, pour une administration par le biais de la nourriture ou de l'eau, d'un pourcentage équivalent de cette nourriture ou de cette eau (en fonction de la détermination du poids corporel), en suivant le mode opératoire décrit pour cette étude, ne produit aucun effet toxique observable et s'il n'y a pas de raison de penser que la substance soit toxique compte tenu des données dont on dispose au sujet de substances ayant une structure analogue, on peut considérer qu'il n'est pas nécessaire de réaliser une étude complète avec trois niveaux de dose. L'essai limite s'applique, sauf lorsque les données d'exposition humaine indiquent la nécessité d'utiliser une dose plus élevée.

Administration des doses

22. La substance d'essai est administrée aux animaux quotidiennement, sept jours sur sept, sur une période de 28 jours. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, les animaux doivent recevoir une dose unique, introduite au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Ce volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où il peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Exception faite des substances irritantes ou corrosives, qui provoqueront normalement des effets exacerbés aux concentrations plus élevées, il convient de réduire au minimum la variabilité du volume d'essai en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à toutes les doses.
23. Si la substance d'essai est administrée dans les aliments ou l'eau de boisson, il importe de s'assurer que sa quantité n'interfère ni avec la nutrition normale ni avec l'équilibre hydrique. Lorsque la substance d'essai est incorporée aux aliments, deux possibilités sont offertes: soit le maintien d'une concentration constante dans les aliments (ppm), soit le maintien d'un niveau de dose constant par rapport au poids corporel des animaux; il y a lieu de préciser l'option choisie. Si la substance est administrée par gavage, la dose doit être administrée à la même heure chaque jour et ajustée si nécessaire pour rester constante par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'une étude à doses répétées sert de d'étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme, il faut appliquer le même régime alimentaire dans les deux études.

Observations

24. La période d'observation doit durer 28 jours. Les animaux d'un groupe satellite destinés à des observations ultérieures ne doivent recevoir aucun traitement pendant au moins 14 jours en vue de détecter d'éventuels effets toxiques différés ou persistants, ou de mettre en évidence le rétablissement des animaux traités.
25. Les animaux doivent faire l'objet d'un examen clinique général au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets prévus devraient être les plus marqués après l'administration. L'état de santé des animaux doit être consigné. Au moins deux fois par jour, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité.

26. Tous les animaux doivent faire l'objet d'un examen clinique détaillé, une fois avant la première exposition (pour pouvoir effectuer des comparaisons sur un même individu), et ensuite au moins une fois par semaine. Ces observations doivent être effectuées hors de la cage habituelle, sur une aire standard, de préférence toujours au même moment de la journée. Elles doivent être soigneusement consignées, de préférence en utilisant un système de cotation, explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Il faudrait s'efforcer de minimiser les variations des conditions d'essai et prendre les dispositions nécessaires pour que les examens soient effectués par des observateurs n'ayant pas connaissance du traitement. Les symptômes relevés devraient couvrir les observations suivantes (sans que cette liste soit exhaustive): modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions, et de réactions neuro-végétatives (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, dimension de la pupille, respiration anormale). Il convient également de consigner les changements dans la démarche, la posture et les réactions à la manipulation ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, des comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou comportements bizarres (par exemple, automutilation, marche à reculons) (2).
27. Lors de la quatrième semaine d'exposition, il faut vérifier la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (2) (stimuli auditifs, visuels et proprioceptifs, par exemple) (3) (4) (5), et évaluer la force de préhension (6) et l'activité motrice (7). On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. Toutefois, on peut également utiliser d'autres modes opératoires que ceux qui figurent dans les références.
28. Les observations fonctionnelles réalisées au cours de la quatrième semaine d'exposition peuvent être omises lorsque l'essai sert d'étude préliminaire à une étude subchronique ultérieure (90 jours). Dans ce cas, les observations fonctionnelles devront être menées au cours de la seconde étude. Cela étant, les données tirées des observations fonctionnelles de l'étude à doses répétées peuvent faciliter la sélection des doses retenues pour l'étude subchronique ultérieure.
29. À titre exceptionnel, les observations fonctionnelles peuvent aussi être omises pour des groupes qui par ailleurs présentent des symptômes de toxicité à un degré tel qu'ils interféreraient sensiblement avec le déroulement de l'essai fonctionnel.
30. Lors de l'autopsie, le cycle œstral de l'ensemble des femelles peut être déterminé (facultatif) par frottis vaginal. Ces observations fourniront des informations sur le stade du cycle œstral atteint au moment de l'euthanasie et faciliteront l'évaluation histologique des tissus sensibles aux œstrogènes [voir le guide d'orientations sur l'histopathologie (19)].

Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau

31. Tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. La consommation de nourriture doit également être mesurée au moins une fois par semaine. Si la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la consommation d'eau doit aussi être mesurée au moins une fois par semaine.

Hématologie

32. À la fin de la période d'essai, il faut procéder aux examens hématologiques suivants: hématocrite, concentration d'hémoglobine, numération des érythrocytes, reticulocytes, numération et formule leucocytaire, numération des plaquettes et mesure du temps et potentiel de coagulation. D'autres analyses devant être menées si la substance d'essai ou ses métabolites supposés ont ou sont susceptibles d'avoir des propriétés oxydantes portent notamment sur la concentration de méthémoglobine et les corps de Heinz.
33. Des échantillons de sang doivent être prélevés à un endroit spécifié juste avant ou pendant la procédure d'euthanasie des animaux, et stockés dans des conditions appropriées. Les animaux doivent avoir jeûné la nuit précédant l'euthanasie⁽¹⁾.

Biochimie clinique

34. Les analyses de biochimie clinique destinées à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur le rein et le foie, devraient être pratiquées sur des échantillons de sang prélevés sur tous les animaux juste avant ou pendant leur euthanasie (à l'exception des animaux trouvés moribonds et/ou euthanasiés avant la fin de l'essai). Les analyses du plasma ou du sérum doivent porter sur le sodium, le potassium, le glucose, le cholestérol total, l'urée, la créatinine, la concentration totale de protéines et d'albumine, au moins deux enzymes indicatrices des effets hépatocellulaires (telles que l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatase alcaline, la gamma glutamyl transpeptidase et la glutamate déshydrogénase), ainsi que sur les acides biliaires. Le dosage d'autres enzymes (d'origine hépatique ou autre) et de la bilirubine, peut fournir des informations utiles dans certaines circonstances.
35. À titre facultatif, on peut effectuer les analyses d'urine suivantes au cours de la dernière semaine de l'étude sur des échantillons d'urine prélevés à des moments déterminés: apparence, volume, osmolalité ou poids spécifique, pH, protéines, glucose, sang et cellules sanguines.

⁽¹⁾ Il est préférable de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang pour un certain nombre de dosages dans le sérum et le plasma, surtout pour le dosage du glucose. Cette recommandation est principalement motivée par l'accroissement de variabilité qui découlerait inévitablement d'une non-observation du jeûne et qui tendrait à masquer des effets plus subtils, rendant de ce fait l'interprétation des résultats plus difficile. En revanche, l'observation du jeûne durant une nuit entière risque de perturber le métabolisme général des animaux et, notamment lors d'études où la substance d'essai est administrée dans la nourriture, risque de perturber l'exposition quotidienne à la substance d'essai. Si la pratique du jeûne durant la nuit est adoptée, les analyses de biochimie clinique doivent être réalisées après les observations fonctionnelles faites au cours de la quatrième semaine de l'étude.

36. Il faudrait envisager par ailleurs de rechercher dans le plasma ou le sérum des marqueurs de lésions générales des tissus. Si les propriétés connues de la substance d'essai risquent ou sont soupçonnées d'affecter certaines voies métaboliques, on devrait procéder à d'autres analyses, notamment celles du calcium, du phosphate, des triglycérides, d'hormones spécifiques et de la cholinestérase. La nécessité de ces analyses doit être déterminée pour certaines classes de produits chimiques ou au cas par cas.
37. Bien que l'évaluation internationale des paramètres liés au système endocrinien n'ait pas pu établir de façon claire l'intérêt de l'analyse des hormones thyroïdiennes (T3, T4) et de la TSH, il peut être utile de conserver des échantillons de plasma ou de sérum pour mesurer la T3, la T4 et la TSH (facultatif) s'il semble qu'un effet sur l'axe hypophyso-thyroïdien puisse exister. Ces échantillons pourront être congelés à - 20 °C pour être stockés. Les facteurs suivants peuvent influencer la variabilité et les concentrations absolues lors de l'analyse hormonale:
- moment de l'euthanasie, en raison de la variation diurne des concentrations hormonales,
 - méthode d'euthanasie, évitant de stresser inutilement les animaux, ce qui pourrait affecter leurs concentrations hormonales,
 - kits d'analyse hormonale pouvant différer par leurs courbes standards.
- L'identification définitive des substances chimiques actives sur le système thyroïdien s'appuiera de manière plus fiable sur l'analyse histopathologique que sur les niveaux hormonaux.
38. Les échantillons de plasma destinés spécifiquement à l'analyse hormonale doivent être prélevés aux mêmes heures de la journée. Il est recommandé de prendre en considération les taux de T3, T4 et TSH provoqués par des altérations de l'histopathologie de la thyroïde. Les valeurs numériques obtenues lors de l'analyse des concentrations hormonales diffèrent selon les kits d'essai du commerce utilisés. Il peut ainsi ne pas être possible de fournir des critères de performance fondés sur des données historiques homogènes. Pour pallier cet inconvénient, les laboratoires s'efforceront de maintenir les coefficients de variation en dessous de 25 pour la T3 et pour la T4 et de 35 pour la TSH. Toutes les concentrations doivent être exprimées en ng/ml.
39. Si les données de référence historiques sont inappropriées, il conviendra de prendre en compte les variables d'hématologie et de biochimie clinique avant le début du dosage ou de préférence sur un groupe d'animaux distincts des groupes d'essai.

PATHOLOGIE

Autopsie générale

40. Tous les animaux utilisés dans l'étude feront l'objet d'une autopsie générale, complète et détaillée, qui comporte un examen approfondi de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie, les reins, les glandes surrénales, les testicules, les épididymes, l'ensemble formé par la prostate, les vésicules séminales et les glandes coagulantes, le thymus, la rate, le cerveau et le cœur de tous les animaux (à l'exception des animaux moribonds et/ou euthanasiés avant la fin de l'essai) doivent être débarrassés, le cas échéant, de tout tissu adhérent et pesés à l'état frais dès que possible après la dissection, afin d'éviter leur dessiccation. Il convient d'enlever très soigneusement les tissus adhérents de l'ensemble de la prostate, de façon à éviter toute ponction de la vésicule séminale remplies de liquide. Une alternative consistera à débarrasser la vésicule séminale et la prostate des tissus adhérents et de les peser après fixation.
41. De manière facultative, deux autres organes peuvent aussi être pesés dès que possible après la dissection, afin d'éviter leur dessiccation: les deux ovaires (poids frais) et l'utérus, y compris le col de l'utérus [des orientations sur l'ablation et la préparation des tissus utérins pour leur pesée sont données par la ligne directrice 440 de l'OCDE (18)].
42. Le poids de la thyroïde (facultatif) peut être déterminé après la fixation. L'élimination des tissus adhérents doit également s'opérer avec beaucoup de soin et seulement après la fixation pour éviter d'abîmer les tissus, et par là de compromettre l'analyse d'histopathologie.
43. Les tissus suivants doivent être conservés dans le milieu de fixation le plus approprié compte tenu à la fois du type de tissu et des examens histopathologiques prévus (voir paragraphe 47): toutes les lésions macroscopiques, l'encéphale (les régions représentatives du cerveau comprenant les hémisphères cérébraux, le cervelet et la protubérance annulaire), la moelle épinière, les yeux, l'estomac, l'intestin grêle, le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, les reins, les glandes surrénales, la rate, le cœur, le thymus, la thyroïde, la trachée et les poumons (préservés par injection de fixateur, puis immergés), les gonades (testicules et ovaires), les organes génitaux auxiliaires (utérus et col de l'utérus, épididymes, prostate + vésicules séminales et glandes coagulantes), le vagin, la vessie, les ganglions lymphatiques [le ganglion lymphatique le plus proximal et un autre, en fonction de l'expérience du laboratoire (15)], un nerf périphérique (sciatique ou poplitée interne), de préférence tout près du muscle, un muscle squelettique et un os, avec la moelle osseuse (coupe ou à défaut une ponction examinée immédiatement). Il est recommandé de fixer les testicules par immersion dans un fixateur de Bouin ou de Davidson modifié (16) (17). L'albuginée du testicule doit être ponctionnée délicatement et superficiellement aux deux pôles de l'organe avec une aiguille pour permettre la pénétration rapide du fixateur. Les résultats des observations cliniques et autres peuvent conduire à l'examen de tissus supplémentaires. En outre, il y a lieu de conserver tout organe qui pourrait être considéré comme un organe cible possible, eu égard aux propriétés connues de la substance d'essai.

44. Les tissus suivants peuvent apporter des informations utiles sur les effets endocriniens: gonades (ovaires et testicules), organes génitaux auxiliaires (utérus et col de l'utérus, épидидymes, vésicules séminales et glande coagulante, prostate dorsolatérale et ventrale), vagin, hypophyse, glande mammaire mâle, glande thyroïdienne et glande surrénale. Les changements survenant dans les glandes mammaires mâles n'ont pas encore été insuffisamment documentés, mais ce paramètre peut s'avérer très sensible aux substances à action œstrogénique. L'observation des organes/tissus non cités au paragraphe 43 est facultative (voir appendice 2).
45. Le document d'orientation sur l'histopathologie (19) fournit des informations supplémentaires sur la dissection, la fixation, le prélèvement et l'histopathologie des tissus endocriniens.
46. Au cours du programme d'essais international, des éléments de preuve ont été apportés montrant que des effets subtils sur le système endocrinien de substances chimiques susceptibles de faiblement déséquilibrer l'homéostasie des hormones sexuelles peuvent être identifiés par leur capacité à perturber la synchronisation du cycle œstral dans différents tissus plutôt que par une nette altération histopathologique des organes sexuels femelles. Bien qu'aucune preuve définitive n'ait été apportée sur ces effets, il est recommandé que les preuves d'une asynchronie possible du cycle oestral soient prises en compte dans l'interprétation de l'examen histopathologique des ovaires (cellules folliculaires, thécales et de la granulosa), de l'utérus, du col de l'utérus et du vagin. Si elle est évaluée (facultatif), la période du cycle déterminée par les frottis vaginaux peut également être incluse dans cette comparaison.

Histopathologie

47. Un examen histopathologique complet doit être pratiqué sur les tissus et organes conservés de tous les animaux appartenant au groupe témoin et au groupe traité à la dose la plus élevée. Ces examens devront être étendus aux animaux de tous les autres groupes de dosage dès lors qu'on observe des modifications liées au traitement dans le groupe traité à la dose la plus élevée.
48. Toutes les lésions macroscopiques seront examinées.
49. Si un groupe satellite est inclus, les tissus et organes sur lesquels des effets ont été observés dans les groupes traités doivent faire l'objet d'un examen histopathologique.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

50. Il faut présenter les résultats correspondant à chaque animal. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux faisant apparaître, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou de l'euthanasie, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, et une description des ces signes, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions, leur gravité et le pourcentage d'animaux affecté par chaque type de lésion.
51. Dans la mesure du possible, les résultats numériques devraient être évalués par une méthode statistique appropriée et largement reconnue. La comparaison des effets au sein d'une même fourchette de dosage devrait éviter d'avoir à recourir à des tests de t multiples. Les méthodes statistiques devront être sélectionnées au stade de la conception de l'étude.
52. À des fins de contrôle de la qualité, il est suggéré de recueillir des données de contrôle historiques et de calculer les coefficients de variation pour les données numériques, en particulier pour les paramètres liés à la détection des perturbateurs endocriniens. Ces données peuvent être utilisées à des fins comparatives lorsque des études réelles sont évaluées.

Rapport d'essai

53. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

Substance d'essai:

- état physique, pureté et propriétés physico-chimiques,
- données permettant l'identification chimique.

Véhicule, le cas échéant:

- justification du choix du véhicule, s'il est autre que l'eau.

Animaux d'essai:

- espèce/souche utilisée,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai,
- justification du choix de l'espèce s'il ne s'agit pas de rat.

Conditions d'essai:

- justification du choix des doses,
- description détaillée de la préparation de la substance à tester et/ou de son incorporation dans la nourriture, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,
- détails relatifs à l'administration de la substance d'essai,
- conversion de la concentration de la substance d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (en ppm) en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu,
- détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau.

Paramètres optionnels étudiés:

- liste des paramètres facultatifs étudiés.

Résultats:

- poids corporel/variation du poids corporel,
- consommation de nourriture et d'eau, le cas échéant,
- données sur la réponse toxique par sexe et par dose et description des symptômes de toxicité,
- nature, gravité et durée des observations cliniques (réversibles ou non),
- évaluations de l'activité sensorielle, de la force de préhension et de l'activité motrice,
- analyses de sang et valeurs normales de référence,
- analyses de biochimie clinique et valeurs normales de référence,
- poids corporel lors de l'euthanasie et poids des organes,
- résultats d'autopsie,
- description détaillée de tous les résultats des examens histopathologiques,
- données relatives à l'absorption, si elles sont disponibles,
- traitement statistique des résultats, s'il y a lieu.

*Discussion des résultats**Conclusions*

Appendice 1

DÉFINITIONS

Activité antiandrogénique: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un mammifère.

Activité antiœstrogénique: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone œstrogénique naturelle (par exemple l'œstradiol 17β) chez un mammifère.

Activité antithyroïdienne: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple la T3) chez un mammifère.

Activité thyroïdienne: capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple la T3) chez un mammifère.

Androgénicité: capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un mammifère.

CSENO: sigle pour "concentration (maximale) sans effet nocif observé", c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif lié au traitement n'est observé.

Dosage: terme général recouvrant la dose, sa fréquence et la durée de l'administration

Dose: quantité de substance d'essai administrée. La dose est exprimée en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience par jour (par exemple en mg/kg de poids corporel/jour), ou en concentration constante dans la nourriture.

Œstrogénicité: capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone œstrogénique naturelle (par exemple l'œstradiol 17β) chez un mammifère.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Toxicité manifeste: terme général désignant des signes évidents de toxicité qui surviennent à la suite de l'administration d'une substance d'essai. Ces signes doivent être suffisants pour permettre l'évaluation des dangers et doivent être tels qu'on puisse s'attendre à ce qu'une augmentation de la dose administrée entraîne l'apparition de signes de toxicité grave et probablement la mort.

Validation: processus scientifique destiné à caractériser les impératifs opérationnels et les limites d'une méthode d'essai et à démontrer sa fiabilité et sa pertinence pour un objectif particulier.

Appendice 2

Paramètres recommandés dans la méthode d'essai B.7 pour la détection des perturbateurs endocriniens

Paramètres obligatoires	Paramètres facultatifs
Poids	
— Testicules — Épидidymes — Glandes surrénales — Prostate + vésicules séminales et glandes coagulantes	— Ovaires — Utérus, y compris col de l'utérus — Thyroïde
Histopathologie	
— Gonades: — Testicules et — Ovaires — Organes sexuels auxiliaires: — Épидidymes, — Prostate + vésicules séminales et glandes coagulantes — Utérus, y compris col de l'utérus — Glandes surrénales — Thyroïde — Vagin	— Frottis vaginaux — Glandes mammaires mâles — Hypophyse
Dosages hormonaux	
	— Niveaux circulants de T3 et de T4 — Niveaux circulants de TSH

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) OCDE (Paris, 1992). Rapport du président de la réunion du groupe de travail ad hoc d'experts sur la neurotoxicité systémique à court terme (et différée).
- (2) PISC (1986). Principes et méthodes de la neurotoxicité liée à l'exposition aux produits chimiques. Critères d'hygiène de l'environnement n° 60.
- (3) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.
- (4) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol Environ. Health* 9: 691-704.
- (5) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.
- (6) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.
- (7) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.
- (8) OCDE (1998). Rapport de la première réunion du Groupe d'étude sur les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens, 10 et 11 mars 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (9) OCDE (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

- (10) OCDE (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.
- (11) OCDE (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html
- (12) OCDE (2006). Compte rendu final de la réunion du Groupe de gestion de la validation pour les essais sur les mammifères. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.
- (13) OCDE. Projet de compte rendu du Groupe d'étude sur les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.
- (14) OCDE (2000) Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (15) Haley P., Perry R., Ennulat D., Frame S., Johnson C., Lapointe J.-M., Nyska A., Snyder P.W., Walker D. et Walter G. (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.
- (16) Hess R.A., Moore B.J. (1993) Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, p. 52-85.
- (17) Latendresse J.R., Warbritton A.R., Jonassen H., Creasy D.M. (2002). Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.
- (18) OCDE (2007). Ligne directrice pour les essais de produits chimiques de l'OCDE n° 440: Bio-essai utérotrophique chez les rongeurs: Essai de dépistage à court terme des propriétés œstrogéniques.
- (19) OCDE. (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

B.8. TOXICITÉ SUBAIGUË PAR INHALATION: ÉTUDE SUR 28 JOURS

RÉSUMÉ

La présente méthode d'essai B.8 révisée a été conçue afin de caractériser pleinement la toxicité par inhalation de la substance d'essai, à la suite d'une exposition répétée sur une période de temps limitée (28 jours), et de fournir des données pour les estimations quantitatives des risques liés à l'inhalation. Des groupes de rongeurs, composés d'au minimum 5 mâles et 5 femelles, sont exposés 6 heures par jour, pendant 28 jours: a) à la substance d'essai à trois niveaux de concentration ou plus, b) à de l'air filtré (témoin négatif), et/ou c) au véhicule (groupe témoin du véhicule). Les animaux sont exposés en général 5 jours par semaine, mais il est aussi permis de les exposer 7 jours par semaine. Des mâles et des femelles sont toujours utilisés, mais peuvent être exposés à des niveaux de concentration différents si l'un des sexes est connu pour être plus sensible à une substance d'essai donnée. Afin de mieux caractériser la toxicité de la substance d'essai, la présente méthode d'essai laisse la possibilité au directeur de l'étude d'inclure des groupes satellites (réversibilité), des lavages broncho-alvéolaires (LBA), des tests neurologiques et des évaluations histopathologiques ou de pathologie clinique supplémentaires.

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 412 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Le texte original de la ligne directrice 412 sur la toxicité subaiguë par inhalation avait été adopté en 1981 (1). La présente méthode d'essai B.8 (équivalente à la ligne directrice 412) a été révisée pour prendre en compte l'état de la science et répondre aux exigences réglementaires actuelles et futures.
2. La présente méthode permet de caractériser les effets nocifs résultant d'une exposition quotidienne répétée, par inhalation, à une substance d'essai pendant 28 jours. Les données issues d'une étude sur la toxicité subaiguë par inhalation sur 28 jours peuvent être utilisées pour des estimations quantitatives de risques (si l'étude n'est pas suivie d'un essai de toxicité subchronique par inhalation sur une période de 90 jours, voir chapitre B.29 de la présente annexe). Ces données peuvent également fournir des informations permettant la détermination des concentrations pour des études à plus long terme comme l'essai de toxicité subchronique par inhalation sur une période de 90 jours. La présente méthode d'essai n'est pas spécifiquement destinée à tester les nanomatériaux. Le document d'orientation n° 39 (2) regroupe les définitions utilisées dans le contexte de cette méthode d'essai.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

3. Avant toute étude, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai afin d'améliorer la qualité de l'étude et de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination des concentrations d'essai appropriées, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les résultats de tous les essais de toxicité in vitro ou in vivo auxquels elle a été soumise; son (ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées; ainsi que les données issues des essais de toxicité aiguë par inhalation. En cas de neurotoxicité, connue ou observée au cours de l'étude, le directeur de l'étude pourra décider d'inclure les évaluations jugées nécessaires, comme une batterie d'observations fonctionnelles (FOB) et des mesures de l'activité motrice. Bien que la durée des expositions par rapport à des examens spécifiques puisse être critique, l'exécution de ces activités supplémentaires n'interfère pas avec la conception de l'étude principale.
4. Les dilutions de substances corrosives ou irritantes peuvent être testées à des concentrations qui permettront d'atteindre le degré de toxicité désiré, voir document d'orientation 39 (2). Lors de l'exposition des animaux à ces substances, les concentrations cibles sont assez faibles pour ne causer ni souffrance manifeste ni détresse, mais suffisantes pour prolonger la courbe concentration-réponse jusqu'à des niveaux correspondant à l'objectif scientifique et réglementaire de l'essai. Le choix de ces concentrations est fait au cas par cas, de préférence sur la base d'une étude préliminaire de détermination des concentrations, conçue de façon appropriée, et qui fournit des informations sur l'effet critique mesuré, un éventuel seuil d'irritation et le moment de son apparition (voir paragraphes 11-13). La justification du choix des concentrations est fournie.
5. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés. Les animaux moribonds sont pris en compte au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (3) détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sélection des espèces animales

6. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs adultes en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

7. Les femelles sont nullipares et non gravides. Le jour de la randomisation, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 7 à 9 semaines. Leur poids corporel ne devra pas excéder $\pm 20\%$ du poids moyen pour chaque sexe. Sélectionnés au hasard, les animaux seront marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, ils seront conservés dans leur cage pour une période d'au minimum 5 jours avant le début de l'essai.

Conditions d'élevage des animaux

8. Les animaux sont identifiés de façon individuelle, de préférence à l'aide de dispositifs sous-cutanés, afin de faciliter leur observation et d'éviter toute confusion. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est maintenue à $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne fait pas obstacle à une observation précise de chaque animal, et n'engendrer qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés "nez seul", il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne provoquent pas chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable, alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés "corps entier" à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour les empêcher de filtrer l'aérosol d'essai grâce à la fourrure de leurs congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

Chambres d'inhalation

9. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de la substance d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition "nez seul" (qui inclut les dispositifs "tête seule", "nez seul" et "museau seul") est privilégié. Le mode d'exposition "nez seul" est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition "corps entier" peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais cela est justifié dans le rapport de l'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition "corps entier", on veillera à ce que le "volume" total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (2) décrit les principes des techniques d'exposition "corps entier" ou "nez seul", ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques.

ÉTUDES DE TOXICITÉ

Concentrations limites

10. Contrairement aux études de toxicité aiguë, aucune concentration limite n'est définie pour les études de toxicité subaiguë par inhalation sur 28 jours. La concentration maximale testée prend en compte: 1) la concentration maximale pouvant être atteinte, 2) le niveau d'exposition humaine correspondant au "pire des cas", 3) la nécessité de maintenir une alimentation adéquate en oxygène, et/ou 4) le bien-être des animaux. En l'absence de limites fondées sur des données, les valeurs limites pour la toxicité aiguë du règlement (CE) n° 1272/2008 (13) peuvent être utilisées (c'est-à-dire jusqu'à une concentration maximale de 5 mg/l pour les aérosols, 20 mg/l pour les vapeurs et 20 000 ppm pour les gaz); voir document d'orientation 39 (2). S'il est nécessaire de dépasser ces limites lors d'essais de gaz ou de substances d'essai hautement volatiles (comme les réfrigérants), une justification est produite. La concentration limite permet d'obtenir une toxicité sans équivoque, sans causer de stress excessif chez les animaux ni affecter leur longévité (3).

Étude préliminaire de détermination des concentrations

11. Avant le début de l'étude principale, une étude préliminaire de détermination des concentrations peut s'avérer nécessaire. Plus complète qu'une étude d'observation, elle n'est pas limitée au choix des concentrations. Les connaissances acquises grâce à une étude préliminaire de détermination des concentrations peuvent conduire à la réussite de l'étude principale. En effet, une telle étude peut fournir des informations techniques sur les méthodes d'analyse, la taille des particules, la découverte de mécanismes de toxicité, les données histopathologiques et de pathologie clinique, et les estimations de la concentration sans effet nocif observé (CSENO) et de la concentration maximale acceptable (CMA) dans une étude principale. Le directeur d'étude peut décider de s'appuyer sur une étude préliminaire de détermination des concentrations pour identifier: le seuil d'irritation de l'appareil respiratoire (par exemple avec une histopathologie de l'appareil respiratoire, des tests de la fonction pulmonaire ou des lavages bronchoalvéolaires), la concentration la plus élevée tolérée par les animaux sans provoquer de stress excessif, et les paramètres qui permettront de caractériser au mieux la toxicité de la substance d'essai.
12. Une étude préliminaire de détermination des concentrations peut comporter un ou plusieurs niveaux de concentration. Pour chaque niveau de concentration, on exposera au maximum trois mâles et trois femelles. La durée d'une étude préliminaire de détermination des concentrations est d'au minimum 5 jours et ne pas excéder 14 jours en général. Il convient d'exposer dans le rapport d'étude les raisons du choix des concentrations retenues pour l'étude principale, dont l'objet est de démontrer une relation concentration-réponse basée sur l'effet mesuré le plus sensible auquel on s'attend. La concentration la plus faible n'engendre en principe aucune manifestation de toxicité, tandis que la concentration la plus élevée permet d'obtenir une toxicité sans équivoque, sans causer de stress excessif chez les animaux ni affecter leur longévité (3).
13. Lors du choix des niveaux de concentration pour l'étude préliminaire de détermination des concentrations, toutes les informations disponibles sont prises en compte, y compris les relations structure-activité et les données correspondant à des produits chimiques analogues (voir paragraphe 3). Une étude préliminaire de détermination des concentrations peut confirmer ou réfuter le choix des effets mesurés les plus sensibles selon des critères mécanistiques, comme l'inhibition de la cholinestérase par des composés organophosphorés, la formation de méthémoglobine par des agents cytotoxiques d'isomérisation érythro, les hormones thyroïdiennes (T3, T4) dans le cas de thyrotoxiques, les protéines, la LDH, ou les neutrophiles dans les lavages bronchoalvéolaires dans le cas de particules inoffensives faiblement solubles ou d'aérosols irritants pour les poumons.

Étude principale

14. L'étude principale de toxicité subaiguë comporte en général trois niveaux de concentration ainsi qu'un témoin négatif (air) et/ou un témoin du véhicule, s'il y a lieu (voir paragraphe 17). L'ensemble des informations disponibles doit permettre de déterminer les niveaux d'exposition appropriés, y compris les résultats des études systémiques de toxicité, le métabolisme et la cinétique (on prendra garde d'éviter les niveaux de concentration élevée avec des processus cinétiques de saturation). Chaque groupe d'essai comprend au moins 10 rongeurs (5 mâles et 5 femelles) exposés à la substance d'essai 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 4 semaines (soit une durée totale de l'étude de 28 jours). Les animaux peuvent aussi être exposés 7 jours par semaine (par exemple dans le cas d'essais sur des produits pharmaceutiques inhalés). S'il est connu qu'un des sexes est plus réactif à la substance d'essai, les niveaux de concentration peuvent différer selon le sexe afin d'optimiser la concentration-réponse telle que décrite au paragraphe 15. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées "nez seul", il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Lorsque la durée d'exposition est inférieure à 6 heures par jour ou qu'il est nécessaire de mener une étude d'exposition "corps entier" de longue durée (par exemple de 22 heures par jour), des justifications sont fournies, voir document d'orientation 39 (2). Les animaux sont privés de nourriture pendant l'exposition sauf si sa durée dépasse 6 heures. Dans une exposition "corps entier", les animaux peuvent boire de l'eau.
15. Les concentrations cibles choisies permettent d'identifier le(s) organe(s) cible(s) et de mettre en évidence une concentration-réponse claire:
 - le niveau de concentration élevé produit des effets toxiques sans engendrer de signes persistants ou la mort, ce qui empêcherait une évaluation valable des résultats,
 - le(s) niveau(x) de concentration intermédiaire(s) doit(vent) être espacé(s) de manière à produire une gradation dans les effets toxiques observés avec une concentration faible et avec une concentration élevée,
 - le niveau de concentration faible ne produit quasiment aucune manifestation de toxicité.

Étude satellite (étude de réversibilité)

16. Une étude de réversibilité peut être utilisée pour mettre en évidence le caractère réversible, persistant ou retardé de la toxicité, pour une période post-traitement d'une durée appropriée d'au minimum 14 jours. Les groupes satellites sont constitués de cinq mâles et de cinq femelles exposés en même temps que les animaux d'expérience de l'étude principale. Ils sont exposés à la concentration la plus élevée de la substance d'essai. Il convient également de faire appel à un témoin concurrent (air) et, le cas échéant, à un témoin du véhicule (voir paragraphe 17).

Animaux témoins

17. Les animaux du groupe témoin négatif (air) sont traités d'une manière identique à ceux du groupe d'animaux d'essai, mais au lieu de la substance d'essai, ils sont exposés à de l'air filtré. Lorsque de l'eau ou une autre substance est utilisée pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est inclus dans l'étude, à la place du groupe témoin négatif exposé à l'air seulement. Autant que possible, l'eau est le véhicule utilisé. Dans ce cas, les animaux témoins sont exposés à un air dont le taux d'humidité relative est le même que pour les groupes exposés à la substance d'essai. Le choix du véhicule s'opère sur la base d'une étude préliminaire appropriée ou de données historiques. Si la toxicité d'un véhicule est mal connue, le directeur de l'étude peut choisir d'utiliser un témoin négatif (air) et un témoin du véhicule, mais cela est toutefois fortement déconseillé. Si les données historiques montrent qu'un véhicule n'est pas toxique, le groupe témoin à l'air n'est pas nécessaire et seul un témoin du véhicule est utilisé. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude préliminaire d'une substance d'essai préparée dans un véhicule, ce véhicule est considéré comme non toxique à la concentration testée et ce véhicule témoin est utilisé.

CONDITIONS D'EXPOSITION**Administration des concentrations**

18. Les animaux sont exposés à la substance d'essai présenté sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou d'un mélange des deux. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, de la concentration choisie, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion. Les substances particulières peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin de réduire la taille des particules. Pour plus d'informations, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Répartition granulométrique

19. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles de se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser (4) des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 3 μm , avec un écart type géométrique (σ_g) compris entre 1,5 et 3,0. Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques peuvent avoir une taille inférieure à cette norme, et les particules chargées ou les fibres une taille supérieure.

Préparation de la substance d'essai dans un véhicule

20. La substance d'essai est idéalement testée sans véhicule. S'il est nécessaire d'avoir recours à un véhicule pour atteindre la concentration et la taille particulaire voulues de la substance d'essai, l'eau est choisie de préférence. Chaque fois qu'une substance d'essai est dissoute dans un véhicule, sa stabilité est démontrée.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION**Débit d'air dans la chambre d'exposition**

21. Le débit d'air dans la chambre d'exposition est contrôlé avec soin, surveillé en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi en temps réel de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les paramètres d'inhalation dynamiques pertinents. Si la concentration est suivie en temps réel, la fréquence peut être ramenée à une seule mesure du débit de l'air par exposition et par jour. Un soin particulier est apporté à éviter toute rerespiration dans les chambres d'exposition "nez seul". La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasse pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées. Si les mesures du premier jour d'exposition montrent que la concentration de ces gaz est appropriée, aucune mesure complémentaire ne devrait être nécessaire.

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

22. La température de la chambre d'exposition est maintenue à 22 ± 3 °C. Dans les cas d'exposition "nez seul" et "corps entier", l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est autant que possible surveillée en continu et enregistrée toutes les heures pendant chaque exposition. L'humidité relative est de préférence comprise entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple lorsque la substance d'essai se présente sous forme de solution aqueuse), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences de la substance d'essai avec la méthode d'essai.

Substance d'essai: concentration nominale

23. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de la substance d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai: concentration réelle

24. La concentration réelle est la concentration de la substance d'essai prélevée dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à la substance d'essai sont également effectuées par une pré-étude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre le produit à tester (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie.
25. Pendant toute la durée de l'étude, il est recommandé de n'employer si possible qu'un seul lot de la substance d'essai, et l'échantillon de la substance est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il conviendrait de réaliser une caractérisation de la substance d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes: temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de la substance d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).
26. L'atmosphère d'exposition est maintenue constante autant que possible. Un dispositif de suivi en temps réel, tel qu'un photomètre à aérosol pour les aérosols ou un analyseur d'hydrocarbures totaux pour les vapeurs, peut être utilisé pour démontrer la stabilité des conditions d'exposition. La concentration réelle dans la chambre est mesurée au moins 3 fois chaque jour d'exposition et pour chaque niveau d'exposition. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, l'utilisation d'un échantillon par période d'exposition est acceptée. En principe, cet échantillon est alors recueilli pendant la totalité de la période d'exposition. Les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas $\pm 10\%$ pour les gaz et vapeurs et $\pm 20\%$ pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de la substance d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition (t_{95}) et leur déclin. Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (2).
27. Pour des systèmes très complexes constitués de gaz ou de vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion et substances d'essai propulsées à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisira donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général la principale substance active du mélange. Quand la substance d'essai est un mélange, la concentration analytique devra être indiquée pour le mélange global et pas uniquement pour le principe actif ou la substance indicatrice (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Substance d'essai: répartition granulométrique

28. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum chaque semaine pour chaque niveau de concentration, à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques (APS). Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade et l'autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude.
29. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, voir document d'orientation 39 (2). Si pour toutes les concentrations testées, cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au minimum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter l'essai.
30. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes.

OBSERVATIONS

31. Un examen clinique attentif des animaux est pratiqué avant, pendant, et après la période d'exposition. Des observations plus fréquentes peuvent être réalisées en fonction de la réponse des animaux pendant l'exposition. Lorsque l'observation des animaux s'avère difficile en raison des tubes de contention, du mauvais éclairage des chambres d'exposition "corps entier" ou d'atmosphères opaques, les animaux seront observés attentivement après l'exposition. Les observations effectuées avant l'exposition du lendemain peuvent permettre d'estimer une éventuelle réversibilité ou exacerbation des effets toxiques.
32. Toutes les observations sont enregistrées individuellement pour chaque animal. Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.
33. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux, ainsi que de l'activité somatomotrice et du comportement. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma retiennent l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement. Il est possible d'enrichir le protocole d'étude par des estimations complémentaires telles que: cinétique, surveillance biologique, fonction pulmonaire, rétention de produits peu solubles qui s'accumulent dans les tissus pulmonaires et changements comportementaux.

POIDS CORPOREL

34. Le poids de chacun des animaux est enregistré individuellement: juste avant la première exposition (jour 0), deux fois par semaine par la suite (par exemple les vendredis et lundis, afin de mettre en évidence leur rétablissement après un week-end sans exposition, ou dans un délai permettant l'évaluation de la toxicité systémique), et au moment de leur mort ou de leur euthanasie. Si aucun effet n'est observé les 2 premières semaines, le poids corporel peut n'être mesuré qu'une fois par semaine pendant le reste de l'étude. Les animaux du groupe satellite (étude de réversibilité) sont toujours pesés de façon hebdomadaire tout au long de la période de récupération. Au terme de l'étude, tous les animaux sont pesés juste avant leur sacrifice pour ne pas fausser le calcul des rapports du poids des organes au poids du corps.

CONSOMMATION D'EAU ET DE NOURRITURE

35. La quantité de nourriture consommée est mesurée une fois par semaine. La consommation d'eau peut également l'être.

PATHOLOGIE CLINIQUE

36. Tous les animaux, y compris ceux des groupes témoins et satellites, quand ils sont sacrifiés, subissent des examens cliniques. Le délai entre la fin de l'exposition et la prise de sang est enregistré, en particulier quand la reconstitution de l'effet visé est rapide. À la fin de l'exposition, un échantillonnage est recommandé pour les paramètres ayant une courte demi-vie plasmatique (HbCO, ChE et MetHb, par exemple).
37. Le tableau 1 énumère les paramètres de pathologie clinique généralement requis pour toutes les études toxicologiques. Une analyse d'urine n'est pas nécessaire en règle générale, mais peut être réalisée si on l'estime utile d'après la toxicité probable ou observée. Afin de mieux caractériser la toxicité de la substance d'essai, le directeur de l'étude peut faire appel à d'autres paramètres (cholinestérase, lipides, hormones, équilibre acido-basique, méthémoglobine ou corps de Heinz, créatine kinase, rapport myéloïde/érythroïde, troponines, gaz du sang, lactate déshydrogénase, sorbitol déshydrogénase, glutamate déshydrogénase, gamma glutamyl transpeptidase, etc.).

Tableau 1

Paramètres standards de pathologie clinique

Hématologie	
Nombre d'érythrocytes	Nombre total de leucocytes
Hématocrite	Différentiel leucocytaire
Concentration d'hémoglobine	Nombre de plaquettes sanguines
Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine	Potentiel de coagulation (en choisir un):
Volume corpusculaire moyen	— Temps de prothrombine
Concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine	— Temps de coagulation
Réticulocytes	— Temps de thromboplastine partielle

Chimie clinique	
Glucose (*)	Alanine aminotransférase
Cholestérol total	Aspartate aminotransférase
Triglycérides	Phosphatase alcaline
Azote uréique dans le sang	Potassium
Bilirubine totale	Sodium
Créatinine	Calcium
Protéines totales	Phosphore
Albumine	Chlore
Globuline	
Analyse d'urines (facultative)	
Apparence (couleur et turbidité)	Protéines totales
Volume	Glucose
Densité ou osmolarité	Sang/cellules sanguines
pH	
(*) Le directeur d'étude décidera si une période de jeûne est nécessaire ou non pour les animaux, une longue période de jeûne pouvant conduire à des mesures de glucose partiellement erronées pour les animaux traités par rapport aux animaux témoins. La période de jeûne est appropriée à l'espèce utilisée: pour le rat, elle peut être de 16 heures environ (jeûne pendant sa nuit). La détermination de la glycémie à jeun peut être effectuée après la période de jeûne de la nuit, pendant la dernière semaine d'exposition, ou après la période de jeûne de la nuit précédant l'autopsie (avec, dans ce dernier cas, tous les autres paramètres de pathologie clinique).	

38. Quand il est prouvé que les voies respiratoires basses (c'est-à-dire les alvéoles pulmonaires) sont le principal site de dépôt et de rétention, le lavage broncho-alvéolaire (LBA) peut alors être la technique de choix pour effectuer une analyse quantitative les paramètres de la relation dose-effet basée sur les hypothèses, en se concentrant sur l'alvéolite, l'inflammation pulmonaire et la phospholipidose. Ceci permet d'étudier convenablement l'évolution de la relation dose-effet et du décours temporel d'une lésion alvéolaire. Le fluide du LBA peut être analysé en se basant sur le nombre total et différentiel de leucocytes, les protéines totales et la lactate déshydrogénase. D'autres paramètres peuvent également être considérés, comme ceux mettant en évidence une lésion lysosomale, une phospholipidose, une fibrose, une inflammation allergique ou irritante, laquelle peut inclure la détermination de cytokines ou de chimiokines pro-inflammatoires. Les mesures liées au LBA complètent souvent les résultats des examens histopathologiques sans toutefois s'y substituer. Des indications sur la manière de réaliser un lavage de poumon sont disponibles dans le document d'orientation 39 (2).

MACROPATHOLOGIE ET POIDS DES ORGANES

39. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai et ceux écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une exsanguination complète (si cela est possible) et une autopsie macroscopique. Il convient d'enregistrer le délai entre la fin de la dernière exposition de chaque animal et leur sacrifice. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.
40. Le tableau 2 énumère les organes et tissus devant être conservés dans un milieu approprié lors de l'autopsie macroscopique en vue d'un examen histopathologique. La conservation des organes et tissus [entre crochets], et de tous les autres organes et tissus, est à la discrétion du directeur d'étude. Les organes indiqués **en gras** sont découpés et pesés à l'état humide, le plus tôt possible après la dissection, pour éviter leur dessiccation. La thyroïde et les épидидymes ne sont pesés que si cela est nécessaire car leur découpe peut gêner l'évaluation histopathologique. Les organes et tissus sont fixés à l'aide de formol tamponné à 10 %, ou d'un autre fixateur approprié, dès que l'autopsie est effectuée, et pas moins de 24 à 48 heures avant le découpage, en fonction du fixateur utilisé.

Tableau 2

Organes et Tissus à Conserver Pendant L'autopsie Macroscopique

[Bulbe olfactif]	Reins
Capsules surrénales	Testicules
Cerveau (y compris les tronçons du cortex cérébral et de la moelle/du pont)	Testicules
Cœur	Thymus
Estomac	Thyroïde
Foie	Tissus nasopharyngés [au moins 4 niveaux; 1 niveau comprenant le conduit du nasopharynx et le tissu lymphoïde associé à la muqueuse nasale (NALT)]
Ganglions lymphatiques depuis la région hilare du poumon, spécialement pour les substances d'essai particulières peu solubles. Pour des examens plus approfondis et/ou des études à but immunologique, d'autres ganglions lymphatiques peuvent être envisagés, comme ceux des régions médiastinale, cervicale/submandibulaire et/ou auriculaire.	Trachée (au moins 2 niveaux comprenant 1 coupe longitudinale le long de la carène et 1 coupe transversale)
Larynx (3 niveaux, dont 1 niveau qui comprend la base de l'épiglotte)	Utérus
Moelle épinière (niveau cervical, au milieu du thorax et lombaire)	Vésicules séminales
Moelle osseuse (et/ou un aspirat frais)	[Vessie]
Œsophage	[Yeux (rétine, nerf optique) et paupières]
Ovaires	Toutes lésions macroscopiques
Poumons (tous les lobes sur un niveau, y compris les bronches principales)	
Rate	

41. Les poumons sont retirés intacts, pesés et perfusés avec un fixateur approprié à une pression de 20 à 30 cm d'eau pour veiller à ce que l'architecture pulmonaire soit préservée (5). Les coupes sont recueillies pour tous les lobes sur un niveau, comprenant les bronches principales. Si un lavage du poumon est réalisé, le lobe qui n'a pas été lavé est sectionné sur trois niveaux (pas de coupe en série).
42. Au moins 4 niveaux des tissus nasopharyngés sont examinés, dont un devant comporter le conduit du nasopharynx (5) (6) (7) (8) (9) pour permettre un examen adéquat de l'épithélium squameux, transitionnel (respiratoire non-cilié), respiratoire (respiratoire cilié) et olfactif, ainsi que du tissu lymphatique (NALT) (10) (11). Trois niveaux du larynx sont examinés, dont un comprenant la base de l'épiglotte (12). Au moins deux niveaux de la trachée sont examinés, y compris une coupe longitudinale le long de la carène de la bifurcation des bronches extrapulmonaires et une coupe transversale.

HISTOPATHOLOGIE

43. Une évaluation histopathologique de tous les organes et tissus du tableau 2 est réalisée pour les animaux des groupes témoins et des groupes exposés à une concentration élevée de la substance d'essai, ainsi que pour les animaux qui meurent ou sont sacrifiés au cours de l'étude. On portera une attention particulière aux voies respiratoires, aux organes cibles et aux lésions macroscopiques. Les organes et tissus présentant des lésions dans le groupe exposé à une concentration élevée sont examinés pour tous les groupes. Le directeur de l'étude peut choisir de réaliser des évaluations histopathologiques pour d'autres groupes afin de mettre en évidence une relation concentration-réponse claire. Lorsqu'un groupe satellite (étude de réversibilité) est utilisé, il y a lieu d'effectuer un examen histopathologique pour tous les tissus et organes ayant laissé apparaître des effets dans les groupes traités. Lorsqu'un trop grand nombre de morts précoces ou d'autres problèmes survenant dans le groupe exposé à une concentration élevée compromettent la portée des résultats, le groupe exposé à la concentration immédiatement inférieure subit un examen histopathologique. On tentera de corréler les observations macroscopiques et les constatations au niveau microscopique.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

44. Pour chacun des animaux, les données suivantes sont fournies: poids corporel, consommation de nourriture, pathologie clinique, pathologie macroscopique, poids des organes et histopathologie. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquent pour chaque groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie. Tous les résultats, quantitatifs et qualitatifs, sont évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique généralement reconnue peut être utilisée; il y a lieu de sélectionner les méthodes statistiques au stade de la conception de l'étude.

Rapport d'essai

45. Le rapport d'essai contient les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage

- Description des conditions d'encagement, y compris: nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire.
- Espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat. Des données sources et historiques peuvent être fournies si elles proviennent d'animaux exposés à des conditions d'exposition, d'encagement et de jeûne similaires.
- Nombre, âge et sexe des animaux.
- Méthode de randomisation.
- Description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

Substance d'essai

- Nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation).
- Données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule

- Justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau).
- Données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation

- Description détaillée de la chambre d'inhalation, y compris son volume et son schéma.
- Source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère.
- Équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle.
- Source d'air et système de climatisation utilisé.
- Méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai.
- Différence de pression (positive ou négative).
- Orifices d'exposition par chambre ("nez seul") ou emplacement des animaux dans la chambre ("corps entier").

- Stabilité de l'atmosphère d'essai.
- Situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition.
- Traitement de l'air fourni/évacué.
- Débits d'air, débit d'air/orifice d'exposition ("nez seul") ou rapport du volume de l'animal à la chambre ("corps entier").
- Temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}).
- Nombre de changements de volume par heure.
- Doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition

- Justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale.
- Concentrations nominales (masse totale de substance d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre).
- Concentrations réelles de la substance d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges d'essai produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément.
- Toutes les concentrations d'air sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m³, etc.) plutôt qu'en unités de volume (ppm, ppb, etc.).
- Répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique (σ_g), ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales

- Détails sur la préparation de la substance d'essai, y compris sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des solides ou pour préparer les solutions de la substance d'essai.
- Description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci.
- Détails sur l'équipement utilisé pour contrôler la température et le taux d'humidité de la chambre ainsi que le débit d'air dans la chambre (réalisation d'une courbe d'étalonnage).
- Détails sur l'équipement utilisé pour recueillir les échantillons servant à déterminer les concentrations dans la chambre et la répartition granulométrique.
- Détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération de la substance d'essai à partir du milieu d'échantillonnage).
- Méthode de randomisation utilisée pour l'assignation des animaux aux groupes d'essai et aux groupes témoins.
- Détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau).
- Justification du choix des concentrations d'essai.

Résultats

- Tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation.
- Tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation.

- Tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g .
- Tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (pour les animaux montrant des signes de toxicité, notamment mortalité, nature, sévérité, moment d'apparition et durée des effets).
- Tableau du poids de chacun des animaux.
- Tableau de la consommation de nourriture.
- Tableau des résultats de pathologie clinique.
- Résultats de l'autopsie et observations histopathologiques pour chaque animal, s'ils sont disponibles.
- Tableau de tous les autres paramètres mesurés.

Discussion et interprétation des résultats

- Un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente méthode d'essai, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules.
- La respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis.
- La cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude.
- La cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés.
- Une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (3).
- Le ou les organes cibles sont identifiés.
- La concentration sans effet nocif observé (CSENO) et la concentration minimale avec effet nocif observé (CMENO) sont déterminées.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) OCDE (1981). Toxicité à doses répétées par inhalation, Ligne directrice n° 412 d'origine, direction de l'environnement, OCDE, Paris.
- (2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.
- (3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.
- (4) Whalan J.E. et Redden J.C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.
- (5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, p. 229-258.
- (6) Young J.T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.
- (7) Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

-
- (8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes M.P. and Ward J.M. (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.
- (9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.
- (10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13: 219-224.
- (11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141: 281-285.
- (12) Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3): 419-428.
- (13) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006 (JO L 353 du 31.12.2008, p. 1).
-

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.»

5) les chapitres B.29 et B.30 sont remplacés par le texte suivant:

«B.29. TOXICITÉ SUBCHRONIQUE PAR INHALATION: ÉTUDE SUR 90 JOURS

RÉSUMÉ

La présente méthode d'essai B.29 révisée a été conçue afin de caractériser pleinement la toxicité par inhalation d'une substance d'essai à la suite d'une exposition subchronique (90 jours), et de fournir des données fiables en vue d'estimations quantitatives des risques liés à l'inhalation. Des groupes de rongeurs (10 mâles et 10 femelles) sont exposés 6 heures par jour pendant une période de 90 jours (13 semaines) a) à la substance d'essai à trois niveaux de concentration ou plus, b) à de l'air filtré (témoin négatif), et/ou c) au véhicule (groupe témoin du véhicule). Les animaux sont exposés en général 5 jours par semaine, mais il est aussi permis de les exposer 7 jours par semaine. Des mâles et des femelles sont toujours utilisés, mais peuvent être exposés à des niveaux de concentration différents si l'un des sexes est connu pour être plus sensible à une substance d'essai donnée. Afin de mieux caractériser la toxicité de la substance d'essai, la présente méthode laisse la possibilité au directeur de l'étude d'inclure des groupes satellites (étude de réversibilité), des sacrifices en cours d'essai, des lavages broncho-alvéolaires (LBA), des tests neurologiques et des évaluations histopathologiques ou de pathologie clinique supplémentaires.

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 413 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (2009). Le texte original de la ligne directrice 413 sur la toxicité subchronique par inhalation avait été adopté en 1981 (1). La présente méthode d'essai B.29 [équivalente à la ligne directrice 413 révisée (2009)] a été mise à jour pour prendre en compte l'état de la science et répondre aux exigences réglementaires actuelles et futures.
2. Les études de toxicité subchronique par inhalation sont principalement utilisées pour calculer des concentrations réglementaires en vue d'évaluer les risques pour les travailleurs en milieu professionnel. Elles servent aussi à estimer les risques liés à l'exposition humaine dans les lieux d'habitation, les transports et l'environnement. La présente méthode d'essai permet de caractériser les effets nocifs résultant d'une exposition quotidienne répétée, par inhalation, à une substance d'essai pendant 90 jours (approximativement 10 % de la durée de vie d'un rat). Les données dérivées des études de toxicité subchronique par inhalation peuvent être utilisées pour procéder à des estimations quantitatives des risques et pour choisir les concentrations dans les études de toxicité chronique. La présente méthode d'essai n'est pas spécifiquement destinée à tester les nanomatériaux. Le document d'orientation n° 39 regroupe les définitions utilisées dans le contexte de cette méthode d'essai (2).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

3. Avant toute étude, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur la substance à tester afin d'améliorer la qualité de l'étude et de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination des concentrations d'essai appropriées, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les résultats de tous les essais de toxicité in vitro ou in vivo auxquels elle a été soumise; son (ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées; ainsi que les données issues d'autres études sur l'exposition répétée. En cas de neurotoxicité, connue ou observée au cours de l'étude, le directeur de l'étude pourra décider d'inclure les évaluations jugées nécessaires, comme une batterie d'observations fonctionnelles (FOB) et des mesures de l'activité motrice. Bien que la durée des expositions par rapport à des examens spécifiques puisse être critique, l'exécution de ces activités supplémentaires n'interfère pas avec la conception de l'étude principale.
4. Les dilutions de substances corrosives ou irritantes peuvent être testées à des concentrations qui permettront d'atteindre le degré de toxicité désiré. Le document d'orientation n° 39 (2) fournit de plus amples informations. Lors de l'exposition des animaux à ces substances, les concentrations cibles sont assez faibles pour ne causer ni souffrance manifeste ni détresse, mais suffisantes pour prolonger la courbe concentration-réponse jusqu'à des niveaux correspondant à l'objectif scientifique et réglementaire de l'essai. Le choix de ces concentrations est fait au cas par cas, de préférence sur la base d'une étude préliminaire de détermination des concentrations, conçue de façon appropriée, et qui fournit des informations sur l'effet critique mesuré, un éventuel seuil d'irritation et le moment de son apparition (voir paragraphes 11-13). La justification du choix des concentrations est fournie.
5. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés. Les animaux moribonds sont pris en compte au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (3) détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sélection des espèces animales

6. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs adultes en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

7. Les femelles sont nullipares et non gravides. Le jour de la randomisation, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 7 à 9 semaines. Leur poids corporel n'excède pas $\pm 20\%$ du poids moyen pour chaque sexe. Sélectionnés au hasard, les animaux sont marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, ils sont conservés dans leur cage pour une période d'au minimum 5 jours avant le début de l'essai.

Conditions d'élevage des animaux

8. Les animaux sont identifiés de façon individuelle, de préférence à l'aide de dispositifs sous-cutanés, afin de faciliter leur observation et d'éviter toute confusion. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est maintenue à $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement étre mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne fait pas obstacle à une observation précise de chaque animal, et n'engendre qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés "nez seul", il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne doivent pas provoquer chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable, alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés "corps entier" à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour empêcher la filtration de l'aérosol d'essai par la fourrure des congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

Chambre d'inhalation

9. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de la substance d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition "nez seul" (qui inclut les dispositifs "tête seule", "nez seul" et "museau seul") est privilégié. Le mode d'exposition "nez seul" est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition "corps entier" peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais cela est justifié dans le rapport de l'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition "corps entier", on veillera à ce que le "volume" total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (2) décrit les principes des techniques d'exposition "corps entier" ou "nez seul", ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques.

ÉTUDES DE TOXICITÉ

Concentrations limites

10. Contrairement aux études de toxicité aiguë, aucune concentration limite n'est définie dans les études de toxicité subchronique par inhalation. La concentration maximale testée prend en compte: 1) la concentration maximale pouvant être atteinte, 2) le niveau d'exposition humaine correspondant au "pire des cas", 3) la nécessité de maintenir une alimentation adéquate en oxygène, et/ou 4) le bien-être des animaux. En l'absence de limites fondées sur des données, les valeurs limites pour la toxicité aiguë du règlement (CE) n° 1272/2008 (13) peuvent être utilisées (c'est-à-dire jusqu'à une concentration maximale de 5 mg/l pour les aérosols, 20 mg/l pour les vapeurs et 20 000 ppm pour les gaz); voir document d'orientation 39 (2). S'il est nécessaire de dépasser ces limites lors d'essais de gaz ou de substances d'essai hautement volatils (comme les réfrigérants), une justification est produite. La concentration limite doit permettre d'obtenir une toxicité sans équivoque, sans causer de stress excessif chez les animaux ni affecter leur longévité (3).

Étude préliminaire de détermination des concentrations

11. Avant le début de l'étude principale, une étude préliminaire de détermination des concentrations est généralement nécessaire. Plus complète qu'une étude d'observation, elle n'est pas limitée par le choix des concentrations. Les connaissances acquises grâce à une étude préliminaire de détermination des concentrations peuvent conduire à la réussite de l'étude principale. En effet, une telle étude peut fournir des informations techniques sur les méthodes d'analyse, la taille des particules, la découverte de mécanismes de toxicité, les données histopathologiques et de pathologie clinique, et les estimations de la concentration sans effet nocif observé (CSENO) et de la concentration maximale acceptable (CMA) dans une étude principale. Le directeur d'étude peut décider de s'appuyer sur une étude préliminaire de détermination des concentrations pour identifier: le seuil d'irritation de l'appareil respiratoire (par exemple avec une histopathologie de l'appareil respiratoire, des tests de la fonction pulmonaire ou des lavages bronchoalvéolaires), la concentration la plus élevée tolérée par les animaux sans provoquer de stress excessif, et les paramètres qui permettront de caractériser au mieux la toxicité de la substance d'essai.

12. Une étude préliminaire de détermination des concentrations peut comporter un ou plusieurs niveaux de concentration. Selon les effets à mesurer retenus, trois à six mâles et trois à six femelles sont exposés à chaque niveau de concentration. La durée d'une étude préliminaire de détermination des concentrations est d'au minimum 5 jours et ne pas excéder 28 jours en général. Il convient d'exposer dans le rapport d'étude les raisons du choix des concentrations retenues pour l'étude principale, dont l'objet est de démontrer une relation concentration-réponse basée sur l'effet mesuré le plus sensible auquel on s'attend. La concentration la plus faible n'engendre en principe aucune manifestation de toxicité, tandis que la concentration la plus élevée permet d'obtenir une toxicité sans équivoque, sans causer de stress excessif chez les animaux ni affecter leur longévité (3).
13. Lors du choix des niveaux de concentration pour l'étude préliminaire de détermination des concentrations, toutes les informations disponibles sont prises en compte, y compris les relations structure-activité et les données correspondant à des produits chimiques analogues (voir paragraphe 3). Une étude préliminaire de détermination des concentrations peut confirmer ou réfuter le choix des effets mesurés les plus sensibles selon des critères mécanistiques, comme l'inhibition de la cholinestérase par des composés organophosphorés, la formation de méthémoglobine par des agents cytotoxiques d'isomérisation érythro, les hormones thyroïdiennes (T_3 , T_4) dans le cas de thyrotoxicités, les protéines, la LDH, ou les neutrophiles dans les lavages bronchoalvéolaires dans le cas de particules inoffensives faiblement solubles ou d'aérosols irritants pour les poumons.

Étude principale

14. L'étude principale de toxicité subchronique comporte en général trois niveaux de concentration ainsi qu'un témoin négatif (air) et/ou un témoin du véhicule, s'il y a lieu (voir paragraphe 18). L'ensemble des informations disponibles doit permettre de déterminer les niveaux d'exposition appropriés, y compris les résultats des études systémiques de toxicité, le métabolisme et la cinétique (on prendra garde d'éviter les niveaux de concentration élevée avec des processus cinétiques de saturation). Chaque groupe d'essai comprend au moins 10 rongeurs mâles et 10 rongeurs femelles exposés à la substance d'essai 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 13 semaines (soit une durée totale de l'étude d'au moins 90 jours). Les animaux peuvent aussi être exposés 7 jours par semaine (par exemple dans le cas d'essais sur des produits pharmaceutiques inhalés). S'il est connu qu'un des sexes est plus réactif à la substance d'essai, les niveaux de concentration peuvent différer selon le sexe afin d'optimiser la concentration-réponse telle que décrite au paragraphe 15. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées "nez seul", il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Lorsque la durée d'exposition est inférieure à 6 heures par jour ou qu'il est nécessaire de mener une étude d'exposition "corps entier" de longue durée (par exemple de 22 heures par jour), des justifications sont fournies, voir document d'orientation 39 (2). Les animaux sont privés de nourriture pendant l'exposition sauf si sa durée dépasse 6 heures. Dans une exposition "corps entier", les animaux peuvent boire de l'eau.
15. Les concentrations cibles choisies permettent d'identifier le(s) organe(s) cible(s) et de mettre en évidence une concentration-réponse claire:
- le niveau de concentration élevé produit des effets toxiques sans engendrer de signes persistants ou la mort, ce qui empêcherait une évaluation valable des résultats,
 - le(s) niveau(x) de concentration intermédiaire(s) est (sont) espacé(s) de manière à produire une gradation dans les effets toxiques observés avec une concentration faible et avec une concentration élevée,
 - le niveau de concentration faible ne produit quasiment aucune manifestation de toxicité.

Sacrifices en cours d'essai

16. Si l'on envisage le sacrifice d'animaux en cours d'essai, il faut accroître le nombre d'animaux exposés à chaque niveau de concentration du nombre prévu d'animaux sacrifiés avant la fin de l'épreuve. Le recours aux sacrifices en cours d'essai est justifié, et les analyses statistiques en tiennent dûment compte.

Étude satellite (étude de réversibilité)

17. Une étude de réversibilité peut être utilisée pour mettre en évidence le caractère réversible, persistant ou retardé de la toxicité, pour une période post-traitement d'une durée appropriée d'au minimum 14 jours. Les groupes satellites sont constitués de dix mâles et de dix femelles exposés en même temps que les animaux d'expérience de l'étude principale. Ils sont exposés à la concentration la plus élevée de la substance d'essai. Il convient également de faire appel à un témoin parallèle (air) et, le cas échéant, à un témoin du véhicule (voir paragraphe 18).

Animaux témoins

18. Les animaux du groupe témoin négatif (air) sont traités d'une manière identique à ceux du groupe d'animaux d'essai, mais au lieu de la substance d'essai, ils sont exposés à de l'air filtré. Lorsque de l'eau ou une autre substance est utilisée pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est inclus dans l'étude, à la place du groupe témoin négatif exposé à l'air seulement. Autant que possible, l'eau est le véhicule utilisé. Dans ce cas, les animaux témoins sont exposés à un air dont le taux d'humidité relative est le même que pour les

groupes exposés à la substance d'essai. Le choix du véhicule s'opère sur la base d'une étude préliminaire appropriée ou de données historiques. Si la toxicité d'un véhicule est mal connue, le directeur de l'étude peut choisir d'utiliser un témoin négatif (air) et un témoin du véhicule, mais cela est toutefois fortement déconseillé. Si les données historiques montrent qu'un véhicule n'est pas toxique, le groupe témoin à l'air n'est pas nécessaire et seul un témoin du véhicule est utilisé. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude préliminaire d'une substance d'essai préparée dans un véhicule, ce véhicule est considéré comme non toxique à la concentration testée et est utilisé comme véhicule témoin.

CONDITIONS D'EXPOSITION

Administration des concentrations

19. Les animaux sont exposés à la substance d'essai présentée sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou sous une forme mixte. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, des concentrations choisies, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion. Les matières particulières peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin de réduire la taille des particules. Pour plus d'informations, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Répartition granulométrique

20. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles de se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 3 µm, avec un écart type géométrique (σ_g) compris entre 1,5 et 3,0 (4). Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques auront une taille inférieure à cette norme, et les particules chargées ou les fibres peuvent avoir une taille supérieure.

Préparation de la substance d'essai dans un véhicule

21. La substance d'essai est idéalement testée sans véhicule. S'il est nécessaire d'avoir recours à un véhicule pour atteindre la concentration et la taille particulaire voulues de la substance d'essai, l'eau est choisie de préférence. Chaque fois qu'une substance d'essai est dissoute dans un véhicule, sa stabilité est démontrée.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION

Débit d'air dans la chambre d'exposition

22. Le débit d'air dans la chambre d'exposition est contrôlé avec soin, surveillé en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi en temps réel de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les paramètres d'inhalation dynamiques pertinents. Si la concentration est suivie en temps réel, la fréquence peut être ramenée à une seule mesure du débit de l'air par exposition et par jour. On prendra particulièrement soin d'éviter toute re-respiration dans les chambres d'exposition "nez seul". La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasse pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées. Si les mesures du premier jour d'exposition montrent que la concentration de ces gaz est appropriée, aucune mesure complémentaire ne devrait être nécessaire.

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

23. La température de la chambre d'exposition est maintenue à 22 ± 3 °C. Dans les cas d'exposition "nez seul" et "corps entier", l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est autant que possible surveillée en continu et enregistrée toutes les heures pendant chaque exposition. L'humidité relative est de préférence comprise entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple lorsque la substance d'essai se présente sous forme de solution aqueuse), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences de la substance avec la méthode d'essai.

Substance d'essai: concentration nominale

24. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de la substance d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai: concentration réelle

25. La concentration réelle est la concentration de la substance d'essai prélevée dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à la substance d'essai sont également effectuées par une pré-étude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre le produit à tester (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie.
26. Pendant toute la durée de l'étude, il est recommandé de n'employer si possible qu'un seul lot de la substance d'essai, et l'échantillon de la substance est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il convient de réaliser une caractérisation de la substance d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes: temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de la substance d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).
27. L'atmosphère d'exposition est maintenue constante autant que possible. Un dispositif de suivi en temps réel, tel qu'un photomètre à aérosol pour les aérosols ou un analyseur d'hydrocarbures totaux pour les vapeurs, peut être utilisé pour démontrer la stabilité des conditions d'exposition. La concentration réelle dans la chambre est mesurée au moins 3 fois chaque jour d'exposition et pour chaque niveau d'exposition. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, l'utilisation d'un échantillon par période d'exposition est acceptable. En principe, cet échantillon est alors recueilli pendant la totalité de la période d'exposition. Les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas $\pm 10\%$ pour les gaz et vapeurs et $\pm 20\%$ pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de la substance d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition (t_{95}) et leur déclin. Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (2).
28. Pour des systèmes très complexes constitués de gaz ou vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion ou substance d'essai propulsés à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisira donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général le principal principe actif du mélange. Quand la substance d'essai est un mélange, la concentration analytique devra être indiquée pour la préparation totale et pas uniquement pour le principe actif ou la substance indicatrice (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (2).

Substance d'essai: répartition granulométrique

29. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum chaque semaine pour chaque niveau de concentration, à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques (APS). Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade et l'autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude.
30. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, voir document d'orientation 39 (2). Si pour toutes les concentrations testées, cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au minimum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter l'essai.
31. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes.

OBSERVATIONS

32. Un examen clinique attentif des animaux est pratiqué avant, pendant, et après la période d'exposition. Des observations plus fréquentes peuvent être réalisées en fonction de la réponse des animaux pendant l'exposition. Lorsque l'observation des animaux s'avère difficile en raison des tubes de contention, du mauvais éclairage des chambres d'exposition "corps entier" ou d'atmosphères opaques, les animaux seront observés attentivement après l'exposition. Les observations effectuées avant l'exposition du lendemain peuvent permettre d'estimer une éventuelle réversibilité ou exacerbation des effets toxiques.
33. Toutes les observations sont enregistrées individuellement pour chaque animal. Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.
34. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux, ainsi que de l'activité somatomotrice et du comportement. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma retiennent l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement. Il est possible d'enrichir le protocole d'étude par des estimations complémentaires telles que: cinétique, surveillance biologique, fonction pulmonaire, rétention de produits peu solubles qui s'accumulent dans les tissus pulmonaires et changements comportementaux.

POIDS CORPOREL

35. Le poids de chacun des animaux est enregistré individuellement: juste avant la première exposition (jour 0), deux fois par semaine par la suite (par exemple les vendredis et lundis, afin de mettre en évidence leur rétablissement après un week-end sans exposition, ou dans un délai permettant l'évaluation de la toxicité systémique), et au moment de leur mort ou de leur euthanasie. Si aucun effet n'est observé les 4 premières semaines, le poids corporel peut n'être mesuré qu'une fois par semaine pendant le reste de l'étude. Les animaux du groupe satellite (étude de réversibilité) sont toujours pesés de façon hebdomadaire tout au long de la période de récupération. Au terme de l'étude, tous les animaux sont pesés juste avant leur sacrifice pour ne pas fausser le calcul des rapports du poids des organes au poids du corps.

CONSOMMATION DE NOURRITURE ET D'EAU

36. La quantité de nourriture consommée est mesurée une fois par semaine. La consommation d'eau peut également l'être.

PATHOLOGIE CLINIQUE

37. Tous les animaux, y compris ceux des groupes témoins et satellites, quand ils sont sacrifiés, subissent des examens cliniques. Le délai entre la fin de l'exposition et la prise de sang est enregistré, en particulier quand la reconstitution de l'effet visé est rapide. À la fin de l'exposition, un échantillonnage est recommandé pour les paramètres ayant une courte demi-vie plasmatique (HbCO, ChE et MetHb, par exemple).
38. Le tableau 1 énumère les paramètres de pathologie clinique généralement requis pour toutes les études toxicologiques. Une analyse d'urine n'est pas nécessaire en règle générale, mais peut être réalisée si on l'estime utile d'après la toxicité probable ou observée. Afin de mieux caractériser la toxicité de la substance d'essai, le directeur de l'étude peut faire appel à d'autres paramètres (cholinestérase, lipides, hormones, équilibre acido-basique, méthémoglobine ou corps de Heinz, créatine kinase, rapport myéloïde/érythroïde, troponines, gaz du sang, lactate déshydrogénase, sorbitol déshydrogénase, glutamate déshydrogénase, gamma glutamyl transpeptidase, etc.).

Tableau 1

Paramètres standards de pathologie clinique

Hématologie	
Nombre d'érythrocytes	Nombre total de leucocytes
Hématocrite	Différentiel leucocytaire
Concentration d'hémoglobine	Nombre de plaquettes sanguines
Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine	Potentiel de coagulation (en choisir un):
Volume corpusculaire moyen	— Temps de prothrombine
Concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine	— Temps de coagulation
Réticulocytes	— Temps de thromboplastine partielle

Chimie clinique	
Glucose (*)	Alanine aminotransférase
Cholestérol total	Aspartate aminotransférase
Triglycérides	Phosphatase alcaline
Azote uréique dans le sang	Potassium
Bilirubine totale	Sodium
Créatinine	Calcium
Protéines totales	Phosphore
Albumine	Chlorure
Globuline	
Analyse d'urine (facultative)	
Apparence (couleur et turbidité)	Protéines totales
Volume	Glucose
Densité ou osmolarité	Sang/cellules sanguines
pH	
(*) Le directeur d'étude décidera si une période de jeûne est nécessaire ou non pour les animaux, une longue période de jeûne pouvant conduire à des mesures de glucose partiellement erronées pour les animaux traités par rapport aux animaux témoins. La période de jeûne est appropriée à l'espèce utilisée: pour le rat, elle peut être de 16 heures environ (jeûne pendant la nuit). La détermination de la glycémie à jeun peut être effectuée après la période de jeûne de la nuit, pendant la dernière semaine d'exposition, ou après la période de jeûne de la nuit précédant l'autopsie (avec, dans ce dernier cas, tous les autres paramètres de pathologie clinique).	

39. Quand il est prouvé que les voies respiratoires basses (c'est-à-dire les alvéoles pulmonaires) sont le principal site de dépôt et de rétention, le lavage broncho-alvéolaire (LBA) peut alors être la technique de choix pour effectuer une analyse quantitative des paramètres de la relation dose-effet basée sur les hypothèses, en se concentrant sur l'alvéolite, l'inflammation pulmonaire et la phospholipidose. Ceci permet d'étudier convenablement l'évolution de la relation dose-effet et du décours temporel d'une lésion alvéolaire. Le fluide du LBA peut être analysé en se basant sur le nombre total et différentiel de leucocytes, les protéines totales et la lactate déshydrogénase. D'autres paramètres peuvent également être considérés, comme ceux mettant en évidence une lésion lysosomale, une phospholipidose, une fibrose, une inflammation allergique ou irritante, laquelle peut inclure la détermination de cytokines ou de chimiokines pro-inflammatoires. Les mesures liées au LBA complètent souvent les résultats des examens histopathologiques sans toutefois s'y substituer. Des indications sur la manière de réaliser un lavage de poumon sont disponibles dans le document d'orientation 39 (2).

EXAMEN OPHTHALMOLOGIQUE

40. À l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un dispositif équivalent, un examen ophtalmologique du fond d'œil, des milieux de réfraction, de l'iris et de la conjonctivite est effectué avant l'administration de la substance d'essai pour tous les animaux, et au terme de l'étude pour tous les groupes témoins et groupes exposés à la concentration élevée. Si des changements dans les yeux sont décelés, tous les animaux des autres groupes sont examinés, y compris le groupe satellite (étude de réversibilité).

MACROPATHOLOGIE ET POIDS DES ORGANES

41. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai et ceux écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une exsanguination complète (si cela est possible) et une autopsie macroscopique. Il convient d'enregistrer le délai entre la fin de la dernière exposition de chaque animal et leur sacrifice. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.
42. Le tableau 2 énumère les organes et tissus devant être conservés dans un milieu approprié lors de l'autopsie macroscopique en vue d'un examen histopathologique. La conservation des organes et tissus [entre crochets], et de tous les autres organes et tissus, est à la discrétion du directeur d'étude. Les organes indiqués **en gras** sont découpés et pesés à l'état humide, le plus tôt possible après la dissection, pour éviter leur dessiccation. La thyroïde et les épидидymes ne sont pesés que si cela est nécessaire car leur découpe peut gêner l'évaluation histopathologique. Les organes et tissus sont fixés à l'aide de formol tamponné à 10 %, ou d'un autre fixateur approprié, dès que l'autopsie est effectuée, et pas moins de 24 à 48 heures avant le découpage, en fonction du fixateur utilisé.

Tableau 2

Organes et tissus à conserver lors de l'autopsie macroscopique

Aorte	Moelle osseuse (et/ou un aspirat frais)
[Bulbe olfactif]	Muscle (cuisse)
Cæcum	Nerf périphérique (sciatique ou tibial, de préférence proche du muscle)
Capsules surrénales	Œsophage
Cerveau (y compris segments d'hémisphères, cervelet et bulbe rachidien/pont)	Ovaires
Cœur	Pancréas
Côlon	Parathyroïdes
Dents	Peau
Duodénum	Poumons (tous les lobes sur un niveau, y compris les bronches principales)
[Épididymes]	Prostate
Fémur avec articulation	Rate
Foie	Rectum
Ganglions lymphatiques (distaux par rapport au site d'entrée)	Reins
Ganglions lymphatiques depuis la région hilare du poumon, en particulier pour les substances particulières peu solubles. Pour des examens plus approfondis et/ou des études à but immunologique, d'autres ganglions lymphatiques peuvent être envisagés, comme ceux des régions médiastinale, cervicale/sub-mandibulaire et/ou auriculaire.	Sternum
[Glandes de Harder]	Testicules
[Glandes lacrymales (extraorbitales)]	Thymus
Estomac	Thyroïde
Glande mammaire (femelles)	Tissus nasopharyngés [au moins 4 niveaux; 1 niveau comprenant le conduit nasopharyngien et le tissu lymphoïde associé à la muqueuse nasale (NALT)]
Glandes salivaires	Trachée (au moins 2 niveaux comprenant 1 coupe longitudinale le long de la carène et 1 coupe transversale)
Hypophyse	[Urètre]
Iléon	[Urètre]
Jénunum	Utérus
[Langue]	Vésicule biliaire (si présente)
Larynx (3 niveaux, dont la base de l'épiglotte)	Vésicules séminales
Moelle épinière (niveaux cervical, mésos thoracique et lombaire)	Vessie
	[Yeux (rétine, nerf optique) et paupières]
	Organes cibles
	Toutes les masses et lésions macroscopiques

43. Les poumons sont retirés intacts, pesés et perfusés avec un fixateur approprié à une pression de 20 à 30 cm d'eau pour veiller à ce que l'architecture pulmonaire soit préservée (5). Les coupes sont recueillies pour tous les lobes sur un niveau comprenant les bronches principales. Si un lavage du poumon est réalisé, le lobe qui n'a pas été lavé est sectionné sur trois niveaux (pas de coupe en série).

44. Au moins 4 niveaux des tissus nasopharyngés sont examinés, dont un devant comporter le conduit nasopharyngien (5) (6) (7) (8) (9) pour permettre un examen adéquat de l'épithélium squameux, transitionnel (respiratoire non-cilié), respiratoire (respiratoire cilié) et olfactif, ainsi que du tissu lymphatique (NALT) (10) (11). Trois niveaux du larynx sont examinés, dont un comprenant la base de l'épiglotte (12). Au moins deux niveaux de la trachée sont examinés, y compris une coupe longitudinale le long de la carène de la bifurcation des bronches extrapulmonaires et une coupe transversale.

HISTOPATHOLOGIE

45. Une évaluation histopathologique de tous les organes et tissus du tableau 2 est réalisée pour les animaux des groupes témoins et des groupes exposés à une concentration élevée de la substance d'essai, ainsi que pour les animaux qui meurent ou sont sacrifiés au cours de l'étude. On portera une attention particulière aux voies respiratoires, aux organes cibles et aux lésions macroscopiques. Les organes et tissus présentant des lésions dans le groupe exposé à une concentration élevée sont examinés pour tous les groupes. Le directeur de l'étude peut choisir de réaliser des évaluations histopathologiques pour d'autres groupes afin de mettre en évidence une relation concentration-réponse claire. Lorsqu'un groupe satellite (étude de réversibilité) est utilisé, il y a lieu d'effectuer un examen histopathologique pour tous les tissus et organes ayant laissé apparaître des effets dans les groupes traités. Lorsqu'un trop grand nombre de morts précoces ou d'autres problèmes survenant dans le groupe exposé à une concentration élevée compromettent la portée des résultats, le groupe exposé à la concentration immédiatement inférieure subit un examen histopathologique. On tentera de corréler les observations macroscopiques et les constatations au niveau microscopique.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Données

46. Pour chacun des animaux, les données suivantes sont fournies: poids corporel, consommation de nourriture, pathologie clinique, pathologie macroscopique, poids des organes et histopathologie. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquent pour chaque groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie. Tous les résultats, quantitatifs et fortuits, sont évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique généralement reconnue peut être utilisée; il y a lieu de sélectionner les méthodes statistiques au stade de la conception de l'étude.

Rapport d'essai

47. Le rapport d'essai contient, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage

- Description des conditions d'encagement, y compris: nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire.
- Espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat. Des données sources et historiques peuvent être fournies si elles correspondent à des animaux soumis à des conditions d'exposition, d'encagement et de jeûne similaires.
- Nombre, âge et sexe des animaux.
- Méthode de randomisation.
- Description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

Substance d'essai

- Nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation).
- Données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule

- Justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau).
- Données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation

- Description détaillée de la chambre d'inhalation, y compris son volume et son schéma.
- Source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère.
- Équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle.
- Source d'air et système de climatisation utilisé.
- Méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai.
- Différence de pression (positive ou négative).
- Orifices d'exposition par chambre ("nez seul") ou emplacement des animaux dans la chambre ("corps entier").
- Stabilité de l'atmosphère d'essai.
- Situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition.
- Traitement de l'air fourni/évacué.
- Débits d'air, débit d'air/orifice d'exposition ("nez seul") ou rapport du volume de l'animal à la chambre ("corps entier").
- Temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}).
- Nombre de changements de volume par heure.
- Doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition

- Justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale.
- Concentrations nominales (masse totale de la substance d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre).
- Concentrations réelles de la substance d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges à tester produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément.
- Toutes les concentrations atmosphériques sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m^3 , etc.) plutôt qu'en unités de volume (ppm, ppb, etc.).
- Répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique (σ_g), ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales

- Détails sur la préparation de la substance d'essai, y compris sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des matériaux solides ou pour préparer les solutions de la substance d'essai.
- Description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci.
- Détails sur l'équipement utilisé pour contrôler la température et le taux d'humidité de la chambre ainsi que le débit d'air dans la chambre (réalisation d'une courbe d'étalonnage).
- Détails sur l'équipement utilisé pour recueillir les échantillons servant à déterminer les concentrations dans la chambre et la répartition granulométrique.
- Détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération de la substance d'essai à partir du milieu d'échantillonnage).

- Méthode de randomisation utilisée pour l'assignation des animaux aux groupes d'essai et aux groupes témoins.
- Détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau).
- Justification du choix des concentrations d'essai.

Résultats

- Tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation.
- Tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation.
- Tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g .
- Tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de mortalité, et nature, sévérité, moment d'apparition et durée des effets).
- Tableau du poids de chacun des animaux.
- Tableau de la consommation de nourriture.
- Tableau des résultats de pathologie clinique.
- Pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques disponibles.

Discussion et interprétation des résultats

- Un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente méthode d'essai, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules.
- La respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis.
- La cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude.
- La cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés.
- Une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (3).
- Le ou les organes cibles sont identifiés.
- La concentration sans effet nocif observé (CSENO) et la concentration minimale avec effet nocif observé (CMENO) sont déterminées.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) OCDE (1981). Toxicité subchronique par inhalation, Ligne directrice n° 413 d'origine, direction de l'environnement, OCDE, Paris.
- (2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.
- (3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.
- (4) Whalan E. and Redden J.C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

-
- (5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material*, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, p. 229-258.
- (6) Young J.T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1: 309-312.
- (7) Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ. Health Perspect.* 85: 231-238.
- (8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes M.P. and Ward J.M. (eds) *Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series*, Raven Press, New York, 215-263.
- (9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.
- (10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hamelers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13: 219-224.
- (11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141: 281-285.
- (12) Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3): 419-428.
- (13) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006 (JO L 353 du 31.12.2008, p. 1).
-

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

B.30. ÉTUDES DE TOXICITÉ CHRONIQUE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 452 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (2009). La ligne directrice 452 initiale avait été adoptée en 1981. La révision de cette méthode B.30 a été jugée nécessaire afin de tenir compte des évolutions récentes dans le domaine du bien-être animal, ainsi que des nouvelles exigences réglementaires (1) (2) (3) (4). La mise à jour de la méthode d'essai B.30 a été effectuée en parallèle avec la révision des chapitres B.32 (Études de cancérogenèse) et B.33 (Études combinées de toxicité chronique et de cancérogenèse) de la présente annexe, dans le but d'obtenir des informations additionnelles à partir des animaux utilisés dans l'étude, et de fournir des précisions concernant le choix des doses. La présente méthode d'essai vise les essais portant sur une large gamme de produits chimiques, dont des pesticides et des produits chimiques industriels.
2. La plupart des études de toxicité chronique étant menées sur des espèces de rongeurs, la présente méthode d'essai est destinée à s'appliquer principalement à des études réalisées avec ces espèces. S'il s'avérait nécessaire de mener de telles études avec des non-rongeurs, les principes et procédures décrits dans la présente méthode d'essai et dans le chapitre B.27 de la présente annexe (Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours) (5) pourront aussi être appliqués, moyennant des modifications appropriées, comme indiqué dans le document d'orientation de l'OCDE n° 116 sur l'élaboration et la conduite des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (6).
3. Les trois principales voies d'administration utilisées dans les études de toxicité chronique sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance d'essai, et de la voie d'exposition prédominante chez l'homme. Des informations complémentaires sur le choix de la voie d'exposition sont fournies dans le document d'orientation n° 116 (6).
4. La présente méthode d'essai porte essentiellement sur l'exposition par voie orale, la voie la plus communément utilisée dans les études de toxicité chronique. Bien que des études de toxicité chronique à long terme utilisant l'exposition par voie cutanée ou par inhalation puissent aussi être nécessaires pour évaluer le risque pour la santé humaine et/ou exigées en vertu de certains régimes réglementaires, ces deux voies d'exposition nécessitent des dispositifs techniques d'une grande complexité. De telles études devront être conçues au cas par cas, encore que la présente méthode d'essai, qui porte sur la caractérisation et l'évaluation de la toxicité chronique par voie orale, puisse fournir les bases d'un protocole d'étude par voie cutanée et/ou l'inhalation, notamment en ce qui concerne les recommandations relatives aux durées de traitement, aux paramètres cliniques et pathologiques, etc. Il existe des documents d'orientation de l'OCDE sur l'administration expérimentale de substances d'essai par inhalation (6) (7) et par voie cutanée (6). Les chapitres B.8 (8) et B.29 (9) de la présente annexe, ainsi que le document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aiguë par inhalation (7) doivent en particulier être consultés lors de la conception d'études à plus long terme portant sur une exposition par inhalation. Le chapitre B.9 de la présente annexe (10) doit être consulté dans le cas d'un essai par voie cutanée.
5. L'étude de toxicité chronique donne des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée sur une portion considérable de la durée de vie des espèces employées. L'étude fournit des informations sur les effets toxiques de la substance d'essai, et indiquera les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes. Elle peut aussi donner une estimation de la dose sans effet nocif observé, qui permet d'établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine. De plus, il convient d'accorder une attention particulière à l'observation clinique des animaux afin d'obtenir le plus d'informations possible.
6. Les objectifs des études couvertes par la présente méthode d'essai sont les suivants:
 - identification de la toxicité chronique d'une substance d'essai,
 - identification des organes cibles,
 - caractérisation de la relation dose-effet,
 - identification d'un niveau de dose sans effet nocif observé (DSENO) ou du point de départ pour l'établissement d'une dose de référence (DR),
 - prévision des effets de toxicité chronique aux niveaux représentatifs de l'exposition humaine,
 - obtention de données permettant de vérifier les hypothèses concernant le mode d'action (6).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

7. Lors de l'évaluation des caractéristiques toxicologiques d'une substance chimique d'essai, le laboratoire chargé de l'étude prend en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de réaliser l'étude, afin de pouvoir orienter celle-ci de manière à tester plus efficacement le potentiel de toxicité chronique, et faire le moins possible appel aux animaux. Les informations utiles pour concevoir l'étude sont notamment: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les informations éventuelles sur son mode d'action; les résultats d'éventuelles études de toxicité in vitro ou in vivo; l'utilisation (les utilisations) prévue(s) et le potentiel d'exposition humaine; les données Q(SAR) disponibles et les données toxicologiques relatives aux substances chimiques structurellement apparentées; les données toxicocinétiques disponibles (dose unique et doses répétées, si ces données existent) et les résultats d'autres études à doses répétées. La détermination de la toxicité chronique n'est effectuée qu'après obtention des premiers résultats d'essais de toxicité à doses répétées sur 28 jours et/ou 90 jours. Il convient d'envisager l'adoption d'une approche par étapes pour les essais de toxicité chronique entrepris dans le cadre de l'évaluation globale des effets nocifs potentiels d'une substance d'essai particulière (11) (12) (13) (14).
8. Les méthodes statistiques les plus appropriées pour l'analyse des résultats, compte tenu du plan expérimental et des objectifs de l'étude, sont identifiées avant le début de l'étude. Il convient notamment de déterminer si les statistiques doivent prendre en compte l'ajustement en fonction de la survie et l'analyse effectuée en cas de mort prématurée des animaux d'un ou plusieurs groupes. On trouvera des indications concernant les analyses statistiques appropriées, ainsi que des références clés à des méthodes statistiques reconnues au plan international, dans le document d'orientation n° 116 (6) ainsi que dans le document d'orientation n° 35 sur l'analyse et l'évaluation des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (15).
9. Lors de la réalisation d'une étude de toxicité chronique, il est recommandé de toujours suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques en tant qu'effets mesurés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (16). Le paragraphe 62 de ce document, en particulier, stipule ce qui suit: *"Dans les études comportant l'administration de doses répétées, lorsqu'un animal présente des signes cliniques progressifs de détérioration de son état, une décision d'euthanasier ou non l'animal est prise en connaissance de cause. Cette décision met en balance des facteurs tels que la valeur des informations pouvant être obtenues en maintenant l'animal dans l'étude d'une part, et l'état général de celui-ci d'autre part. Si la décision est prise de poursuivre l'essai sur cet animal, la fréquence des observations est augmentée selon les besoins. Il est aussi possible, sans toutefois nuire à l'objectif de l'essai, d'interrompre l'administration de la substance d'essai pour soulager la douleur ou la détresse de l'animal, ou de réduire la dose testée."*
10. On trouvera des informations détaillées et une discussion sur les principes déterminant le choix des doses pour les études de toxicité chronique et de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (6) ainsi que dans deux publications de l'Institut international des sciences de la vie (17) (18). La stratégie de base pour le choix des doses dépend du ou des objectifs principaux de l'étude (paragraphe 6). En choisissant des niveaux de dose appropriés, il convient de trouver un équilibre entre, d'une part, l'identification des dangers et, d'autre part, la caractérisation des réponses aux faibles doses et leur pertinence. Cet équilibre est particulièrement nécessaire dans le cas où une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe) est menée (paragraphe 11).
11. Il convient d'examiner l'opportunité de réaliser une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe), plutôt que de réaliser séparément une étude de toxicité chronique (la présente méthode d'essai B.30) et une étude de cancérogenèse (chapitre B.32 de la présente annexe). L'essai combiné permet une meilleure efficacité en temps et en coûts, par rapport à la conduite de deux essais séparés, et ne compromet pas la qualité des données de la phase chronique ou de la phase de cancérogenèse. Toutefois, les principes déterminant le choix de la dose (paragraphe 9 et 20-25) sont respectés rigoureusement lors de la réalisation d'une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe); il est reconnu également que certains cadres réglementaires peuvent imposer la conduite d'études séparées.
12. Les définitions utilisées dans le contexte de la présente méthode d'essai figurent dans le document d'orientation n° 116 (6).

PRINCIPE DE L'ESSAI

13. La substance d'essai est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives, en général pendant une période de 12 mois, bien que des durées plus longues ou plus courtes puissent aussi être choisies, en fonction des exigences réglementaires (voir paragraphe 33). Cette durée est assez longue pour permettre aux effets de toxicité cumulée de se manifester, tout en évitant les effets perturbateurs des changements liés au vieillissement. Les déviations par rapport à une durée d'exposition de 12 mois sont justifiées, surtout dans le cas de durées plus courtes. La substance d'essai est normalement administrée par voie orale, mais la voie inhalatoire ou la voie cutanée peut aussi être appropriée. Un ou plusieurs sacrifices en cours d'étude peuvent aussi être prévus, par exemple à 3 et 6 mois, auquel cas des groupes d'animaux supplémentaires pourront être enrôlés (voir paragraphe 19). Au cours de la période d'administration, les animaux sont examinés soigneusement afin de déceler tout signe de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces animales

14. La présente méthode d'essai traite principalement de la caractérisation et de l'évaluation de la toxicité chronique chez les rongeurs (voir paragraphe 2), bien que certains régimes réglementaires puissent exiger la réalisation d'études similaires chez des non-rongeurs. Dans ce cas, le choix de l'espèce est justifié. S'il s'avérait nécessaire de réaliser des études de toxicité chronique avec des non-rongeurs, le plan et la conduite de l'étude devraient être conformes aux principes décrits dans la présente méthode d'essai ainsi qu'au chapitre B.27 de la présente annexe (Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours) (5). Des informations additionnelles sur le choix des espèces et des souches sont disponibles dans le document d'orientation n° 116 (6).
15. La présente méthode d'essai se rapporte essentiellement au rat, mais d'autres espèces de rongeurs, comme la souris, peuvent être utilisées. Les rats et les souris sont les modèles expérimentaux choisis de préférence, en raison de leur courte durée de vie, de leur utilisation fréquente dans les études pharmacologiques et toxicologiques, de leur sensibilité à l'induction de tumeurs, et de la disponibilité de souches suffisamment caractérisées. Ces caractéristiques permettent d'obtenir une grande quantité d'informations sur la physiologie et la pathologie de ces animaux. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains, de souches communément utilisées dans les laboratoires. L'étude de toxicité chronique sera effectuée de préférence sur des animaux de même souche et de même provenance que ceux utilisés dans l'étude (les études) de toxicité préliminaire(s) de plus courte durée. Les femelles sont nullipares et non gravides.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

16. Les animaux peuvent être logés individuellement ou réunis dans des cages en petits groupes du même sexe, l'hébergement individuel n'étant à envisager que dans des cas scientifiquement justifiés (19) (20) (21). Les cages sont placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats soit réduite au minimum. La température du local des animaux d'expérience est de 22 °C ($\pm$ 3 °C). L'humidité relative est d'au moins 30 % et n'excède pas de préférence 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit comprise entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire, avec eau potable à satiété. Il satisfait tous les besoins nutritionnels de l'espèce étudiée, et la teneur en contaminants alimentaires susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai (résidus de pesticides, polluants organiques persistants, phyto-œstrogènes, métaux lourds et mycotoxines, par exemple) est aussi faible que possible. Des données analytiques sur les teneurs en nutriments et en contaminants alimentaires sont recueillies régulièrement, au moins au début de l'étude et lors des changements de lots; ces données figurent dans le rapport final. Des données analytiques sur l'eau de boisson utilisée dans le cadre de l'étude sont de même fournies. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai, et de satisfaire les besoins nutritionnels des animaux lorsque la substance d'essai est administrée dans la nourriture.

Préparation des animaux

17. Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions de laboratoire depuis au moins 7 jours, et n'ayant jamais été soumis auparavant à des protocoles expérimentaux. Dans le cas des rongeurs, l'administration de la substance commence dès que possible après le sevrage et l'acclimatation, et de préférence avant l'âge de 8 semaines. L'espèce, la souche, la provenance, le sexe, le poids et l'âge des animaux d'expérience sont précisés. Au début de l'étude, la variation de poids des animaux de chaque sexe est minimale, et n'excède pas $\pm$ 20 % du poids moyen de tous les animaux étudiés, et ce pour chaque sexe séparément. Les animaux sont affectés de manière aléatoire aux différents groupes (témoins et traités). Après la randomisation, les poids moyens des groupes de chaque sexe ne présentent pas de différences significatives. En cas de différences statistiquement significatives, la phase de randomisation est répétée dans la mesure du possible. Chaque animal reçoit un numéro d'identification unique et en est marqué de manière permanente par tatouage, implant de micro-puce ou toute autre méthode appropriée.

PROTOCOLE

Nombre et sexe des animaux

18. Il convient d'utiliser des animaux des deux sexes. Leur nombre est suffisant pour qu'à la fin de l'étude, chaque groupe contienne un nombre de sujets permettant d'effectuer une évaluation statistique et biologique complète. Pour les rongeurs, il convient normalement d'employer au moins 20 animaux de chaque sexe à chaque niveau de dose, tandis que pour les non-rongeurs, un minimum de 4 animaux de chaque sexe par groupe est recommandé. Dans les études utilisant des souris, il peut être nécessaire de prévoir des animaux supplémentaires dans chaque groupe de dose pour pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis.

Sacrifices en cours d'étude, groupes satellites et animaux sentinelles

19. L'étude peut prévoir le sacrifice d'animaux en cours d'étude (au moins 10 animaux de chaque sexe par groupe), par exemple à 6 mois, afin de recueillir des données sur la progression des changements toxicologiques et des informations mécanistiques, si cela est scientifiquement justifié. Si l'on dispose déjà de ces données, obtenues antérieurement lors d'études de toxicité à doses répétées sur la substance d'essai, les sacrifices en cours d'étude peuvent ne pas être scientifiquement justifiés. Des groupes satellites peuvent également être constitués, afin de contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance chimique étudiée. En général, ces investigations portent uniquement sur les doses maximales de l'étude et sur le groupe témoin. Un groupe supplémentaire d'animaux sentinelles (généralement 5 animaux de chaque sexe) peut être inclus si

nécessaire pour le suivi de l'état pathologique au cours de l'étude (22). Si des sacrifices en cours d'étude ou l'inclusion de groupes sentinelles ou satellites sont prévus, le nombre d'animaux utilisés dans l'étude est augmenté du nombre d'animaux que l'on prévoit de sacrifier avant l'achèvement de l'étude. Ces animaux sont normalement sujets aux mêmes observations que ceux soumis à la phase de toxicité chronique de l'étude principale, notamment en ce qui concerne le poids corporel, la prise d'aliments et d'eau, les mesures hématologiques et de biochimie clinique et les examens pathologiques. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude) pour limiter ces observations à des mesures essentielles spécifiques telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité.

Groupes de dose et dosage

20. Le document d'orientation n° 116 (6), donne des indications sur tous les aspects du choix des doses et des écarts entre les doses. Il convient d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin, sauf si un essai limite est pratiqué (voir paragraphe 27). Les niveaux de doses seront généralement basés sur les résultats d'études à plus court terme à doses répétées, ou d'études préliminaires de détermination des concentrations, et prennent en compte toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques existantes relatives à la substance d'essai ou aux substances chimiques apparentées.
21. À moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques de la substance d'essai, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance, tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés. Compte tenu des facteurs présentés au paragraphe 22 ci-dessous, le niveau de dose le plus élevé est choisi pour provoquer une manifestation de toxicité, par exemple un ralentissement de la prise de poids corporel (d'environ 10 %).
22. Toutefois, en fonction des objectifs de l'étude (voir paragraphe 6), on pourra choisir un niveau de dose maximal plus faible que la dose qui provoque des signes de toxicité; par exemple une dose entraînant un effet indésirable préoccupant, mais dont l'impact sur l'espérance de vie ou le poids corporel reste faible. La dose maximale ne dépasse pas 1 000 mg/kg de poids corporel (dose limite, voir paragraphe 27).
23. Les niveaux de dose et les intervalles entre les doses peuvent être choisis de manière à pouvoir établir une relation dose-réponse et une DSENO ou tout autre résultat escompté de l'étude, notamment une DR (voir paragraphe 25) au plus bas niveau de dose. Les facteurs à prendre en compte dans le choix des faibles doses sont notamment la pente attendue de la courbe dose-réponse, les doses qui provoquent des changements métaboliques importants ou qui modifient notablement le mode d'action toxique, le niveau auquel on peut prévoir un seuil, ou celui auquel on peut prévoir de fixer un point de départ pour une extrapolation aux faibles doses.
24. Les intervalles entre les doses dépendront des caractéristiques de la substance d'essai, et ne peuvent donc pas être prescrits dans la présente méthode d'essai, mais des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes, et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (correspondant par exemple à un facteur de plus de 6 à 10) entre les doses. En général, les facteurs supérieurs à 10 sont évités, et leur utilisation fait l'objet d'une justification.
25. Comme le précise le document d'orientation n° 116 (6), les facteurs à prendre en compte dans le choix des doses sont notamment les suivants:
 - non-linéarités ou points d'inflexion connus ou supposés de la courbe dose-réponse,
 - toxicocinétique et gammes de doses auxquelles l'induction métabolique, la saturation ou la non-linéarité entre des doses externes et internes surviennent ou non,
 - lésions précurseurs, marqueurs d'effets ou indicateurs du déroulement de processus biologiques clés sous-jacents,
 - aspects principaux (ou présumés) du mode d'action, par exemple doses auxquelles une cytotoxicité commence à se manifester, les dosages hormonaux sont perturbés, les mécanismes homéostatiques sont dépassés, etc.,
 - régions de la courbe dose-réponse nécessitant une estimation particulièrement précise, par exemple dans le domaine de la DR prévue ou d'un seuil présumé,
 - prise en compte des niveaux prévus d'exposition humaine.
26. Le groupe témoin est un groupe non-traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance d'essai est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin sont traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé pour les groupes traités. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et entraîne une diminution sensible de la prise de nourriture liée à une moindre appétence de celle-ci, il pourra être utile d'utiliser un groupe témoin supplémentaire nourri en parallèle, qui constituerait un témoin plus approprié.

27. S'il est possible d'anticiper, en se basant sur les résultats d'études préliminaires, qu'un essai à dose unique, équivalant au moins à 1 000 mg/kg poids corporel/jour, réalisé en suivant les procédures décrites pour la présente étude, ne produira probablement pas d'effets indésirables, et si la toxicité est improbable compte tenu des données disponibles sur les substances chimiques structurellement apparentées, on peut considérer qu'une étude complète à trois niveaux de dose n'est pas indispensable. Une limite de 1 000 mg/kg poids corporel/jour peut s'appliquer sauf si l'exposition humaine indique qu'il est nécessaire de recourir à un niveau de dose plus élevé.

Préparation des doses et administration de la substance d'essai

28. La substance d'essai est normalement administrée par voie orale, soit dans la nourriture ou l'eau de boisson, soit par gavage. Des informations complémentaires sur les voies et méthodes d'administration figurent dans le document d'orientation n° 116 (6). La voie et le mode d'administration dépendent de la finalité de l'étude, des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, de sa biodisponibilité, ainsi que de la voie et du mode prédominants d'exposition humaine. Il convient de justifier le choix de la voie et du mode d'administration. Dans l'intérêt des animaux, le gavage oral n'est normalement choisi que pour les substances pour lesquelles cette voie et ce mode d'administration correspondent à une voie d'exposition potentielle raisonnable chez l'homme (produits pharmaceutiques, par exemple). Dans le cas des produits chimiques alimentaires ou environnementaux, notamment les pesticides, l'administration se fait d'ordinaire via le régime alimentaire ou l'eau de boisson. Toutefois, dans certains contextes, tels que l'exposition professionnelle, l'administration par d'autres voies peut être plus appropriée.
29. Si nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il convient de prendre en compte les caractéristiques suivantes du véhicule et des autres additifs, s'il y a lieu: effets sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la prise d'aliments ou d'eau, ou sur l'état nutritionnel des animaux. Il est recommandé, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager en premier lieu l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, puis celle d'une solution ou d'une émulsion dans une huile (par exemple huile de maïs), et en dernier lieu celle d'une solution dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules autres que l'eau sont connues. Il convient de disposer d'informations sur la stabilité de la substance d'essai et sur l'homogénéité des solutions ou rations contenant les différentes doses (selon les cas) dans les conditions d'administration (nourriture, par exemple).
30. Il importe de veiller à ce que les quantités de substances administrées dans les aliments ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou avec l'équilibre hydrique. Dans les études de toxicité à long terme faisant intervenir une administration par voie alimentaire, la concentration de la substance d'essai dans les aliments ne dépasse pas normalement 5 % de la ration totale, afin d'éviter les déséquilibres nutritionnels. Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (mg/kg d'aliment ou ppm), soit un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal (mg/kg de poids corporel), calculé sur une base hebdomadaire. La solution choisie est spécifiée.
31. En cas d'administration par voie orale, les animaux reçoivent une dose quotidienne de la substance d'essai (à raison de sept jours par semaine), et ce normalement pendant une période de 12 mois (voir également le paragraphe 33) encore qu'une durée plus longue puisse être requise selon les prescriptions réglementaires. Tout autre régime de dosage, par exemple une administration cinq jours par semaine, fait l'objet d'une justification. En cas d'administration par voie cutanée, les animaux reçoivent normalement le traitement pendant au moins 6 heures par jour, 7 jours par semaine, comme le précise le chapitre B.9 de la présente annexe (10), et ce pendant une période de 12 mois. L'exposition par inhalation est réalisée pendant 6 heures par jour, 7 jours par semaine, mais il est possible, si cela se justifie, de limiter l'exposition à 5 jours par semaine. La période d'exposition est normalement de 12 mois. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées "nez seul", il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le choix d'une durée d'exposition inférieure à 6 heures par jour devra être justifié. Voir également le chapitre B.8 de la présente annexe (8).
32. Lorsque la substance d'essai est administrée aux animaux par gavage, l'opération est pratiquée aux mêmes moments de la journée au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Normalement, une dose unique sera administrée une fois par jour mais lorsque, par exemple, la substance chimique est un irritant local, il pourra être envisagé de maintenir la dose quotidienne en la fractionnant (deux fois par jour). Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Le volume est maintenu aussi faible que possible et ne dépasse pas normalement 1 ml/100 g de poids corporel pour les rongeurs (22). Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à tous les niveaux de doses. Les substances potentiellement corrosives ou irritantes sont l'exception et leur dilution permet d'éviter tout effet local sévère. Il convient d'éviter les concentrations d'essai susceptibles d'être corrosives ou irritantes pour le tube digestif.

Durée de l'étude

33. Bien que la présente méthode d'essai concerne principalement des essais de toxicité chronique d'une durée de 12 mois, le plan de l'étude permet une application de durée plus courte (6 à 9 mois par exemple) ou plus longue (18 à 24 mois), pour répondre aux exigences de régimes réglementaires particuliers ou obtenir des données mécanistiques spécifiques. Les déviations par rapport à une durée d'exposition de 12 mois font l'objet de justifications, surtout dans le cas de durées plus courtes. Les groupes satellites inclus pour contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance d'essai sont maintenus sans traitement, pendant une période d'au moins 4 semaines et d'au plus un tiers de la durée totale de l'étude, après la cessation de l'exposition. Le document d'orientation n° 116 (6) fournit des indications supplémentaires, notamment en ce qui concerne la survie des animaux d'expérience.

OBSERVATIONS

34. Tous les animaux sont soumis à un examen quotidien, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris, pour déterminer la morbidité et la mortalité. Des observations cliniques sont effectuées au moins une fois par jour, de préférence au(x) même(s) moment(s) de la journée, en tenant compte du moment où l'on prévoit que les effets des différentes doses atteindront leur intensité maximale après administration par gavage.
35. Tous les animaux font l'objet d'observations cliniques détaillées au moins une fois avant la première exposition (pour permettre des comparaisons intra-individuelles), à la fin de la première semaine de l'étude, et une fois par mois ensuite. Les observations respectent un protocole qui réduit au minimum les variations entre observateurs, et les rend indépendantes du groupe testé. Ces observations sont effectuées hors de la cage où sont logés les animaux, de préférence dans une enceinte normalisée et à heures fixes. Elles sont soigneusement consignées, de préférence en utilisant un système de cotation explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Les conditions d'observation demeurent aussi constantes que possible. Les observations portent notamment porter sur les symptômes suivants (sans que cette liste soit exhaustive): modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux et des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions, et réactions neurovégétatives (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, variation du diamètre pupillaire, respiration anormale). Il convient également de consigner les changements dans la démarche, la posture et les réactions à la manipulation, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques et les comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou bizarres (par exemple, automutilation, marche à reculons) (24).
36. Avant la première administration de la substance d'essai, tous les animaux font l'objet d'un examen ophtalmologique effectué à l'aide d'un ophtalmoscope ou de tout autre appareil approprié. À l'issue de l'étude, cet examen est réalisé de préférence sur tous les animaux, mais au moins sur ceux du groupe traités à la dose la plus élevée et du groupe témoin. Si des altérations oculaires liées au traitement sont détectées, tous les animaux sont examinés. Si l'analyse structurale ou d'autres données suggèrent une toxicité oculaire, il faut augmenter la fréquence des examens oculaires.
37. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets neurotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 jours et/ou 90 jours, une vérification de la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (24) (stimuli auditifs, visuels ou proprioceptifs, par exemple) (25) (26) (27), et une évaluation de la force de préhension (28) ainsi que de l'activité motrice (29) pourront être menées en option. Elles seront réalisées avant le début de l'étude et tous les 3 mois par la suite, jusqu'à 12 mois inclusivement, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois). On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. Toutefois, d'autres modes opératoires que ceux figurant dans ces références sont également utilisables.
38. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets immunotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 jours et/ou 90 jours, d'autres examens sur cet effet peuvent être menés en option à la fin de l'étude.

Poids corporel, prise d'aliments et d'eau, et efficacité nutritionnelle

39. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La prise d'aliments et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la prise d'eau est mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la prise d'eau dans les études où celle-ci est modifiée.

Hématologie et biochimie clinique

40. Dans les études faisant intervenir des rongeurs, des examens hématologiques sont effectués sur au moins 10 mâles et 10 femelles de chaque groupe, à 3, 6 et 12 mois, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois), en utilisant les mêmes animaux tout au long de l'étude. Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis (voir paragraphe 18). Dans les études faisant intervenir des non- rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple, 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien) à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, si aucun effet sur les paramètres hématologiques n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Les échantillons de sang sont prélevés en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbitaire, sous anesthésie.
41. Les investigations portent sur les paramètres suivants (30): numération leucocytaire totale et différentielle, numération érythrocytaire et plaquettaire, concentration d'hémoglobine, hématocrite (volume cellulaire sanguin après centrifugation), volume corpusculaire moyen (VCM), hémoglobine corpusculaire moyenne (HCM), concentration d'hémoglobine corpusculaire moyenne (CHCM), temps de prothrombine et temps de thromboplastine partielle activée. D'autres paramètres hématologiques tels que les corps de Heinz et autres anomalies morphologiques érythrocytaires ou la méthémoglobine peuvent être étudiés si nécessaire en fonction de la toxicité de la substance d'essai. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance d'essai donnée. Si la substance d'essai exerce un effet sur le système hématopoïétique, des numérations réticulocytaires et une cytologie médullaire peuvent également être indiquées mais n'ont pas à être pratiquées de manière systématique.

42. Des analyses de biochimie clinique visant à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur le rein et le foie, sont effectuées à partir d'échantillons de sang prélevés sur au moins 10 mâles et 10 femelles de chaque groupe, à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques, et en utilisant les mêmes animaux tout au long de l'étude. Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer toutes les analyses de biochimie clinique nécessaires. Dans les études faisant intervenir des non-rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple, 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien) à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, si aucun effet sur les paramètres de biochimie clinique n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Il est recommandé de faire jeûner les animaux (à l'exception des souris) pendant la nuit qui précède la prise de sang. Les investigations portent sur les paramètres suivants (30): glucose, urée (azote uréique), créatinine, protéines totales, albumine, calcium, sodium, potassium, cholestérol total, au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatocellulaires (alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase, glutamate déshydrogénase, acides biliaires totaux) (31) et au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatobiliaires (phosphatase alcaline, gamma-glutamyl transférase, 5'-nucléotidase, bilirubine totale, acides biliaires totaux) (31). D'autres paramètres de chimie clinique, tels que les triglycérides à jeun, des hormones spécifiques et la cholinestérase peuvent être mesurés si nécessaire en fonction de la toxicité de la substance d'essai. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance d'essai donnée.
43. Des analyses d'urine sont effectuées à partir d'échantillons prélevés sur au moins 10 mâles et 10 femelles de chaque groupe, à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques et de chimie clinique. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des dosages à 3 mois si les analyses d'urine pratiquées dans le cadre d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables n'ont révélé aucun effet. La liste suivante de paramètres à étudier fait partie d'une recommandation d'experts relative aux études de pathologie clinique (30): aspect, volume, osmolalité ou poids spécifique, pH, protéines totales et glucose. D'autres mesures, notamment la recherche de corps cétoniques, d'urobilinogène, de bilirubine et de sang occulte, peuvent aussi être réalisées. L'étude d'autres paramètres peut aussi s'avérer nécessaire pour élargir les recherches sur l'effet ou les effets observés.
44. On considère généralement que dans les études portant sur des chiens, il convient de déterminer les variables hématologiques et de biochimie clinique de base avant le début du traitement, mais que ce n'est pas indispensable dans les études portant sur des rongeurs (30). Toutefois, si l'on ne dispose pas de données historiques de base appropriées (voir paragraphe 50), il convient d'envisager d'en obtenir

Pathologie

Autopsie macroscopique

45. Tous les animaux de l'étude font normalement l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude ou les groupes satellites) pour limiter ces observations à des mesures essentielles telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité (voir paragraphe 19). Il n'est pas nécessaire que ces animaux fassent l'objet d'une autopsie, ni des procédures ultérieures décrites dans les paragraphes qui suivent. L'autopsie des animaux sentinelles peut devoir être effectuée au cas par cas, à la discrétion du directeur d'étude.
46. Il convient de déterminer le poids des organes de tous les animaux hormis ceux mentionnés dans la dernière partie du paragraphe 45. Les glandes surrénales, le cerveau, les épидидymes, le cœur, les reins, le foie, les ovaires, la rate, les testicules, la thyroïde (pesée après fixation, avec les glandes parathyroïdes) et l'utérus de tous les animaux (excepté ceux trouvés moribonds et/ou ayant été sacrifiés en cours d'étude) sont débarrassés, le cas échéant, de tout tissu adhérent et pesés à l'état frais dès que possible après la dissection, pour prévenir la dessiccation. Dans les études chez la souris, la pesée des glandes surrénales est facultative.
47. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (32) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif):

toutes les lésions macroscopiques	ganglions lymphatiques (superficiels et profonds)	muscle squelettique	rein
aorte	glande coagulante	nerf périphérique	[sternum]
[bulbe olfactif]	glande de Harder	[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]	testicule
cæcum	glande lacrymale (exorbitale)	cœil (dont rétine)	thymus
cerveau (y compris segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)	œsophage	thyroïde
cœur	glande salivaire	ovaire	trachée

col utérin	glande surrénale	pancréas	[uretère]
côlon	hypophyse	parathyroïde	[urètre]
[dents]	iléon	peau	utérus (col inclus)
duodénum	jéjunum	poumon	vagin
épididyme	[langue]	prostate	vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)
estomac (pré-estomac, estomac glandulaire)	moelle épinière (niveaux cervical, mésos thoracique et lombaire)	rate	vésicule séminale
[fémur avec articulation]	segment de moelle osseuse et/ou moelle osseuse fraîchement ponctionnée	rectum	vessie
foie			

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues de la substance d'essai sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu de conserver les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale, et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Pour les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des chapitres B.8 (8) et B.29 (9) de la présente annexe. Pour les autres organes et tissus (autre les tissus de l'appareil respiratoire spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

Histopathologie

48. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (32). Au minimum, les examens histopathologiques devront porter sur les tissus suivants:

- tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin,
- tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude,
- tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques,
- tissus des organes cibles, ou tissus présentant des altérations dues au traitement dans le groupe à dose élevée, prélevés sur tous les animaux de tous les autres groupes de doses,
- dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

49. Des données sont recueillies pour chaque animal sur tous les paramètres évalués. En outre, toutes les données sont résumées sous forme de tableaux synoptiques indiquant, pour chaque groupe expérimental, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés, ainsi que le moment de l'apparition, la durée et la gravité de tous les effets toxiques observés, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les tableaux récapitulatifs présentent les moyennes et les écarts types (pour les données recueillies en continu) pour les animaux présentant des effets toxiques ou des lésions, ainsi qu'une cotation des lésions.

50. Les données de contrôle historiques peuvent faciliter l'interprétation des résultats de l'étude, par exemple lorsque les données provenant des témoins concurrents semblent diverger de manière significative de données récentes obtenues sur des animaux témoins issus de la même installation d'essai/colonie d'élevage. Si elles sont évaluées, les données de contrôle historiques émanent du même laboratoire et porter sur des animaux du même âge et de la même souche, produits dans les cinq ans précédant l'étude en question.
51. Si possible, les résultats numériques devront être évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Les méthodes statistiques et les données à analyser sont choisies au moment de la conception de l'étude (paragraphe 8). Ce choix permet d'opérer des ajustements en fonction de la survie, si nécessaire.

Rapport d'essai

52. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Substance d'essai:

- état physique, pureté et propriétés physico-chimiques,
- données d'identification,
- provenance de la substance d'essai,
- numéro de lot,
- certificat d'analyse chimique.

Véhicule (le cas échéant):

- justification du choix de véhicule (s'il est autre que l'eau).

Animaux d'expérience:

- espèce/souche utilisée et justification du choix opéré,
- nombre, âge et sexe des animaux au début de l'essai,
- provenance, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions expérimentales:

- justification de la voie d'administration et du choix des doses,
- le cas échéant, méthodes statistiques utilisées pour analyser les données,
- détails concernant la formulation de la substance d'essai ou son incorporation dans les aliments,
- données analytiques sur la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,
- voie d'administration et détails concernant l'administration de la substance d'essai,
- pour les études par inhalation, mention de la voie d'entrée (nez seul ou corps entier),
- doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et, le cas échéant, facteur de conversion en dose réelle de la concentration de la substance d'essai (en mg/kg ou en ppm) dans les aliments ou l'eau de boisson,
- détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats (les résultats comprendront des données générales sous forme de tableaux synoptiques et des données propres à chaque animal):

- données sur la survie,
- poids corporel/variations du poids corporel,
- prise d'aliments, calculs de l'efficacité alimentaire, si effectués, et prise d'eau, le cas échéant,
- réponse toxique par sexe et dose, y compris signes de toxicité,
- nature, incidence (et, si elle est évaluée, sévérité), et durée des observations cliniques (transitoires ou permanentes),
- examen ophtalmologique,
- examens hématologiques,
- épreuves de biochimie clinique,
- examens d'urine,
- résultats des recherches de neurotoxicité ou d'immunotoxicité,
- poids corporel à l'issue de l'essai,
- poids des organes (et leur rapport au poids corporel, le cas échéant),
- résultats d'autopsie,
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques liés au traitement,
- données relatives à l'absorption, le cas échéant.

Traitement statistique des résultats, le cas échéant

Discussion des résultats, notamment:

- relations dose-réponse,
- examen de toutes les informations concernant le mode d'action,
- examen de toutes les approches de modélisation,
- détermination des DR, DSENO et DMENO (dose minimale avec effet nocif observé),
- données de contrôle historiques,
- applicabilité des résultats à l'être humain.

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), document de travail interne, direction de l'environnement, OCDE, Paris.
- (2) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

- (3) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal- based toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 40, 145-191.
- (4) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206, 437-445.
- (5) Chapitre B.27 de la présente annexe, Toxicité orale subchronique, Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours.
- (6) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 et 453 – Second edition. Série sur les essais et évaluations n° 116, disponible sur le site public de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (www.oecd.org/env/testguidelines).
- (7) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.
- (8) Chapitre B.8 de la présente annexe, Toxicité subaiguë par inhalation: étude sur 28 jours.
- (9) Chapitre B.29 de la présente annexe, Toxicité subchronique par inhalation: étude sur 90 jours.
- (10) Chapitre B.9 de la présente annexe, Toxicité cutanée à doses répétées – étude sur 28 jours.
- (11) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1-7.
- (12) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.
- (13) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37-68.
- (14) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69-98.
- (15) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (16) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (17) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729 - 837.
- (18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (19) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).
- (20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, DC, US. Dept. of Health and Human Services.
- (21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

-
- (22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (23) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.
- (24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (25) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.
- (26) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691-704.
- (27) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.
- (28) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.
- (29) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.
- (30) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (31) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- (32) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.
-

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.»

6) les chapitres B.32 et B.33 sont remplacés par le texte suivant:

«B.32. ÉTUDES DE CANCÉROGÈNESE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 451 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La ligne directrice 451 initiale sur les études de cancérogenèse a été adoptée en 1981. Sa révision a été jugée nécessaire afin de tenir compte des évolutions récentes dans le domaine du bien-être animal, ainsi que des nouvelles exigences réglementaires (2) (3) (4) (5) (6). La mise à jour de la présente méthode d'essai B.32 a été effectuée en parallèle avec la révision des chapitres B.30 (études de toxicité chronique) et B.33 (études combinées de toxicité chronique et de cancérogenèse) de la présente annexe, dans le but d'obtenir des informations additionnelles à partir des animaux utilisés dans l'étude, et de fournir des précisions concernant le choix des doses. La présente méthode d'essai B.32 vise les essais portant sur une large gamme de produits chimiques, dont des pesticides et des produits chimiques industriels. Il convient toutefois de noter que certains aspects et certaines dispositions peuvent différer pour les produits pharmaceutiques (voir la Conférence internationale sur l'harmonisation, thème S1B: évaluation de la cancérogénicité des produits pharmaceutiques).
2. La plupart des études de cancérogenèse étant menées sur des espèces de rongeurs, la présente méthode d'essai est destinée à s'appliquer principalement à des études réalisées avec ces espèces. S'il s'avérait nécessaire de mener de telles études avec des non-rongeurs, il conviendrait d'appliquer, moyennant des modifications appropriées, les principes et procédures décrits dans la présente méthode d'essai et au chapitre B.27 – Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours – de la présente annexe (6). Des informations complémentaires peuvent aussi être trouvées dans le document d'orientation de l'OCDE n° 116 sur l'élaboration et la conduite des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (7).
3. Les trois principales voies d'administration utilisées dans les études de cancérogenèse sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance d'essai et de la voie d'exposition prédominante chez l'homme. Des informations complémentaires sur le choix de la voie d'exposition sont fournies dans le document d'orientation n° 116 (7).
4. La présente méthode d'essai porte principalement sur l'exposition par voie orale, la voie la plus communément utilisée dans les études de cancérogenèse. Bien que des études de cancérogenèse utilisant l'exposition par voie cutanée ou par inhalation puissent aussi être nécessaires pour évaluer le risque pour la santé humaine et/ou exigées en vertu de certains régimes réglementaires, ces deux voies d'exposition nécessitent des dispositifs techniques d'une grande complexité. De telles études devront être conçues au cas par cas, encore que la présente méthode d'essai, qui porte sur la caractérisation et l'évaluation de la cancérogénicité par voie orale, puisse fournir les bases d'un protocole d'étude par voie cutanée ou par inhalation, notamment en ce qui concerne les recommandations relatives aux durées de traitement, aux paramètres cliniques et pathologiques, etc. Il existe des documents d'orientation de l'OCDE sur l'administration expérimentale de substances d'essai par voie cutanée (7) et par inhalation (7) (8). Les chapitres B.8 (9) et B.29 (10) de la présente annexe, ainsi que le document d'orientation de l'OCDE sur l'essai de toxicité aiguë par inhalation (8), méritent tout particulièrement d'être consultés lors de la conception d'études à long terme portant sur une exposition par inhalation. Le chapitre B.9 de la présente annexe (11) doit être consulté dans le cas d'un essai portant sur la voie cutanée.
5. L'étude de cancérogenèse donne des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée pendant une période pouvant couvrir la vie entière de l'espèce considérée. L'étude fournit des informations sur les effets toxiques de la substance d'essai, y compris sur son pouvoir cancérogène, et peut indiquer les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes. Elle peut aussi donner une estimation de la dose sans effet nocif observé pour ce qui est des effets toxiques et, dans le cas des substances cancérogènes non génotoxiques, des réponses tumorales. Cette estimation permet d'établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine. De plus, il convient d'accorder une attention particulière à l'observation clinique des animaux afin d'obtenir le plus d'informations possibles.
6. Les objectifs des études de cancérogenèse couvertes par la présente méthode d'essai sont les suivants:
 - identification des propriétés cancérogènes d'une substance d'essai susceptibles d'augmenter les risques de néoplasmes, la fréquence de survenue de néoplasmes malins ou la diminution du temps nécessaire à leur apparition, par rapport aux groupes témoins concurrents,
 - identification d'un ou de plusieurs organes cibles de la cancérogenèse,
 - identification du temps d'apparition des néoplasmes,

- caractérisation de la relation entre la dose administrée et la réponse tumorale,
- identification du niveau de dose sans effet nocif observé (DSENO) ou du point de départ pour l'établissement d'une dose de référence (DR),
- extrapolation des effets cancérogènes aux niveaux d'exposition humaine correspondant à de faibles doses,
- obtention de données permettant de vérifier les hypothèses concernant le mode d'action (2) (7) (12) (13) (14) (15).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

7. Pour caractériser et évaluer la cancérogénicité potentielle d'un produit chimique, le laboratoire chargé de l'étude prend en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de réaliser l'étude, afin de pouvoir orienter celle-ci de manière à tester plus efficacement le potentiel cancérogène de la substance, et faire le moins possible appel aux animaux. La connaissance du mode d'action d'un agent cancérogène suspecté et sa prise en compte (2) (7) (12) (13) (14) (15) sont particulièrement importantes puisque la conception optimale de l'essai peut différer selon que la substance d'essai est ou n'est pas un agent cancérogène génotoxique connu ou suspecté. Des informations complémentaires sur certains aspects du mode d'action peuvent être trouvées dans le document d'orientation n° 116 (7).
8. Les informations utiles pour concevoir l'étude sont notamment: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les résultats de toutes les études de toxicité in vitro ou in vivo menées et notamment des essais de génotoxicité; l'utilisation (les utilisations) prévue(s) et le potentiel d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques (par exemple mutagénicité, génotoxicité et pouvoir cancérogène) relatives aux substances chimiques structurellement apparentées; les données toxicocinétiques disponibles (dose unique et doses répétées, si ces données existent) et les résultats d'autres études à doses répétées. La caractérisation du pouvoir cancérogène est effectuée après obtention des premiers résultats d'essais de toxicité à doses répétées menés sur 28 jours et/ou 90 jours. Les essais d'initiation-promotion de cancers à court terme peuvent aussi livrer des informations utiles. Il convient d'envisager l'adoption d'une approche par étapes pour l'étude expérimentale de la cancérogenèse entreprise dans le cadre de l'évaluation globale des effets nocifs potentiels d'une substance d'essai (16) (17) (18) (19).
9. Les méthodes statistiques les plus appropriées pour l'analyse des résultats, compte tenu du plan expérimental et des objectifs de l'étude, sont identifiées avant le début de l'étude. Il convient notamment de déterminer si les statistiques doivent prendre en compte l'ajustement en fonction de la survie, l'analyse des risques de tumeurs cumulées liés à la durée de survie, l'analyse du temps nécessaire à l'apparition d'une tumeur et l'analyse effectuée en cas de mort prématurée des animaux d'un ou de plusieurs groupes. On trouvera des indications concernant les analyses statistiques appropriées, ainsi que des références clés à des méthodes statistiques reconnues au plan international, dans le document d'orientation n° 116 (7), ainsi que dans le document d'orientation n° 35 sur l'analyse et l'évaluation des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (20).
10. Lors de la réalisation d'une étude de cancérogenèse, il est recommandé de toujours suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques comme effets observés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (21). Le paragraphe 62 de ce document, en particulier, stipule ce qui suit: *"Dans les études comportant l'administration de doses répétées, lorsqu'un animal présente des signes cliniques progressifs de détérioration de son état, une décision d'euthanasier ou non l'animal est prise en connaissance de cause. Cette décision met en balance des facteurs tels que la valeur des informations pouvant être obtenues en maintenant l'animal dans l'étude d'une part, et l'état général de celui-ci d'autre part. Si la décision est prise de poursuivre l'essai sur cet animal, la fréquence des observations est augmentée selon les besoins. Il est aussi possible, sans toutefois nuire à l'objectif de l'essai, d'interrompre l'administration de la substance d'essai pour soulager la douleur ou la détresse de l'animal, ou de réduire la dose testée."*
11. On trouvera des informations détaillées et une discussion sur les principes déterminant le choix des doses pour les études de toxicité chronique et de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (7), ainsi que dans deux publications de l'Institut international des sciences de la vie (22) (23). La stratégie de base pour le choix des doses dépend du ou des principaux objectifs de l'étude (paragraphe 6). En choisissant des niveaux de doses appropriés, il convient de trouver un équilibre entre, d'une part, l'identification des dangers et, d'autre part, la caractérisation des réponses aux faibles doses et leur pertinence. Cet équilibre est particulièrement nécessaire dans le cas où une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe) est menée (paragraphe 12).
12. Il convient d'examiner l'opportunité de réaliser une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (chapitre B.33 de la présente annexe) plutôt que de réaliser séparément une étude de toxicité chronique (chapitre B.30 de la présente annexe) et une étude de cancérogenèse (la présente méthode d'essai B.32). L'essai combiné permet une meilleure efficacité en temps et en coûts par rapport à la conduite de deux essais séparés, et ne compromet pas la qualité des données de la phase chronique ou de la phase de cancérogenèse. Lors de la réalisation d'une étude combinée (chapitre B.33 de la présente annexe), il convient toutefois de respecter les principes déterminant le choix de la dose (paragraphe 11 et 22 à 25) et il est également reconnu que certains cadres réglementaires peuvent imposer la conduite d'études séparées.

13. Les définitions utilisées dans le contexte de la présente méthode d'essai figurent à la fin du présent chapitre et dans le document d'orientation n° 116 (7).

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. La substance d'essai est administrée quotidiennement à différents groupes d'animaux, pendant la plus grande partie de leur vie, à des doses progressives et habituellement par la voie orale. Les essais par inhalation ou par la voie cutanée peuvent aussi être appropriés. Les animaux sont observés attentivement pendant la période d'administration afin de déceler d'éventuels signes de toxicité et le développement de lésions néoplasiques. Les animaux qui meurent ou sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces animales

15. La présente méthode d'essai traite principalement de la caractérisation et de l'évaluation de la cancérogénicité chez les rongeurs (paragraphe 2). Le recours à des espèces autres que des rongeurs peut être envisagé si les données disponibles laissent escompter une meilleure prédiction des effets de la substance sur la santé humaine. Dans ce cas, le choix de l'espèce est justifié. L'espèce de rongeur préférée est le rat, mais d'autres rongeurs comme la souris peuvent être utilisés. Bien que le recours à la souris dans les études de cancérogenèse puisse ne présenter qu'un intérêt limité (24) (25) (26), certains programmes réglementaires actuels exigent tout de même la conduite d'essais de cancérogenèse sur la souris, sauf lorsqu'il est établi qu'une telle étude n'est pas nécessaire sur le plan scientifique. Les rats et les souris sont les modèles expérimentaux choisis de préférence, en raison de leur durée de vie relativement courte, de leur utilisation fréquente dans les études pharmacologiques et toxicologiques, de leur sensibilité à l'induction de tumeurs et de la disponibilité de souches suffisamment caractérisées. Ces caractéristiques permettent d'obtenir une grande quantité d'informations sur la physiologie et la pathologie de ces animaux. Des informations additionnelles sur le choix des espèces et des souches sont disponibles dans le document d'orientation n° 116 (7).
16. Il convient d'employer des animaux adultes sains, de souches communément utilisées dans les laboratoires. L'étude de cancérogenèse sera effectuée de préférence sur des animaux de même souche et de même provenance que ceux utilisés dans l'étude (les études) de toxicité préliminaire(s) de plus courte durée. Si toutefois ces animaux sont réputés ne pas répondre aux critères de survie généralement admis dans les études à long terme [voir le document d'orientation n° 116 (7)], il convient d'envisager d'utiliser une souche d'un animal dont le taux de survie permette de réaliser une étude à long terme. Les femelles sont nullipares et non gravides.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

17. Les animaux peuvent être logés individuellement ou réunis dans des cages en petits groupes du même sexe, l'hébergement individuel n'étant à envisager que dans des cas scientifiquement justifiés (27) (28) (29). Les cages sont placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats de l'étude soit réduite au minimum. La température du local des animaux d'expérience est de 22 °C ($\pm$ 3 °C). L'humidité relative est d'au moins 30 % et n'excède pas de préférence 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit comprise entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété. Il satisfait tous les besoins nutritionnels de l'espèce étudiée, et la teneur en contaminants alimentaires susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai (résidus de pesticides, polluants organiques persistants, phyto-œstrogènes, métaux lourds et mycotoxines, par exemple) est aussi faible que possible. Des données analytiques sur les teneurs en nutriments et en contaminants alimentaires sont recueillies régulièrement, au moins au début de l'étude et lors des changements de lots; ces données figurent dans le rapport final. Des données analytiques sur l'eau de boisson utilisée lors de l'étude sont de même fournies. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai et de satisfaire les besoins nutritionnels des animaux lorsque la substance d'essai est administrée dans la nourriture.

Préparation des animaux

18. Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions de laboratoire depuis au moins 7 jours et n'ayant jamais été soumis auparavant à des protocoles expérimentaux. Dans le cas des rongeurs, l'administration de la substance commence dès que possible après le sevrage et l'acclimatation, et de préférence avant l'âge de 8 semaines. L'espèce, la souche, la provenance, le sexe, le poids et l'âge des animaux d'expérience sont précisés. Au début de l'étude, la variation de poids des animaux de chaque sexe est minimale et n'excède pas $\pm$ 20 % du poids moyen de tous les animaux étudiés, et ce pour chaque sexe séparément. Les animaux sont affectés de manière aléatoire aux différents groupes (témoins et traités). Après la randomisation, les poids moyens des groupes de chaque sexe ne présentent pas de différences significatives. En cas de différences statistiquement significatives, la phase de randomisation est répétée dans la mesure du possible. Chaque animal reçoit un numéro d'identification unique et en est marqué de manière permanente par tatouage, implant de micropuce ou toute autre méthode appropriée.

PROTOCOLE**Nombre et sexe des animaux**

19. Il convient d'utiliser des animaux des deux sexes. Leur nombre est suffisant pour permettre une évaluation biologique et statistique complète. Chaque groupe de dose, de même que chaque groupe témoin correspondant, comprend au moins 50 animaux de chaque sexe. Selon le but de l'étude, il est possible d'augmenter la puissance statistique des principales estimations en répartissant les animaux de manière différenciée entre les groupes de doses, avec plus de 50 animaux dans les groupes à faibles doses pour estimer par exemple la cancérogénicité aux faibles doses. Il convient toutefois de noter qu'une augmentation modérée de la taille d'un groupe entraînera une augmentation relativement faible de la puissance statistique de l'étude. On trouvera des données complémentaires sur la conception statistique de l'étude, et sur le choix de niveaux de doses permettant d'optimiser la puissance statistique, dans le document d'orientation n° 116 (7).

Sacrifices en cours d'étude et groupes satellites (sentinelles)

20. L'étude peut prévoir le sacrifice d'animaux en cours d'étude, par exemple à 12 mois, afin de recueillir des données sur la progression des altérations néoplasiques et des données mécanistiques, si cela est scientifiquement justifié. Si l'on dispose déjà de ces données, obtenues antérieurement lors d'études de toxicité à doses répétées sur la substance d'essai, les sacrifices en cours d'étude peuvent ne pas être scientifiquement justifiés. S'ils sont néanmoins inclus dans l'étude, les groupes d'animaux traités destinés à être sacrifiés en cours d'étude comptent normalement 10 animaux de chaque sexe, et le nombre total d'animaux utilisés dans l'étude est augmenté du nombre d'animaux que l'on prévoit de sacrifier avant l'achèvement de l'étude. Un groupe supplémentaire d'animaux sentinelles (généralement 5 animaux de chaque sexe) peut être inclus si nécessaire pour le suivi de l'état pathologique au cours de l'étude (30). Des informations complémentaires figurent dans le document d'orientation n° 116 (7).

Groupes de dose et dosage

21. Le document d'orientation n° 116 (7) donne des indications sur tous les aspects du choix des doses et des écarts entre les doses. Il convient d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin. Les niveaux de doses seront généralement basés sur les résultats d'études à plus court terme à doses répétées, ou d'études préliminaires de détermination des concentrations, et prennent en compte toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques existantes relatives à la substance d'essai ou aux substances chimiques apparentées.
22. À moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques de la substance d'essai, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés. Compte tenu des facteurs mentionnés au paragraphe 23 ci-dessous, la plus forte dose est normalement choisie pour provoquer une manifestation de toxicité, par exemple un ralentissement de la prise de poids corporel (d'environ 10 %). Toutefois, en fonction des objectifs de l'étude (voir paragraphe 6), on pourra choisir un niveau de dose maximal plus faible que la dose qui provoque des signes de toxicité, par exemple une dose entraînant un effet négatif préoccupant mais dont l'impact sur l'espérance de vie ou le poids corporel reste faible.
23. Les niveaux de doses et les intervalles entre les doses peuvent être choisis de manière à pouvoir établir une relation dose-réponse et, selon le mode d'action de la substance d'essai, une DSENO ou tout autre résultat escompté de l'étude, notamment une DR (voir paragraphe 25) au plus bas niveau de dose. Les facteurs à prendre en compte dans le choix des faibles doses sont notamment la pente attendue de la courbe dose-réponse, les doses qui provoquent des changements métaboliques importants ou qui modifient notablement le mode d'action toxique, le niveau auquel on peut prévoir un seuil, ou celui auquel on peut prévoir de fixer un point de départ pour une extrapolation aux faibles doses.
24. Les intervalles entre les doses dépendront des caractéristiques de la substance d'essai, et ne peuvent donc pas être prescrits dans la présente méthode d'essai, mais des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes, et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (correspondant par exemple à un facteur de plus de 6 à 10) entre les doses. En général, les facteurs supérieurs à 10 sont évités, et leur utilisation est justifiée.
25. Comme le précise le document d'orientation n° 116 (7), les facteurs à prendre en compte dans le choix des doses sont notamment les suivants:
- non-linéarités ou points d'inflexion connus ou supposés de la courbe dose-réponse,
 - toxicocinétique et gammes de doses auxquelles l'induction métabolique, la saturation ou la non-linéarité entre les doses internes et externes surviennent ou non,
 - lésions précurseurs, marqueurs d'effets ou indicateurs du déroulement de processus biologiques clés sous-jacents,
 - aspects principaux (ou présumés) du mode d'action, par exemple doses auxquelles une cytotoxicité commence à se manifester, les dosages hormonaux sont modifiés, les mécanismes homéostatiques sont dépassés, etc.,

- régions de la courbe dose-réponse nécessitant une estimation particulièrement précise, par exemple dans le domaine de la DR prévue ou d'un seuil présumé,
 - prise en compte des niveaux prévus d'exposition humaine.
26. Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe sont traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé pour les groupes traités. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et entraîne une diminution sensible de la prise de nourriture liée à une moindre appétence de celle-ci, il pourra être utile d'utiliser un groupe témoin supplémentaire nourri en parallèle, qui constituerait un témoin plus approprié.

Préparation des doses et administration de la substance d'essai

27. La substance d'essai est normalement administrée par voie orale, soit dans la nourriture ou l'eau de boisson, soit par gavage. Des informations complémentaires sur les voies et méthodes d'administration figurent dans le document d'orientation n° 116 (7). La voie et le mode d'administration dépendent de la finalité de l'étude, des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, de sa biodisponibilité ainsi que de la voie et du mode prédominants d'exposition humaine. Il convient de justifier le choix de la voie et du mode d'administration. Dans l'intérêt des animaux, le gavage oral n'est normalement choisi que pour les substances pour lesquelles cette voie et ce mode d'administration correspondent à une voie d'exposition potentielle raisonnable chez l'homme (produits pharmaceutiques, par exemple). Dans le cas des produits chimiques alimentaires ou environnementaux, notamment les pesticides, l'administration se fait d'ordinaire via le régime alimentaire ou l'eau de boisson. Toutefois, dans certains contextes, tels que l'exposition professionnelle, l'administration par d'autres voies peut être plus appropriée.
28. Si nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il convient de prendre en compte les caractéristiques suivantes du véhicule et des autres additifs, s'il y a lieu: effets sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la consommation d'aliments ou d'eau, ou sur l'état nutritionnel des animaux. Il est recommandé, dans la mesure du possible, d'envisager en premier lieu une solution ou une suspension aqueuse, puis celle d'une solution ou d'une émulsion dans une huile (par exemple huile de maïs), et en dernier lieu celle d'une solution dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules autres que l'eau sont connues. Il convient de disposer de données sur la stabilité de la substance d'essai et sur l'homogénéité des solutions ou rations contenant les différentes doses (selon les cas) dans les conditions d'administration (nourriture, par exemple).
29. Il importe de veiller à ce que les quantités de substances administrées dans les aliments ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou l'équilibre hydrique. Dans les études de toxicité à long terme faisant intervenir une administration par voie alimentaire, la concentration de la substance d'essai dans les aliments ne dépasse pas normalement 5 % de la ration totale, afin d'éviter les déséquilibres nutritionnels. Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (mg/kg d'aliment ou ppm) soit un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal (mg/kg de poids corporel), calculé sur une base hebdomadaire. La solution choisie est spécifiée.
30. En cas d'administration par voie orale, les animaux reçoivent une dose quotidienne de la substance d'essai (à raison de 7 jours par semaine) et ce normalement pendant une période de 24 mois pour les rongeurs (voir aussi le paragraphe 32). Tout autre régime de dosage, par exemple une administration 5 jours par semaine, fait l'objet d'une justification. En cas d'administration par voie cutanée, les animaux reçoivent normalement le traitement pendant au moins 6 heures par jour, 7 jours par semaine, comme le spécifie le chapitre B.9 de la présente annexe (11), et ce pendant une période de 24 mois. L'exposition par inhalation est réalisée pendant 6 heures par jour, 7 jours par semaine, mais il est possible, si cela se justifie, de limiter l'exposition à 5 jours par semaine. La période d'exposition est normalement de 24 mois. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées "nez seul", il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le choix d'une durée d'exposition inférieure à 6 heures par jour devra être justifié. Voir aussi à ce sujet le chapitre B.8 de la présente annexe (9).
31. Lorsque la substance d'essai est administrée aux animaux par gavage, l'opération est pratiquée aux mêmes moments de la journée au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Normalement, une dose unique sera administrée une fois par jour mais lorsque, par exemple, la substance chimique est un irritant local, il pourra être envisagé de maintenir la dose journalière en la fractionnant (deux fois par jour). Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Le volume est maintenu aussi faible que possible et n'excède pas normalement 1 ml/100 g de poids corporel pour les rongeurs (31). Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à tous les niveaux de doses. Les substances potentiellement corrosives ou irritantes sont l'exception et leur dilution permettra d'éviter tout effet local sévère. L'essai n'est donc pas mené à des concentrations susceptibles d'être corrosives ou irritantes pour le tube digestif.

Durée de l'étude

32. La durée de l'étude sera normalement de 24 mois pour les rongeurs, ce qui correspond à la majeure partie de la durée de vie normale des animaux utilisés. Elle pourra être allongée ou raccourcie selon la durée de vie de la souche de l'espèce animale utilisée, mais cette décision fait l'objet d'une justification. Pour certaines souches particulières de souris, par exemple AKR/J, C3H/J ou C57BL/6J, une durée de 18 mois peut être plus appropriée. On trouvera ci-après des informations sur la durée, la clôture de l'étude et la survie; d'autres considérations, relatives notamment à l'acceptabilité d'une étude de cancérogenèse estimée négative du fait de la survie des animaux, figurent dans le document d'orientation n° 116 (7).
- La clôture de l'étude est envisagée lorsque le nombre de survivants des groupes soumis aux plus faibles doses ou du groupe témoin tombe en dessous de 25 pour cent.
 - La clôture de l'étude n'est pas déclenchée par la mort prématurée des animaux du seul groupe ayant reçu la dose la plus élevée.
 - La survie des animaux est prise en considération séparément pour chaque sexe.
 - L'étude n'est pas prolongée au-delà du point où les données pouvant être tirées de l'étude ne sont plus suffisantes pour permettre une évaluation statistiquement valable.

OBSERVATIONS

33. Un examen de la morbidité ou de la mortalité est effectué quotidiennement chez tous les animaux, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris. Une recherche de signes spécifiques significatifs sur le plan toxicologique devra aussi être effectuée une fois par jour en tenant compte du moment où l'on prévoit que les effets des différentes doses atteindront leur intensité maximale après administration par gavage. Une attention particulière est accordée au développement de tumeurs, et le moment d'apparition, la localisation, les dimensions, l'aspect et la progression de chaque tumeur nettement visible ou palpable sont consignés.

Poids corporel, consommation de nourriture et d'eau, et efficacité alimentaire

34. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La consommation de nourriture et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est aussi mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la consommation d'eau dans les études où la prise d'eau est modifiée.

Hématologie, biochimie clinique et autres mesures

35. Afin d'obtenir le plus possible d'informations de l'étude, surtout en ce qui concerne le mode d'action de la substance, il peut être utile d'effectuer des prélèvements sanguins afin de procéder à des analyses hématologiques et de biochimie clinique, mais la décision appartient au directeur de l'étude. Des analyses d'urine peuvent être aussi appropriées. On trouvera des informations complémentaires sur l'intérêt de tels prélèvements pour une étude de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (7). S'il y a lieu, des prélèvements sanguins en vue d'analyses hématologiques et de chimie clinique et des analyses d'urines peuvent être effectués dans le cadre de sacrifices réalisés en cours d'étude (paragraphe 20) et à la fin de l'étude sur un minimum de 10 animaux de chaque sexe par groupe. Les échantillons de sang sont prélevés en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbital sous anesthésie, et seront conservés si nécessaire dans des conditions appropriées. Des étalements sanguins peuvent aussi être préparés en vue d'un examen, notamment si la moelle osseuse semble être l'organe cible, bien que l'utilité d'un tel examen pour l'évaluation du potentiel cancérogène/oncogène ait été mise en question (32).

PATHOLOGIE*Autopsie macroscopique*

36. Tous les animaux de l'étude à l'exception des sentinelles et autres animaux satellites (voir paragraphe 20) font l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. L'autopsie des sentinelles et autres animaux satellites peut devoir être effectuée au cas par cas, à la discrétion du directeur de l'étude. La pesée des organes ne fait normalement pas partie d'une étude de cancérogenèse car les changements liés à l'âge ou, dans des phases plus avancées, au développement de tumeurs rendent superflues les données relatives au poids des organes. Ces données peuvent toutefois présenter un grand intérêt pour les évaluations fondées sur le poids de la preuve, notamment en ce qui concerne le mode d'action. Si ces données font partie d'une étude satellite, elles ne sont pas collectées au-delà d'un an après le début de l'étude.
37. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (33) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif):

toutes les lésions macroscopiques	cœur	pancréas	estomac (pré-estomac, estomac glandulaire)
glande surrénale	iléon	glande parathyroïde	[dents]
aorte	jéjunum	nerf périphérique	testicule
cerveau (segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	rein	hypophyse	thymus
cæcum	glande lacrymale (exorbital)	prostate	thyroïde
col utérin	foie	rectum	[langue]
glande coagulante	poumon	glande salivaire	trachée
côlon	ganglions lymphatiques (superficiels et profonds)	vésicule séminale	vessie
duodénum	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)	muscle squelettique	utérus (col inclus)
épididyme	[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]	peau	[uretère]
œil (y compris rétine)	œsophage	moelle épinière (niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)	[urètre]
[fémur avec articulation]	[bulbe olfactif]	rate	vagin
vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)	ovaire	[sternum]	segment de moelle osseuse et/ou moelle osseuse fraîchement ponctionnée
glande de Harder			

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues de la substance d'essai sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu de conserver les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale, et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Dans les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des chapitres B.8 et B.29 de la présente annexe. Pour les autres organes et tissus (autre les tissus des voies respiratoires spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

Histopathologie

38. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (33). Au minimum, les examens devront porter sur les tissus suivants:

- tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin,
- tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude,
- tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques, notamment des tumeurs,
- lorsque des altérations histopathologiques dues au traitement sont observées dans le groupe à dose élevée, ces mêmes tissus sont examinés chez tous les animaux de tous les autres groupes de doses,
- dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

RÉSULTATS ET RAPPORTS**Données**

39. Des données sont recueillies pour chaque animal sur tous les paramètres évalués. En outre, toutes les données sont résumées sous forme de tableaux synoptiques indiquant, pour chaque groupe expérimental, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés ainsi que le moment de l'apparition, la durée et la gravité de tous les effets toxiques observés, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les tableaux synoptiques présentent les moyennes et les écarts-types (pour les données recueillies en continu) pour les animaux présentant des effets toxiques ou des lésions, ainsi qu'une cotation des lésions.
40. Les données de contrôle historiques peuvent faciliter l'interprétation des résultats de l'étude, par exemple lorsque les données provenant des témoins concurrents semblent diverger de manière significative de données récentes obtenues sur des animaux témoins issus de la même installation d'essai/colonie d'élevage. Si elles sont évaluées, les données de contrôle historiques émanent du même laboratoire et portent sur des animaux du même âge et de la même souche, produits dans les cinq ans précédant l'étude en question.
41. Si possible, les résultats numériques devront être évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Les méthodes statistiques et les données à analyser sont choisies au moment de la conception de l'étude (paragraphe 9). Ce choix permet d'opérer des ajustements en fonction de la survie, si nécessaire.

Rapport d'essai

42. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Substance d'essai:

- état physique, pureté et propriétés physico-chimiques,
- données d'identification,
- provenance de la substance chimique,
- numéro de lot,
- certificat d'analyse chimique.

Véhicule (le cas échéant):

- justification du choix du véhicule (s'il est autre que l'eau).

Animaux d'expérience:

- espèce/souche utilisée et justification du choix fait,
- nombre, âge et sexe des animaux au début de l'essai,
- provenance, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions expérimentales:

- justification de la voie d'administration et du choix des doses,
- le cas échéant, méthodes statistiques utilisées pour analyser les données,
- détails concernant la formulation de la substance d'essai ou son incorporation dans les aliments,
- données analytiques sur la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,

- voie d'administration et détails concernant l'administration de la substance d'essai,
- pour les études par inhalation, mention de la voie d'entrée (nez seul ou corps entier),
- doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et, le cas échéant, facteur de conversion en dose réelle de la concentration de la substance d'essai (en mg/kg ou en ppm) dans les aliments ou l'eau de boisson,
- détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats (les résultats comprendront des données générales sous forme de tableaux synoptiques et des données propres à chaque animal)

Résultats généraux:

- données sur la survie,
- poids corporel/variations du poids corporel,
- prise d'aliments, calculs de l'efficacité alimentaire, si effectués, et prise d'eau, le cas échéant,
- données toxicocinétiques (si disponibles),
- ophtalmoscopie (si disponible),
- hématologie (si disponible),
- chimie clinique (si disponible).

Résultats cliniques:

- signes de toxicité,
- incidence (et, si elle est évaluée, sévérité) de toute anomalie observée,
- nature, sévérité et durée des observations cliniques (transitoires ou permanentes).

Données relatives aux autopsies:

- poids corporel à l'issue de l'essai,
- poids des organes et leur rapport au poids corporel, le cas échéant,
- résultats d'autopsie; incidence et sévérité des anomalies.

Histopathologie:

- observations d'effets histopathologiques non néoplasiques,
- observations d'effets histopathologiques néoplasiques,
- corrélation entre les observations macroscopiques et microscopiques,
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques liés au traitement et échelle d'évaluation de la sévérité,

— rapport sur l'analyse éventuelle des lames par des pairs.

Traitement statistique des résultats, le cas échéant

Discussion des résultats, notamment:

- examen de toutes les approches de modélisation,
- relations dose-réponse,
- données de contrôle historiques,
- examen de toutes les informations concernant le mode d'action,
- détermination des DR, DSENO et DMENO (dose minimale avec effet nocif observé),
- applicabilité des résultats à l'être humain;

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OCDE, Paris.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- (3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.
- (4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.
- (5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.
- (6) Chapitre B.27 de la présente annexe, Toxicité orale subchronique; Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours.
- (7) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Série sur les essais et évaluations n° 116, disponible sur le site internet public de l'OCDE relatifs aux essais de produits chimiques (www.oecd.org/env/testguidelines).
- (8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.
- (9) Chapitre B.8 de la présente annexe – Toxicité subaiguë par inhalation: étude sur 28 jours.
- (10) Chapitre B.29 de la présente annexe – Toxicité subchronique par inhalation: étude sur 90 jours.
- (11) Chapitre B.9 de la présente annexe – Toxicité cutanée à doses répétées (28 jours).
- (12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.
- (13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., and Fenner-Crisp P.A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

- (14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci.* 89:51-56.
- (15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:591-653.
- (16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1-7.
- (17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.
- (18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37-68.
- (19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69-98.
- (20) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Série sur les essais et évaluations n° 35 et série sur les pesticides n° 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.
- (21) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.
- (22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729 – 837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. and Lumley C.E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T., Griffiths S.A. and Lumley C.E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy P.O.F. & Harron D.W.G. (eds). *Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation*. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.
- (26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect.* 105:1196-1203.
- (27) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).
- (28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, DC, US Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
 - (31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.
 - (32) Weingand K. *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
 - (33) Crissman J., Goodman D., Hildebrandt P. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.
-

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

B. 33. ÉTUDES COMBINÉES DE TOXICITÉ CHRONIQUE ET DE CANCÉROGÈNESE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 453 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La ligne directrice 453 originale avait été adoptée en 1981. La présente méthode d'essai B.33 actualisée a été jugée nécessaire afin de tenir compte des évolutions récentes dans le domaine du bien-être animal, ainsi que des nouvelles exigences réglementaires (1) (2) (3) (4) (5). La mise à jour de la présente méthode d'essai B.33 a été effectuée en parallèle avec la révision des chapitres B.32 (Études de cancérogenèse) et B.30 (Études de toxicité chronique) de la présente annexe, dans le but d'obtenir des informations additionnelles à partir des animaux utilisés dans l'étude, et de fournir des précisions concernant le choix des doses. La présente méthode d'essai vise les essais portant sur une large gamme de produits chimiques, dont des pesticides et des produits chimiques industriels. Il convient toutefois de noter que certains aspects et certaines dispositions peuvent différer pour les produits pharmaceutiques (voir la Conférence internationale sur l'harmonisation, thème S1B: évaluation de la cancérogénicité des produits pharmaceutiques).
2. La plupart des études de toxicité chronique et de cancérogenèse étant menées sur des espèces de rongeurs, la présente méthode d'essai est destinée à s'appliquer principalement à des études réalisées avec ces espèces. S'il s'avérait nécessaire de mener de telles études avec des non-rongeurs, il conviendrait d'appliquer, moyennant des modifications appropriées, les principes et procédures décrits dans la présente méthode d'essai et dans le chapitre B.27 – Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours (6) de la présente annexe, comme indiqué dans le document d'orientation n° 116 de l'OCDE sur l'élaboration et la conduite des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (7).
3. Les trois principales voies d'administration utilisées dans les études de toxicité chronique et de cancérogenèse sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des caractéristiques physiques et chimiques de la substance d'essai et de la voie d'exposition prédominante chez l'homme. Des informations complémentaires sur le choix de la voie d'exposition sont fournies dans le document d'orientation n° 116 (7).
4. La présente méthode d'essai porte principalement sur l'exposition par voie orale, la voie la plus communément utilisée dans les études de toxicité chronique et de cancérogenèse. Bien que des études à long terme utilisant l'exposition par voie cutanée ou par inhalation puissent aussi être nécessaires pour évaluer le risque pour la santé humaine et/ou exigées en vertu de certains régimes réglementaires, ces deux voies d'exposition nécessitent des dispositifs techniques d'une grande complexité. De telles études devront être conçues au cas par cas, encore que la présente méthode d'essai, qui porte sur la caractérisation et l'évaluation de la toxicité chronique et de la cancérogénicité par voie orale, puisse fournir les bases d'un protocole d'étude par voie cutanée et/ou inhalation, notamment en ce qui concerne les recommandations relatives aux durées de traitement, aux paramètres cliniques et pathologiques, etc. Il existe des documents d'orientation de l'OCDE sur l'administration expérimentale de substances d'essai par inhalation (7) (8) et par voie cutanée (7). Les chapitres B.8 (9) et B.29 (10) de la présente annexe, ainsi que le document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aiguë par inhalation (8), méritent tout particulièrement d'être consultés lors de la conception d'études à long terme portant sur une exposition par inhalation. Le chapitre B.9 de la présente annexe (11) doit être consulté dans le cas d'un essai portant sur la voie cutanée.
5. L'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse donne des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée pendant une période pouvant couvrir la vie entière de l'espèce considérée. L'étude fournit des informations sur les effets toxiques de la substance d'essai, y compris sur son pouvoir cancérogène, et peut indiquer les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes. Elle peut aussi donner une estimation de la dose sans effet nocif observé pour ce qui est des effets toxiques et, dans le cas de substances cancérogènes non génotoxiques, des réponses tumorales. Cette estimation permet d'établir les critères de sécurité concernant l'exposition humaine. De plus, il convient d'accorder une attention particulière à l'observation clinique des animaux afin d'obtenir le plus d'informations possibles.
6. Les objectifs des études de toxicité chronique et de cancérogenèse couvertes par la présente méthode d'essai sont les suivants:
 - identification des propriétés cancérogènes d'un produit chimique susceptibles d'augmenter les risques de néoplasmes, la fréquence de survenue de néoplasmes malins ou la diminution du temps nécessaire à leur apparition, par rapport aux groupes témoins concurrents,
 - identification du temps d'apparition de néoplasmes,
 - identification de la toxicité chronique d'une substance d'essai,

- identification d'un ou de plusieurs organes cibles de la toxicité chronique et de la cancérogenèse,
- caractérisation de la relation dose-effet,
- identification d'un niveau de dose sans effet nocif observé (DSENO) ou du point de départ pour l'établissement d'une dose de référence (DR),
- extrapolation des effets cancérogènes aux niveaux d'exposition humaine correspondant à de faibles doses,
- prévision des effets de toxicité chronique aux niveaux représentatifs de l'exposition humaine,
- obtention de données permettant de vérifier les hypothèses concernant le mode d'action (2) (7) (12) (13) (14) (15).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

7. Pour caractériser et évaluer la cancérogénicité potentielle et la toxicité chronique d'une substance d'essai, le laboratoire chargé de l'étude prend en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai avant de réaliser l'étude, afin de pouvoir orienter celle-ci de manière à tester plus efficacement les propriétés toxicologiques de la substance, et faire le moins possible appel aux animaux. La connaissance du mode d'action d'un agent cancérogène suspecté et sa prise en compte (2) (7) (12) (13) (14) (15) sont particulièrement importantes puisque la conception optimale de l'essai peut différer selon que la substance est ou n'est pas un agent cancérogène génotoxique connu ou suspecté. Des informations complémentaires sur certains aspects du mode d'action peuvent être trouvées dans le document d'orientation n° 116 (7).
8. Les informations utiles pour concevoir l'étude sont notamment: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les informations éventuelles sur son mode d'action; les résultats de toutes les études de toxicité in vitro ou in vivo menées et notamment des essais de génotoxicité; l'utilisation (les utilisations) prévue(s) et le potentiel d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques (par exemple mutagénicité, génotoxicité et pouvoir cancérogène) relatives aux substances structurellement apparentées; les données toxicocinétiques disponibles (dose unique et doses répétées, si ces données existent) et les résultats d'autres études à doses répétées. La détermination de la toxicité chronique et du pouvoir cancérogène n'est effectuée qu'après obtention des premiers résultats d'essais de toxicité à doses répétées menés sur 28 jours et/ou 90 jours. Les essais d'initiation-promotion de cancers à court terme peuvent aussi livrer des informations utiles. Il convient d'envisager l'adoption d'une approche par étapes pour l'étude expérimentale de cancérogenèse entreprise dans le cadre de l'évaluation globale des effets nocifs potentiels d'une substance chimique (16) (17) (18) (19).
9. Les méthodes statistiques les plus appropriées pour l'analyse des résultats, compte tenu du plan expérimental et des objectifs de l'étude, sont identifiées avant le début de l'étude. Il convient notamment de déterminer si les statistiques doivent prendre en compte l'ajustement en fonction de la survie, l'analyse des risques de tumeurs cumulées liés à la durée de survie, l'analyse du temps nécessaire à l'apparition d'une tumeur et l'analyse effectuée en cas de mort prématurée des animaux d'un ou de plusieurs groupes. On trouvera des indications concernant les analyses statistiques appropriées, ainsi que des références clés à des méthodes statistiques reconnues au plan international, dans le document d'orientation n° 116 (7), ainsi que dans le document d'orientation n° 35 sur l'analyse et l'évaluation des études de toxicité chronique et de cancérogenèse (20).
10. Lors de la réalisation d'une étude de cancérogenèse, il est recommandé de toujours suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation de l'OCDE n° 19 sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques comme effets observés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (21). Le paragraphe 62 de ce document, en particulier, stipule ce qui suit: *"Dans les études comportant l'administration de doses répétées, lorsqu'un animal présente des signes cliniques progressifs de détérioration de son état, une décision d'euthanasier ou non l'animal est prise en connaissance de cause. Cette décision met en balance des facteurs tels que la valeur des informations pouvant être obtenues en maintenant l'animal dans l'étude d'une part, et l'état général de celui-ci d'autre part. Si la décision est prise de poursuivre l'essai sur cet animal, la fréquence des observations est augmentée selon les besoins. Il est aussi possible, sans toutefois nuire à l'objectif de l'essai, d'interrompre l'administration de la substance d'essai pour soulager la douleur ou la détresse de l'animal, ou de réduire la dose testée."*
11. On trouvera des informations détaillées et une discussion sur les principes déterminant le choix des doses pour les études de toxicité chronique et de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (7), ainsi que dans deux publications de l'Institut international des sciences de la vie (22) (23). La stratégie de base pour le choix des doses dépend du ou des principaux objectifs de l'étude (paragraphe 6). En choisissant des niveaux de doses appropriés, il convient de trouver un équilibre, entre d'une part, l'identification des dangers et, d'autre part, la caractérisation des réponses aux faibles doses et leur pertinence. Cet équilibre est particulièrement nécessaire dans le cas de l'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse considérée ici.

12. Il convient d'examiner l'opportunité de réaliser la présente étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse plutôt que de réaliser séparément une étude de toxicité chronique (chapitre B.30 de la présente annexe) et une étude de cancérogenèse (chapitre B.32 de la présente annexe). L'essai combiné permet une meilleure efficacité en temps et en coûts, et un moindre recours aux animaux, par rapport à la conduite de deux essais séparés, et ne compromet pas la qualité des données de la phase chronique ou de la phase de cancérogenèse. Lors de la réalisation d'une telle étude combinée, il convient toutefois de respecter les principes déterminant le choix de la dose (paragraphes 11 et 22 à 26) et il est également reconnu que certains cadres réglementaires peuvent imposer la conduite d'études séparées. On trouvera dans le document d'orientation n° 116 (7) des indications supplémentaires sur les moyens de concevoir de manière optimale l'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et en rationalisant les diverses procédures expérimentales.
13. Les définitions utilisées dans le contexte de la présente méthode d'essai figurent à la fin du présent chapitre et dans le document d'orientation n° 116 (7).

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. L'étude comprend deux phases parallèles: une phase chronique et une phase de cancérogenèse (dont les durées respectives font l'objet des paragraphes 34 et 35). La substance d'essai est normalement administrée par la voie orale, mais la voie inhalatoire ou la voie cutanée peuvent aussi être appropriées. Durant la phase chronique, la substance d'essai est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives, à raison d'un niveau de dose par groupe, en général pendant une période de 12 mois, bien que des durées plus longues ou plus courtes puissent aussi être choisies en fonction des exigences réglementaires (voir paragraphe 34). Cette durée est suffisamment longue pour permettre aux effets de toxicité cumulée de se manifester, tout en évitant les effets perturbateurs des changements liés au vieillissement. Un ou plusieurs sacrifices en cours d'étude peuvent aussi être prévus, par exemple à 3 et 6 mois, auquel cas des groupes d'animaux supplémentaires pourront être inclus dans l'étude (voir paragraphe 20). Durant la phase de cancérogenèse, la substance d'essai est administrée quotidiennement à différents groupes d'animaux pendant la plus grande partie de leur vie. Au cours des deux phases, les animaux sont observés attentivement pour déceler d'éventuels signes de toxicité et le développement de lésions néoplasiques. Les animaux qui meurent ou sont sacrifiés en cours d'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des espèces animales

15. La présente méthode d'essai traite principalement de la caractérisation et de l'évaluation de la toxicité chronique et de la cancérogénicité chez les rongeurs (paragraphe 2). Le recours à des espèces autres que des rongeurs peut être envisagé si les données disponibles laissent escompter une meilleure prédiction des effets de la substance sur la santé humaine. Dans ce cas, le choix de l'espèce est justifié. L'espèce de rongeur préférée est le rat, mais d'autres rongeurs comme la souris peuvent être utilisés. Bien que le recours à la souris dans les études de cancérogenèse puisse ne présenter qu'un intérêt limité (24) (25) (26), certains programmes réglementaires actuels exigent tout de même la conduite d'essais de cancérogenèse sur la souris, sauf lorsqu'il est établi que de tels essais ne sont pas nécessaires sur le plan scientifique. Les rats et les souris sont les modèles expérimentaux choisis de préférence, en raison de leur durée de vie relativement courte, de leur utilisation fréquente dans les études pharmacologiques et toxicologiques, de leur sensibilité à l'induction de tumeurs et de la disponibilité de souches suffisamment caractérisées. Ces caractéristiques permettent d'obtenir une grande quantité d'informations sur la physiologie et la pathologie de ces animaux. S'il s'avérait nécessaire de réaliser des études de toxicité chronique et de cancérogenèse avec des espèces de non- rongeurs, le plan et la conduite de l'étude devraient suivre les principes décrits dans la présente méthode d'essai ainsi que dans le chapitre B.27 de la présente annexe – Toxicité orale à doses répétées – non-rongeurs: 90 jours (6). Des informations additionnelles sur le choix des espèces et des souches sont disponibles dans le document d'orientation n° 116 (7).
16. Il convient d'employer des animaux adultes sains, de souches communément utilisées dans les laboratoires. L'étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse sera effectuée de préférence sur des animaux de même souche et de même provenance que ceux utilisés dans l'étude (les études) de toxicité préliminaire(s) de plus courte durée. Si toutefois ces animaux sont réputés ne pas répondre aux critères de survie généralement admis dans les études à long terme [voir le document d'orientation n° 116 (7)], il convient d'envisager d'utiliser une souche d'un animal dont le taux de survie permette de réaliser une étude à long terme. Les femelles sont nulipares et non gravides.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

17. Les animaux peuvent être logés individuellement ou dans des cages en petits groupes du même sexe, l'hébergement individuel n'étant à envisager que dans des cas scientifiquement justifiés (27) (28) (29). Les cages sont placées de façon telle que l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats de l'étude soit réduite au minimum. La température du local des animaux d'expérience est de 22 °C ($\pm$ 3 °C). L'humidité relative est d'au moins 30 % et n'excède pas de préférence 70 % en dehors des moments où le local est nettoyé, l'idéal étant qu'elle soit comprise entre 50 et 60 %. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété. Il satisfait tous les besoins nutritionnels de l'espèce étudiée, et la teneur en contaminants alimentaires susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai (résidus de pesticides, polluants organiques persistants, phyto-œstrogènes, métaux lourds et mycotoxines, par exemple) est aussi faible que possible. Des données analytiques sur les teneurs en nutriments et en contaminants alimentaires sont recueillies régulièrement, au moins au début de l'étude et lors des changements de lots; ces données figurent dans le rapport final. Des données analytiques sur

l'eau de boisson utilisée lors de l'étude sont de même fournies. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai et de satisfaire les besoins nutritionnels des animaux lorsque la substance est administrée dans la nourriture.

Préparation des animaux

18. Il convient d'utiliser des animaux sains, acclimatés aux conditions de laboratoire depuis au moins 7 jours et n'ayant jamais été soumis auparavant à des protocoles expérimentaux. Dans le cas des rongeurs, l'administration de la substance commence dès que possible après le sevrage et l'acclimatation, et de préférence avant l'âge de 8 semaines. L'espèce, la souche, la provenance, le sexe, le poids et l'âge des animaux d'expérience sont précisés. Au début de l'étude, la variation de poids des animaux de chaque sexe est minimale et n'excède pas $\pm 20\%$ du poids moyen de tous les animaux étudiés, et ce pour chaque sexe séparément. Les animaux sont affectés de manière aléatoire aux différents groupes (témoins et traités). Après la randomisation, les poids moyens des groupes de chaque sexe ne présentent pas de différences significatives. En cas de différences statistiquement significatives, la phase de randomisation est répétée dans la mesure du possible. Chaque animal reçoit un numéro d'identification unique et en est marqué de manière permanente par tatouage, implant de micropuce ou toute autre méthode appropriée.

PROTOCOLE

Nombre et sexe des animaux

19. Il convient d'utiliser des animaux des deux sexes. Leur nombre est suffisant pour permettre une évaluation biologique et statistique complète. Pour les rongeurs, chaque groupe de dose (comme défini au paragraphe 22) et chaque groupe témoin concurrent prévu pour participer à la phase de cancérogenèse de l'étude comprend donc au moins 50 animaux de chaque sexe. Selon le but de l'étude, il sera possible d'augmenter la puissance statistique des principales estimations en répartissant les animaux de manière différenciée et non égale en nombre dans les divers groupes de dose, avec plus de 50 animaux dans les groupes à faibles doses pour estimer par exemple la cancérogénicité aux faibles doses. Il convient toutefois de noter qu'une augmentation modérée de la taille d'un groupe entraînera une augmentation relativement faible de la puissance statistique de l'étude. Chaque groupe de dose (comme défini au paragraphe 22), et chaque groupe témoin concurrent prévu pour participer à la phase de toxicité chronique de l'étude, comprend au moins, dans le cas des rongeurs, 10 animaux de chaque sexe. On notera que ce nombre est plus faible que celui préconisé dans l'étude de toxicité chronique (chapitre B.30 de la présente annexe). L'interprétation des données obtenues à partir de ce nombre réduit d'animaux par groupe dans la phase de toxicité chronique de la présente étude combinée s'appuie cependant sur les données provenant des animaux plus nombreux étudiés lors de la phase de cancérogenèse de l'étude. Dans les études utilisant des souris, il peut être nécessaire de prévoir des animaux supplémentaires dans chaque groupe traité lors de la phase de toxicité chronique pour pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis. On trouvera des données complémentaires sur la conception statistique de l'étude et le choix de niveaux de doses permettant d'optimiser la puissance statistique dans le document d'orientation n° 116 (7).

Sacrifices en cours d'étude, groupes satellites et animaux sentinelles

20. L'étude peut prévoir le sacrifice d'animaux en cours d'étude, par exemple à 6 mois pour la phase de toxicité chronique, afin de recueillir des données sur la progression des altérations non néoplasiques et des données mécanistiques, si cela est scientifiquement justifié. Si l'on dispose déjà de ces données, obtenues antérieurement lors d'études de toxicité à doses répétées sur la substance d'essai, les sacrifices en cours d'étude peuvent ne pas être scientifiquement justifiés. Les animaux étudiés pendant la phase de toxicité chronique de l'étude, normalement sur une durée de 12 mois (paragraphe 34), fournissent les données correspondant aux sacrifices en cours d'étude pour la phase de cancérogenèse, ce qui réduit le nombre total d'animaux étudiés. Des groupes satellites peuvent aussi être constitués pour la phase de toxicité chronique afin de contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance d'essai. Ces investigations pourront ne porter que sur les doses maximales de l'étude et sur le groupe témoin. Un groupe supplémentaire d'animaux sentinelles (généralement 5 animaux de chaque sexe) peut être inclus si nécessaire pour le suivi de l'état pathologique au cours de l'étude (30). On trouvera des indications supplémentaires sur les sacrifices en cours d'étude et sur le recours à des animaux satellites et sentinelles, ainsi que sur la limitation du nombre total d'animaux étudiés, dans le document d'orientation n° 116 (7).
21. Si l'inclusion d'animaux satellites et/ou des sacrifices en cours d'essai sont prévus, le nombre d'animaux dans chaque groupe de dose prévu à cet effet sera normalement de 10 animaux de chaque sexe, et le nombre total d'animaux étudiés devra être augmenté du nombre d'animaux devant être sacrifiés avant l'achèvement de l'étude. Les animaux destinés à être sacrifiés en cours d'étude et les animaux satellites sont normalement sujets aux mêmes observations que ceux soumis à la phase de toxicité chronique de l'étude principale, notamment en ce qui concerne le poids corporel, la prise d'aliments et d'eau, les mesures hématologiques et de biochimie clinique, et les examens pathologiques. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude) pour limiter ces observations à des mesures essentielles spécifiques telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité.

Groupes de dose et dosages

22. Le document d'orientation n° 116 (7) donne des indications sur tous les aspects du choix des doses et des écarts entre les doses. Il convient d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin, aussi bien pour la phase de toxicité chronique que pour la phase de cancérogenèse. Les niveaux de doses seront généralement basés sur les résultats d'études à plus court terme à doses répétées, ou d'études préliminaires de détermination des concentrations, et devront prendre en compte toutes les données toxicologiques et toxicocinétiques existantes relatives à la substance d'essai ou aux substances chimiques apparentées.

23. Pour la phase de toxicité chronique de l'étude, une étude complète portant sur trois niveaux de doses peut ne pas être considérée comme indispensable s'il est possible d'anticiper qu'un essai à dose unique, équivalant au moins à 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, ne produira probablement pas d'effets indésirables. La décision est fondée sur les résultats d'études préliminaires et sur l'absence probable de toxicité de la substance d'essai, compte tenu des données disponibles sur des substances structurellement apparentées. Une limite de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour peut s'appliquer sauf si l'exposition humaine indique qu'il est nécessaire de recourir à un niveau de dose plus élevé.
24. À moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques de la substance d'essai, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés. La plus forte dose est normalement choisie pour provoquer une manifestation de toxicité, par exemple un ralentissement de la prise de poids corporel (d'environ 10 %). Toutefois, en fonction des objectifs de l'étude (voir paragraphe 6), on pourra choisir un niveau de dose maximal plus faible que la dose qui provoque des signes de toxicité, par exemple une dose entraînant un effet négatif préoccupant mais dont l'impact sur l'espérance de vie ou le poids corporel reste faible.
25. Les niveaux de doses et les intervalles entre les doses peuvent être choisis de manière à pouvoir établir une relation dose-réponse et, selon le mode d'action de la substance d'essai, une DSENO ou tout autre résultat escompté de l'étude, notamment une DR (voir le paragraphe 27). Les facteurs à prendre en compte dans le choix des faibles doses sont notamment la pente attendue de la courbe dose-réponse, les doses qui provoquent des changements métaboliques importants ou qui modifient notablement le mode d'action toxique, le niveau auquel on peut prévoir un seuil, ou celui auquel on peut prévoir de fixer un point de départ pour une extrapolation aux faibles doses. Le principal objectif lors de la réalisation d'une étude combinée de cancérogenèse et de toxicité chronique sera la collecte d'informations à des fins d'évaluation des risques de cancérogenèse, et les données sur la toxicité chronique seront normalement un objectif subsidiaire. Il conviendra de s'en souvenir lors du choix des niveaux de doses et des intervalles entre les doses pour l'étude.
26. Les intervalles entre les doses dépendront des objectifs de l'étude et des caractéristiques de la substance d'essai, et ne peuvent donc pas être prescrits de manière détaillée dans la présente méthode d'essai, mais des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes, et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (correspondant par exemple à un facteur de plus de 6 à 10) entre les doses. En général, les facteurs supérieurs à 10 sont évités, et leur utilisation est justifiée.
27. Comme le précise le document d'orientation n° 116 (7), les facteurs à prendre en compte dans le choix des doses sont notamment les suivants:
- non-linéarités ou points d'inflexion connus ou supposés de la courbe dose-réponse,
 - toxicocinétique et gammes de doses auxquelles l'induction métabolique, la saturation ou la non-linéarité entre les doses internes et externes surviennent ou non,
 - lésions précurseurs, marqueurs d'effets ou indicateurs du déroulement de processus biologiques clés sous-jacents,
 - aspects principaux (ou présumés) du mode d'action, par exemple doses auxquelles une cytotoxicité commence à se manifester, les dosages hormonaux sont perturbés, les mécanismes homéostatiques sont dépassés, etc.,
 - régions de la courbe dose-réponse nécessitant une estimation particulièrement précise, par exemple dans le domaine de la DR prévue ou d'un seuil présumé,
 - prise en compte des niveaux prévus d'exposition humaine, en particulier lors du choix des doses moyennes et faibles.
28. Le groupe témoin sera un groupe non traité ou un groupe recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule. Exception faite de l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin sont traités de la même manière que ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé pour les groupes traités. Si la substance d'essai est incorporée aux aliments et entraîne une diminution sensible de la prise de nourriture liée à une moindre appétence de celle-ci, il pourra être utile d'utiliser un groupe témoin supplémentaire nourri en parallèle, qui constituerait un témoin plus approprié.

Préparation des doses et administration de la substance d'essai

29. La substance d'essai est normalement administrée par voie orale, soit dans la nourriture ou l'eau de boisson, soit par gavage. Des informations complémentaires sur les voies et méthodes d'administration figurent dans le document d'orientation n° 116 (7). La voie et le mode d'administration dépendent de la finalité de l'étude, des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, de sa biodisponibilité ainsi que de la voie et du mode prédominants d'exposition humaine. Il convient de justifier le choix de la voie et du mode d'administration. Dans l'intérêt des animaux, le gavage oral n'est normalement choisi que pour les substances pour lesquelles cette

voie et ce mode d'administration correspondent à une voie d'exposition potentielle raisonnable chez l'homme (produits pharmaceutiques, par exemple). Dans le cas des produits chimiques alimentaires ou environnementaux, notamment les pesticides, l'administration se fait d'ordinaire via le régime alimentaire ou l'eau de boisson. Toutefois, dans certains contextes, tels que l'exposition professionnelle, l'administration par d'autres voies peut être plus appropriée.

30. Si nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il convient de prendre en compte les caractéristiques suivantes du véhicule et des autres additifs, s'il y a lieu: effets sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai; effets sur les propriétés chimiques de la substance d'essai susceptibles de modifier sa toxicité; et effets sur la prise d'aliments ou d'eau, ou sur l'état nutritionnel des animaux. Il est recommandé, chaque fois que les circonstances le permettent, d'envisager en premier lieu l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, puis celle d'une solution ou d'une émulsion dans une huile (par exemple huile de maïs), et en dernier lieu celle d'une solution dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules autres que l'eau sont connues. Il convient de disposer de données sur la stabilité de la substance d'essai et sur l'homogénéité des solutions ou rations contenant les différentes doses (selon les cas) dans les conditions d'administration (nourriture, par exemple).
31. Il importe de veiller à ce que les quantités de substances d'essai administrées dans les aliments ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou avec l'équilibre hydrique. Dans les études de toxicité à long terme faisant intervenir une administration par voie alimentaire, la concentration de la substance d'essai dans les aliments ne dépasse normalement pas 5 % de la ration totale, afin d'éviter les déséquilibres nutritionnels. Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (mg/kg d'aliment ou ppm) soit un niveau de dose constant par rapport au poids corporel de l'animal (mg/kg de poids corporel), calculé sur une base hebdomadaire. La solution choisie est spécifiée.
32. En cas d'administration par voie orale, les animaux reçoivent une dose quotidienne de la substance d'essai (à raison de 7 jours par semaine) et ce pendant une période de 12 mois (phase chronique) ou de 24 mois (phase de cancérogenèse) pour les rongeurs (voir aussi les paragraphes 33 et 34). Tout autre régime de dosage, par exemple une administration 5 jours par semaine, donne lieu à une justification. En cas d'administration par voie cutanée, les animaux reçoivent normalement le traitement pendant au moins 6 heures par jour, 7 jours par semaine, comme le spécifie le chapitre B.9 de la présente annexe (11), et ce pendant une période de 12 mois (phase chronique) ou de 24 mois (phase de cancérogenèse). L'exposition par inhalation est réalisée pendant 6 heures par jour, 7 jours par semaine, mais il est possible, si cela se justifie, de limiter l'exposition à 5 jours par semaine. La période d'exposition est normalement de 12 mois (phase chronique) ou de 24 mois (phase de cancérogenèse). Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées "nez seul", il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le choix d'une durée d'exposition inférieure à 6 heures par jour fait l'objet d'une justification. Voir aussi à ce sujet le chapitre B.8 de la présente annexe (9).
33. Lorsque la substance d'essai est administrée aux animaux par gavage, l'opération est pratiquée aux mêmes moments de la journée au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Normalement, une dose unique sera administrée une fois par jour mais lorsque, par exemple, la substance chimique est un irritant local, il pourra être envisagé de maintenir la dose journalière en la fractionnant (deux fois par jour). Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Le volume est maintenu aussi faible que possible et n'excède normalement pas 1 ml/100 g de poids corporel pour les rongeurs (31). Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à tous les niveaux de doses. Les substances potentiellement corrosives ou irritantes sont l'exception et leur dilution permettra d'éviter tout effet local sévère. L'essai n'est pas mené à des concentrations susceptibles d'être corrosives ou irritantes pour le tube digestif.

Durée de l'étude

34. Si la période d'administration et la durée de la phase chronique de cette étude sont normalement de 12 mois, le plan de l'étude permet une application à des essais de durée plus courte (6 à 9 mois par exemple) ou plus longue (18 à 24 mois), pour répondre aux exigences de régimes réglementaires particuliers ou obtenir des données mécanistiques spécifiques. Les déviations par rapport à une durée d'exposition de 12 mois font l'objet de justifications, surtout dans le cas de durées plus courtes. Le traitement de tous les groupes de doses affectés à cette phase est interrompu au moment prévu pour l'évaluation de la toxicité chronique et de lésions pathologiques non néoplasiques. Les groupes satellites inclus pour contrôler la réversibilité des éventuelles altérations toxicologiques induites par la substance d'essai sont maintenus sans traitement, pendant une période d'au moins 4 semaines et d'au plus un tiers de la durée totale de l'étude, après la cessation de l'exposition.
35. La durée de la phase de cancérogenèse de cette étude sera normalement de 24 mois pour les rongeurs, ce qui correspond à la majeure partie de la durée de vie normale des animaux utilisés. Elle peut être allongée ou raccourcie selon la durée de vie de la souche de l'espèce animale utilisée, mais ce changement de durée fait l'objet d'une justification. Pour certaines souches particulières de souris, par exemple AKR/J, C3H/J ou C57BL/6J, une durée de 18 mois peut être plus appropriée. On trouvera ci-après des informations sur la durée, la

clôture de l'étude et la survie; d'autres considérations, relatives notamment à l'acceptabilité d'une étude de cancérogenèse estimée négative du fait de la survie des animaux, figurent dans le document d'orientation n° 116 (7):

- la clôture de l'étude est envisagée lorsque le nombre de survivants des groupes soumis aux plus faibles doses ou du groupe témoin tombe en dessous de 25 pour cent,
- la clôture de l'étude n'est pas déclenchée par la mort prématurée des animaux du seul groupe ayant reçu la dose la plus élevée,
- la survie des animaux est prise en considération séparément pour chaque sexe,
- l'étude n'est pas prolongée au-delà du point où les données pouvant être tirées de l'étude ne sont plus suffisantes pour permettre une évaluation statistiquement valable.

OBSERVATIONS (PHASE DE TOXICITÉ CHRONIQUE)

36. Tous les animaux sont soumis à un examen quotidien, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris, pour déterminer la morbidité et la mortalité. Des observations cliniques générales sont effectuées au moins une fois par jour, de préférence au(x) même(s) moment(s) de la journée, en tenant compte du moment où l'on prévoit que les effets des différentes doses atteindront leur intensité maximale après administration par gavage.
 37. Tous les animaux font l'objet d'observations cliniques détaillées au moins une fois avant la première exposition (pour permettre des comparaisons intra-individuelles), à la fin de la première semaine de l'étude, et une fois par mois ensuite. Les observations respectent un protocole qui réduit au minimum les variations entre observateurs et les rend indépendantes du groupe testé. Ces observations sont effectuées hors de la cage où sont logés les animaux, de préférence dans une enceinte normalisée et à heures fixes. Elles sont soigneusement consignées, de préférence en utilisant un système de cotation explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Les conditions d'observation demeurent aussi constantes que possible. Les observations portent notamment sur les symptômes suivants (sans que cette liste soit exhaustive): modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux et des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions, et réactions neurovégétatives (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, variation du diamètre pupillaire, respiration anormale). Il convient également de consigner les changements dans la démarche, la posture et les réactions à la manipulation, ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques et les comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou bizarres (par exemple, automutilation, marche à reculons) (32).
 38. Avant la première administration de la substance d'essai, tous les animaux font l'objet d'un examen ophtalmologique effectué à l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un autre appareil approprié. À l'issue de l'étude, cet examen est réalisé de préférence sur tous les animaux, mais au moins sur ceux du groupe traité à la dose la plus élevée et du groupe témoin. Si des altérations oculaires liées au traitement sont détectées, tous les animaux sont examinés. Si l'analyse structurale ou d'autres observations suggèrent une toxicité oculaire, il faut augmenter la fréquence des examens oculaires.
 39. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets neurotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 et/ou 90 jours, une vérification de la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (32) (stimuli auditifs, visuels ou proprioceptifs, par exemple) (33) (34) (35) et une évaluation de la force de préhension (36) ainsi que de l'activité motrice (37) pourront être menées en option. Elles seront réalisées avant le début de l'étude et tous les 3 mois par la suite, jusqu'à 12 mois inclusivement, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois). On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. Toutefois, d'autres modes opératoires que ceux figurant dans ces références sont également utilisables.
 40. Dans le cas de substances ayant présenté un potentiel d'induction d'effets immunotoxiques lors d'essais antérieurs de toxicité à doses répétées sur 28 et/ou 90 jours, d'autres examens sur cet effet peuvent être menés en option à la fin de l'étude.
- Poids corporel, prise d'aliments et d'eau, et efficacité alimentaire*
41. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La prise d'aliments et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la prise d'eau est aussi mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la prise d'eau dans les études où celle-ci est modifiée.

Hématologie et biologie clinique

42. Dans les études faisant intervenir des rongeurs, des examens hématologiques sont effectués sur tous les animaux d'expérience (10 mâles et 10 femelles par groupe) à 3, 6 et 12 mois, ainsi qu'à la fin de l'étude (si celle-ci dure plus de 12 mois). Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer tous les examens hématologiques requis (voir paragraphe 19). Dans les études faisant intervenir des non-rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien), à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, si aucun effet sur les paramètres hématologiques n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Les échantillons de sang sont prélevés en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbitaire, sous anesthésie.
43. Les investigations portent sur les paramètres suivants (38): numération leucocytaire totale et différentielle, numération érythrocytaire et plaquettaire, concentration d'hémoglobine, hématocrite (volume cellulaire sanguin après centrifugation), volume corpusculaire moyen (VCM), hémoglobine corpusculaire moyenne (HCM), concentration d'hémoglobine corpusculaire moyenne (CHCM), temps de prothrombine et temps de thromboplastine partielle activée. D'autres paramètres hématologiques tels que les corps de Heinz et autres anomalies morphologiques érythrocytaires ou la méthémoglobine peuvent être étudiés si nécessaire en fonction de la toxicité de la substance d'essai. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance d'essai donnée. Si la substance d'essai exerce un effet sur le système hématopoïétique, des numérations réticulocytaires et une cytologie médullaire peuvent être également indiquées mais n'ont pas à être pratiquées de manière systématique.
44. Des analyses de biochimie clinique, visant à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur le rein et le foie, sont effectuées à partir d'échantillons de sang prélevés sur tous les animaux étudiés (10 mâles et 10 femelles par groupe) à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques. Si des souris sont utilisées, il peut être nécessaire de constituer des groupes satellites afin de pouvoir effectuer toutes les analyses de biochimie clinique nécessaires. Dans les études faisant intervenir des non-rongeurs, les échantillons seront prélevés sur un plus petit nombre d'animaux (par exemple 4 animaux de chaque sexe par groupe dans les études chez le chien), à des stades intermédiaires et à la fin de l'étude, de la même manière que chez les rongeurs. Des examens à 3 mois, chez les rongeurs comme chez les autres animaux, sont superflus si aucun effet sur les paramètres de biochimie clinique n'a été observé lors d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables. Il est recommandé de faire jeûner les animaux (à l'exception des souris) pendant la nuit qui précède la prise de sang ⁽¹⁾. Les investigations portent sur les paramètres suivants (38): glucose, urée (azote uréique), créatinine, protéines totales, albumine, calcium, sodium, potassium, cholestérol total, au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatocellulaires (alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase, glutamate déshydrogénase, acides biliaires totaux) (39) et au moins deux enzymes révélatrices des effets hépatobiliaires (phosphatase alcaline, gamma-glutamyl transférase, 5'-nucléotidase, bilirubine totale, acides biliaires totaux) (39). D'autres paramètres de chimie clinique, tels que les triglycérides à jeun, des hormones spécifiques et la cholinestérase peuvent être mesurés si nécessaire en fonction de la toxicité de la substance d'essai. Dans l'ensemble, il convient d'adapter l'approche suivie à l'effet observé et/ou attendu d'une substance d'essai donnée.
45. Des analyses d'urine sont effectuées à partir d'échantillons prélevés sur tous les animaux étudiés (10 mâles et 10 femelles par groupe) à des intervalles de temps semblables à ceux spécifiés pour les examens hématologiques et de chimie clinique. Il ne sera pas nécessaire d'effectuer des dosages à 3 mois si les analyses d'urine pratiquées dans le cadre d'une étude antérieure menée sur 90 jours à des niveaux de doses comparables n'ont révélé aucun effet. La liste suivante de paramètres à étudier fait partie d'une recommandation d'experts relative aux études de pathologie clinique (38): aspect, volume, osmolalité ou poids spécifique, pH, protéines totales et glucose. D'autres mesures, notamment la recherche de corps cétoniques, d'urobilinogène, de bilirubine et de sang occulte, peuvent aussi être réalisées. L'étude d'autres paramètres peut aussi s'avérer nécessaire pour élargir les recherches sur l'effet ou les effets observés.
46. On considère généralement que dans les études portant sur des chiens, il est nécessaire de déterminer les variables hématologiques et de biochimie clinique de base avant le début du traitement, mais que ce n'est pas indispensable dans les études portant sur des rongeurs (38). Toutefois, si l'on ne dispose pas de données historiques de base appropriées (voir paragraphe 58), il convient d'envisager d'en obtenir.

PATHOLOGIE

Autopsie macroscopique

47. Tous les animaux de l'étude font normalement l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. Toutefois, des dispositions peuvent aussi être prises (dans les groupes d'animaux sacrifiés en cours d'étude ou les groupes satellites) pour limiter ces observations à des mesures essentielles spécifiques telles que la neurotoxicité ou l'immunotoxicité (voir paragraphe 21). Il n'est pas nécessaire que ces animaux fassent l'objet d'une autopsie, ni des procédures ultérieures décrites dans les paragraphes qui suivent. L'autopsie des animaux sentinelles pourra devoir être effectuée au cas par cas, à la discrétion du directeur de l'étude.

⁽¹⁾ Pour un certain nombre de dosages effectués sur le sérum ou le plasma, et plus particulièrement pour le dosage du glucose, il est préférable de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang. En l'absence de jeûne, la variabilité des résultats est en effet plus grande, et risque de masquer des effets plus subtils ainsi que de rendre l'interprétation plus difficile. En revanche, le jeûne peut modifier le métabolisme général des animaux et, en particulier dans les études d'alimentation, perturber l'exposition quotidienne à la substance d'essai. Tous les animaux sont évalués dans le même état physiologique et il sera donc préférable de programmer les évaluations détaillées ou neurologiques pour un autre jour que celui des prélèvements de biochimie clinique.

48. Il convient de déterminer le poids des organes de tous les animaux hormis ceux mentionnés dans la dernière partie du paragraphe 47. Les glandes surrénales, le cerveau, les épидидymes, le cœur, les reins, le foie, les ovaires, la rate, les testicules, la thyroïde (pesée après fixation, avec les glandes parathyroïdes) et l'utérus de tous les animaux (excepté ceux trouvés moribonds et/ou ayant été sacrifiés en cours d'étude) sont débarrassés, le cas échéant, de tout tissu adhérent et pesés à l'état frais dès que possible après la dissection, pour prévenir la dessiccation.
49. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (40) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif):

toutes les lésions	macroscopiques	ganglions lymphatiques	(superficiels et profonds)
muscle squelettique	rein	aorte	glande coagulante
nerf périphérique	[sternum]	[bulbe olfactif]	glande de Harder
[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]	testicule	cæcum	glande lacrymale (exorbitale)
œil (dont rétine)	thymus	cerveau (segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)
œsophage	thyroïde	cœur	glande salivaire
ovaire	trachée	col utérin	glande surrénale
pancréas	[uretère]	côlon	hypophyse
parathyroïde	[urètre]	[dents]	iléon
peau	utérus (col inclus)	duodénum	jéjunum
poumon	vagin	épididyme	[langue]
prostate	vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)	estomac (pré-estomac, moelle épinière rate vésicule séminale estomac glandulaire)	(niveaux cervical, mésothoracique et lombaire)
[fémur avec articulation]	segment de moelle osseuse et/ou moelle osseuse fraîchement ponctionnée	rectum	vessie
foie			

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues de la substance d'essai sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu d'examiner les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Dans les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des chapitres B.8 (9) et B.29 (10) de la présente annexe. Pour les autres organes et tissus (autre les tissus des voies respiratoires spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

Histopathologie

50. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (40). Au minimum, les examens devront porter sur les tissus suivants:

— tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin,

- tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude,
- tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques,
- tissus des organes cibles, ou tissus présentant des altérations dues au traitement dans le groupe à dose élevée, prélevés sur tous les animaux de tous les autres groupes de doses,
- dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

OBSERVATIONS (PHASE DE CANCÉROGÈNESE)

51. Un examen de la morbidité ou de la mortalité est effectué quotidiennement chez tous les animaux, généralement en début et en fin de journée, fins de semaine et jours fériés compris. Une recherche de signes spécifiques significatifs sur le plan toxicologique est aussi effectuée une fois par jour. Dans le cas d'une étude par gavage, les animaux sont examinés immédiatement après l'administration de la dose. Une attention particulière devra être accordée au développement de tumeurs, et le moment d'apparition, la localisation, les dimensions, l'aspect et la progression de chaque tumeur nettement visible ou palpable sont consignés.
52. Tous les animaux sont pesés au début du traitement, au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. La prise d'aliments et l'efficacité alimentaire sont aussi mesurées au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Lorsque la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la prise d'eau est aussi mesurée au moins une fois par semaine pendant les 13 premières semaines, puis au moins une fois par mois. Il peut également être utile de mesurer la prise d'eau dans les études où celle-ci est modifiée.

Hématologie, biochimie clinique et autres mesures

53. Afin d'obtenir le plus possible d'informations de l'étude, surtout en ce qui concerne le mode d'action de la substance, il peut être utile d'effectuer des prélèvements sanguins afin de procéder à des analyses hématologiques et de biochimie clinique, mais la décision concernant ces prélèvements appartient au directeur de l'étude. Des analyses d'urine peuvent être aussi appropriées. Les données obtenues sur les animaux étudiés dans la phase de toxicité chronique, normalement d'une durée de 12 mois (voir paragraphe 34), renseignent sur ces paramètres. On trouvera des informations complémentaires sur l'intérêt de tels prélèvements pour une étude de cancérogenèse dans le document d'orientation n° 116 (7). Les éventuels prélèvements sanguins sont à recueillir à la fin de l'étude, juste avant ou pendant le sacrifice des animaux. Ils sont effectués en un point déterminé, par exemple par ponction cardiaque ou au niveau du sinus rétro-orbital, sous anesthésie. Des étalements sanguins peuvent aussi être préparés en vue d'un examen, notamment si la moelle osseuse semble être l'organe cible, bien que l'utilité d'un tel examen pour l'évaluation du potentiel cancérogène/oncogène pendant la phase de cancérogenèse ait été mise en question (38).

PATHOLOGIE

Autopsie macroscopique

54. Tous les animaux de l'étude à l'exception des sentinelles et autres animaux satellites (voir paragraphe 20), font l'objet d'une autopsie macroscopique complète et détaillée, comprenant un examen attentif de la surface externe du corps et de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leurs contenus. L'autopsie des sentinelles et autres animaux satellites peut être effectuée au cas par cas, à la discrétion du directeur de l'étude. La pesée des organes ne fait normalement pas partie d'une étude de cancérogenèse car les changements liés à l'âge ou, dans des phases plus avancées, au développement de tumeurs rendent superflues les données relatives au poids des organes. Ces données peuvent toutefois présenter un grand intérêt pour les évaluations fondées sur le poids de la preuve, notamment en ce qui concerne le mode d'action. Si ces données font partie d'une étude satellite, elles sont collectées dans l'année suivant le début de l'étude.
55. Les tissus suivants sont conservés dans le milieu de fixation le plus approprié, à la fois pour le type de tissu et pour l'examen histopathologique prévu (40) (l'examen des tissus indiqués entre crochets est facultatif):

toutes les lésions macroscopiques	ganglions lymphatiques	(superficiels et profonds)	muscle squelettique
rein	aorte	glande coagulante	nerf périphérique
[sternum]	[bulbe olfactif]	glande de Harder	[voies respiratoires supérieures dont nez, cornets et sinus paranasaux]
testicule	cæcum	glande lacrymale (exorbitale)	cœil (dont rétine)
thymus	cerveau (segments d'encéphale, de cervelet et de bulbe rachidien/pont)	glande mammaire (obligatoire pour les femelles et, si visible à la dissection, aussi pour les mâles)	œsophage

thyroïde	cœur	glande salivaire	ovaire
trachée	col utérin	glande surrénale	pancréas
[uretère]	côlon	hypophyse	parathyroïde
[urètre]	[dents]	iléon	peau
utérus (col inclus)	duodénum	jéjunum	poumon
vagin	épididyme	[langue]	prostate
vésicule biliaire (pour les espèces autres que le rat)	estomac (pré-estomac, moelle épinière rate vésicule séminale)	estomac glandulaire)	(niveaux cervical, méso-thoracique et lombaire)
[fémur avec articulation]	segment de moelle osseuse et/ou aspirat frais	rectum	vessie
foie			

Dans le cas des organes allant par paires, par exemple les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont préservés. Les observations, notamment cliniques, peuvent amener à examiner d'autres tissus. Tous les organes considérés comme des organes cibles potentiels du fait des propriétés connues de la substance d'essai sont aussi conservés. Dans les études portant sur une administration par la voie cutanée, il y a lieu d'examiner les organes figurant sur la liste établie pour la voie orale et de procéder à un prélèvement et une conservation spécifiques de la peau provenant du site d'application. Dans les études par inhalation, la liste des tissus des voies respiratoires conservés et examinés est conforme aux recommandations des chapitres B.8 (8) et B.29 (9) de la présente annexe. Pour les autres organes et tissus (autre les tissus des voies respiratoires spécifiquement conservés), il convient d'examiner les organes de la liste établie pour la voie orale.

Histopathologie

56. Des informations sont disponibles sur les meilleures pratiques en matière de conduite des études de pathologie toxicologique (40). Au minimum, les examens histopathologiques devront porter sur les tissus suivants:

- tous les tissus prélevés dans le groupe à dose élevée et le groupe témoin,
- tous les tissus prélevés sur les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude,
- tous les tissus présentant des anomalies macroscopiques, notamment des tumeurs,
- lorsque des altérations histopathologiques dues au traitement sont observées dans le groupe à dose élevée, ces mêmes tissus sont examinés chez tous les animaux de tous les autres groupes de doses,
- dans le cas des organes allant par paires, comme les reins ou les glandes surrénales, les deux organes sont examinés.

RÉSULTATS ET RAPPORT (CANCÉROGENÈSE ET TOXICITÉ CHRONIQUE)

Résultats

57. Des données sont recueillies pour chaque animal sur tous les paramètres évalués. En outre, toutes les données sont résumées sous forme de tableaux synoptiques indiquant, pour chaque groupe expérimental, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou du sacrifice, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés, ainsi que le moment de l'apparition, la durée et la gravité de tous les effets toxiques observés, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions et le pourcentage d'animaux présentant chaque type de lésion. Les tableaux récapitulatifs présentent les moyennes et les écarts-types (pour les données recueillies en continu) pour les animaux présentant des effets toxiques ou des lésions, ainsi qu'une cotation des lésions.

58. Les données de contrôle historiques peuvent faciliter l'interprétation des résultats de l'étude, par exemple lorsque les données provenant des témoins concurrents semblent diverger de manière significative de données récentes obtenues sur des animaux témoins issus de la même installation d'essai/colonie d'élevage. Si elles sont évaluées, les données de contrôle historiques émanent du même laboratoire, portent sur des animaux du même âge et de la même souche, produits dans les cinq ans précédant l'étude en question.
59. Si possible, les résultats numériques sont évalués à l'aide d'une méthode statistique appropriée et largement reconnue. Les méthodes statistiques et les données à analyser sont choisies au moment de la conception de l'étude (paragraphe 9). Ce choix permet d'opérer des ajustements en fonction de la survie, si nécessaire.
60. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes:

Substance d'essai:

- état physique, pureté et propriétés physico-chimiques,
- données d'identification,
- provenance de la substance,
- numéro de lot,
- certificat d'analyse chimique.

Véhicule (le cas échéant):

- justification du choix du véhicule (s'il est autre que l'eau).

Animaux d'expérience:

- espèce/souche utilisée et justification du choix fait,
- nombre, âge et sexe des animaux au début de l'essai,
- provenance, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions expérimentales:

- justification de la voie d'administration et du choix des doses,
- le cas échéant, méthodes statistiques utilisées pour analyser les données,
- détails concernant la formulation de la substance d'essai ou son incorporation dans les aliments,
- données analytiques sur la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation,
- voie d'administration et détails concernant l'administration de la substance d'essai,
- pour les études par inhalation, mention de la voie d'entrée (nez seul ou corps entier),
- doses réelles (mg/kg de poids corporel/jour) et, le cas échéant, facteur de conversion en dose réelle de la concentration de la substance d'essai (en mg/kg ou en ppm) dans les aliments ou l'eau de boisson,
- détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats (les résultats comprendront des données générales sous forme de tableaux synoptiques et des données propres à chaque animal)

Résultats généraux:

- données sur la survie,
- poids corporel/variations du poids corporel,
- prise d'aliments, calculs de l'efficacité alimentaire, si effectués, et prise d'eau, le cas échéant,
- données toxicocinétiques (si disponibles),
- ophtalmoscopie (si disponible),
- hématologie (si disponible),
- chimie clinique (si disponible).

Résultats cliniques:

- signes de toxicité,
- incidence (et, si elle est évaluée, sévérité) de toute anomalie observée,
- nature, sévérité et durée des observations cliniques (transitoires ou permanentes).

Données relatives aux autopsies:

- poids corporel à l'issue de l'essai,
- poids des organes et leur rapport au poids corporel, le cas échéant,
- résultats d'autopsie; incidence et sévérité des anomalies.

Histopathologie:

- observations d'effets histopathologiques non néoplasiques,
- observations d'effets histopathologiques néoplasiques,
- corrélation entre les observations macroscopiques et microscopiques,
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques liés au traitement et échelle d'évaluation de la sévérité,
- apport sur l'analyse éventuelle des lames par des pairs.

Traitement statistique des résultats, le cas échéant

Discussion des résultats, notamment:

- examen de toutes les approches de modélisation,
- relations dose-réponse,
- données de contrôle historiques,

- examen de toutes les informations concernant le mode d'action,
- détermination des DR, DSENO et DMENO (dose minimale avec effet nocif observé),
- applicabilité des résultats à l'être humain.

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), document de travail interne, direction de l'environnement, OCDE, Paris.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- (3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208
- (4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191
- (5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445
- (6) Chapitre B.27 de la présente annexe, Essai de toxicité subchronique par voie orale – Toxicité orale à doses répétées – non rongeurs: 90 jours.
- (7) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Série sur les essais et évaluations n° 116, disponible sur le site internet public de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (www.oecd.org/env/testguidelines).
- (8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.
- (9) Chapitre B.8 de la présente annexe. Toxicité subaiguë par inhalation: étude sur 28 jours.
- (10) Chapitre B.29 de la présente annexe, Toxicité subchronique par inhalation: étude sur 90 jours.
- (11) Chapitre B.9 de la présente annexe, Toxicité à doses répétées (28 jours) (administration cutanée).
- (12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.
- (13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., Fenner-Crisp P.A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.
- (14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.
- (15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.
- (16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

- (17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 9-35.
- (18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 37-68.
- (19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 69-98.
- (20) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Série sur les essais et évaluations n° 35 et série sur les pesticides n° 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.
- (21) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.
- (22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit. Rev. Toxicol.* 37 (9): 729 – 837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. and Lumley C.E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T., Griffiths S.A. and Lumley C.E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy P.O.F. & Harron D.W.G. (eds). *Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation*. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.
- (26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect* 105:1196-1203.
- (27) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).
- (28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, DC, US. Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.
- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 21:15-23.
- (32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (33) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.

-
- (34) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691-704.
- (35) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.
- (36) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.
- (37) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.
- (38) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (39) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- (40) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.
-

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.»

7) le chapitre B.36 est remplacé par le texte suivant:

«B.36. TOXICOCINÉTIQUE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 417 (2010) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les études portant sur la toxicocinétique d'une substance chimique d'essai ont pour objet de fournir des informations adéquates sur l'absorption, la distribution, la biotransformation (c'est-à-dire le métabolisme) et l'excrétion de cette substance, de faciliter l'établissement d'une relation entre la concentration ou la dose et la toxicité observée, et d'aider à comprendre le mécanisme de toxicité. La toxicocinétique peut aider à comprendre les études de toxicologie en démontrant que l'exposition des animaux d'expérience à la substance d'essai est de nature systémique, et en révélant quels sont les éléments circulants (substance mère/métabolites). Les principaux paramètres toxicocinétiques tirés de ces études fourniront également des renseignements sur le potentiel d'accumulation de la substance d'essai dans les tissus et/ou organes, et sur le risque d'induction d'une biotransformation sous l'effet d'une exposition à cette substance.
2. Les données toxicocinétiques peuvent aider à évaluer l'adéquation et la pertinence des données de toxicité animale, à des fins d'extrapolation des dangers pour l'homme et/ou d'évaluation des risques. De plus, les études de toxicocinétique peuvent apporter des informations utiles pour déterminer les doses à utiliser dans les études de toxicité (cinétique linéaire vs non linéaire), et les effets liés à la voie d'administration, la biodisponibilité et autres aspects relatifs à la conception de l'étude. Certains types de données toxicocinétiques peuvent servir à élaborer des modèles toxicocinétiques à base physiologique (TCBP).
3. Les données sur la toxicocinétique et le métabolisme présentent de l'intérêt à plusieurs titres. Elles peuvent notamment indiquer les toxicités et modes d'action éventuels, ainsi que leur relation aux doses et à la voie d'exposition. En outre, les données sur le métabolisme peuvent apporter des informations utiles pour évaluer l'importance, sur le plan toxicologique, de l'exposition à des métabolites exogènes de la substance d'essai.
4. Des données toxicocinétiques adéquates aideront à confirmer l'acceptabilité et l'applicabilité des méthodes fondées sur les relations quantitatives structure-activité, les prévisions à partir de données croisées sur de substances analogues ou le regroupement des substances pour évaluer la sécurité des substances chimiques. Les données de cinétique peuvent aussi servir à évaluer la pertinence toxicologique d'autres études (par exemple in vivo/in vitro).
5. Sauf mention contraire (voir en particulier les paragraphes 74 à 78), la présente méthode d'essai suppose l'administration orale de la substance d'essai.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

6. Les régimes réglementaires ont des exigences et des besoins différents quant aux effets et paramètres toxicocinétiques à mesurer pour différentes classes de produits chimiques (par exemple pesticides, biocides, produits industriels). Contrairement à la plupart des autres, la présente méthode d'essai décrit des essais de toxicocinétique impliquant des mesures et des effets observés multiples. À l'avenir, plusieurs nouvelles méthodes d'essai et/ou document(s) d'orientation pourraient être élaborés pour décrire séparément et plus en détail chaque effet mesuré. Dans le cas de la présente méthode d'essai, ce sont les exigences et/ou besoins de chaque dispositif réglementaire qui déterminent les essais ou l'évaluation à mettre en œuvre.
7. De nombreuses études peuvent être réalisées pour évaluer à des fins réglementaires le comportement toxicocinétique d'une substance d'essai. Néanmoins, en fonction des besoins ou des situations réglementaires particulières, toutes ces études ne sont pas nécessaires à l'évaluation d'un produit. Dans la conduite des études de toxicocinétique, il faut faire preuve de souplesse et prendre en considération les caractéristiques de la substance d'essai. Dans certains cas, l'étude d'une série précise de questions peut suffire à cerner les dangers et les risques associés à la substance d'essai. Parfois, les données toxicocinétiques peuvent être collectées dans le cadre d'une évaluation relevant d'autres études toxicologiques. Dans d'autres cas, il peut être nécessaire de réaliser des études de toxicocinétique supplémentaires et/ou plus approfondies, si la réglementation en vigueur l'exige et/ou lorsque l'évaluation de la substance d'essai soulève de nouvelles interrogations.
8. Avant de lancer une étude, et pour en améliorer la qualité et éviter une utilisation non nécessaire d'animaux, le laboratoire d'essai prend en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai et sur ses métabolites et analogues pertinents. Parmi ces informations pourront figurer des données obtenues grâce à d'autres méthodes d'essai appropriées (études in vivo, in vitro, et/ou évaluations in silico). Les propriétés physico-chimiques, comme le coefficient de partage octanol-eau (log P_{OE}), le pKa, l'hydrosolubilité, la pression

de vapeur et le poids moléculaire d'un produit chimique, peuvent être utiles pour planifier l'étude et interpréter ses résultats. Les méthodes décrites à cet effet dans les différentes méthodes d'essai permettront de les déterminer

LIMITATIONS

9. La présente méthode d'essai ne vise pas les cas particuliers, comme les femelles gravides ou en lactation et leur progéniture, ni l'évaluation de la présence éventuelle de résidus chez des animaux exposés servant à l'alimentation. Néanmoins, les données obtenues à l'issue d'une étude menée selon la méthode B.36 peuvent fournir des informations susceptibles d'orienter la conception d'études spécifiques sur ces sujets. La présente méthode d'essai n'est pas destinée aux essais de nanomatériaux. L'examen préliminaire des Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques en vue d'évaluer leur applicabilité aux nanomatériaux indique en effet que la ligne directrice 417 (équivalente à la présente méthode d'essai) peut ne pas s'appliquer à ces derniers (1).

DÉFINITIONS

10. Les définitions utilisées aux fins de la présente méthode d'essai figurent en appendice.

CONSIDÉRATIONS RELATIVES AU BIEN-ÊTRE DES ANIMAUX

11. On trouvera dans le document d'orientation de l'OCDE n° 19 (2) des indications concernant le traitement éthiquement acceptable des animaux. La consultation de ce document est recommandée pour toutes les études in vivo et in vitro décrites dans la présente méthode d'essai.

DESCRIPTION DES MÉTHODES

Études pilotes

12. Pour le choix des paramètres expérimentaux s'appliquant aux études de toxicocinétique (par exemple métabolisme, bilan massique, protocoles analytiques, dosage, exhalation de CO₂, etc.), il est recommandé et conseillé de recourir à des études pilotes. La caractérisation de ces paramètres ne nécessite pas systématiquement l'emploi de substances radiomarquées.

Sélection des animaux

Espèces

13. Les espèces (et souches) animales utilisées pour les essais de toxicocinétique sont de préférence les mêmes que celles employées dans d'autres études toxicologiques réalisées avec la substance d'essai concernée. C'est normalement le rat qui est retenu, puisque les études toxicologiques l'utilisent massivement. Le recours à d'autres espèces, à la place ou en complément, est légitime si des études toxicologiques majeures indiquent des effets toxiques significatifs sur ces espèces, ou s'il est démontré que le comportement de ces dernières en termes de toxicité/toxicocinétique est plus pertinent pour l'homme. Il conviendra de justifier le choix de l'espèce animale et de la souche.
14. Sauf mention contraire, la présente méthode d'essai suppose le rat comme espèce d'essai. Certains aspects de cette méthode d'essai pourraient devoir être modifiés en cas de recours à une autre espèce.

Âge et souche

15. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes en bonne santé, âgés normalement de 6 à 12 semaines au moment de l'administration de la dose (voir également les paragraphes 13 et 14). L'utilisation d'animaux autres que des jeunes adultes fait l'objet de justification. Tous les animaux ont à peu près le même âge au début de l'étude. Les écarts de poids entre individus ne dépassent pas $\pm 20\%$ du poids moyen du groupe d'essai. Idéalement, la souche utilisée est la même que celle employée pour constituer la base de données toxicologiques concernant la substance d'essai.

Nombre et sexe des animaux

16. Pour chaque dose testée, au minimum quatre animaux de même sexe sont utilisés. Il convient de justifier le sexe des animaux employés. L'utilisation d'animaux des deux sexes (quatre mâles et quatre femelles) est envisagée s'il existe des éléments attestant de différences de toxicité notables en fonction du sexe.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

17. Les animaux sont en général placés dans des cages individuelles pendant la période d'essai. L'encagement collectif se justifie dans des circonstances particulières. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. La température de l'animalerie d'expérience est de 22 °C (± 3 °C) et l'humidité relative de 30 à 70 %. L'alimentation pourra comporter une nourriture classique de laboratoire et de l'eau à satiété.

Substance d'essai

18. Une substance d'essai radiomarquée au ^{14}C est utilisée pour tous les aspects de l'étude concernant le bilan massique et l'identification des métabolites; néanmoins, s'il peut être démontré:

- qu'il est possible d'évaluer correctement le bilan massique et de procéder à l'identification des métabolites à l'aide d'une substance d'essai non marquée, et
- que la spécificité et la sensibilité analytiques de la méthode utilisant une substance d'essai non radioactive sont égales ou supérieures à celles qu'on obtiendrait avec une substance radiomarquée,

alors il n'est pas nécessaire de recourir à une substance d'essai radiomarquée. Par ailleurs, d'autres isotopes radioactifs et stables peuvent être employés, en particulier si l'élément en question cause la toxicité ou fait partie de la portion toxique de la substance d'essai. Si possible, le marqueur radioactif se situe dans une portion centrale métaboliquement stable (c'est-à-dire qui n'est pas échangeable, n'est pas éliminée par métabolisme sous forme de CO_2 , et n'est pas incorporée dans l'ensemble des radicaux monocarbonés de l'organisme) de la molécule. Le marquage de sites multiples ou de régions spécifiques de la molécule peut être nécessaire pour suivre le devenir métabolique de la substance d'essai.

19. Les substances d'essai radiomarquées et non radiomarquées sont analysées à l'aide de méthodes appropriées permettant d'établir leur pureté et leur identité. La radiopureté de la substance d'essai radioactive est la meilleure qu'on puisse obtenir pour une substance donnée (dans l'idéal, elle est supérieure à 95 %) et un effort raisonnable est fourni pour identifier les impuretés présentes à hauteur de 2 % ou plus. La pureté ainsi que l'identité et la proportion des éventuelles impuretés identifiées sont incluses dans le rapport d'essai. Certains programmes réglementaires peuvent choisir de fournir des orientations supplémentaires pour aider à définir et à spécifier les substances d'essai composées de mélanges, ainsi que les méthodes de détermination de la pureté.

Choix des doses*Étude pilote*

20. Le plus souvent, une dose orale unique suffit pour l'étude pilote. La dose est non toxique, mais suffisamment élevée pour permettre l'identification des métabolites dans les excréta (et, le cas échéant, dans le plasma), ainsi que pour remplir l'objectif assigné à l'étude pilote au paragraphe 12 de la présente méthode d'essai.

Études principales

21. Pour les études principales, il est préférable d'administrer un minimum de deux doses, car les informations réunies à partir d'au moins deux groupes de dose peuvent faciliter la détermination des doses pour d'autres études de toxicité, ainsi que l'évaluation de la relation dose-effet d'essais de toxicité déjà disponibles.
22. Lorsque deux doses sont administrées, elles sont toutes deux suffisamment élevées pour permettre l'identification des métabolites dans les excréta (et, le cas échéant, dans le plasma). Les informations tirées des études de toxicité disponibles sont prises en compte pour le dosage. Si l'on ne dispose pas d'informations (provenant, par exemple, d'études de toxicité orale aiguë indiquant des signes cliniques de toxicité, ou d'études de toxicité par doses répétées), on peut envisager pour la dose la plus élevée une valeur inférieure à l'estimation de la DL_{50} (voies orale et cutanée) ou de la CL_{50} (voie par inhalation), ou inférieure à la valeur basse de la plage des estimations de toxicité aiguë. La dose la plus faible correspondra à une fraction de la dose la plus élevée.
23. Si un seul dosage est utilisé, la dose est idéalement suffisamment élevée pour permettre l'identification des métabolites dans les excréta (et, le cas échéant, dans le plasma), sans pour autant produire de toxicité apparente. Il convient de justifier la décision de ne pas inclure un second niveau de dose.
24. Si l'on a besoin de déterminer l'effet de la dose sur les processus cinétiques, deux doses peuvent ne pas suffire et il convient qu'au moins une dose soit assez élevée pour saturer ces processus. Si l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps [*area under the plasma concentration- time curve*] (AUC) ne varie pas de façon linéaire entre deux niveaux de dose utilisés dans l'étude principale, on peut en déduire que la saturation d'un ou de plusieurs des processus cinétiques s'opère quelque part entre ces deux niveaux de dose.
25. Pour les substances d'essai faiblement toxiques, il convient d'employer une dose maximale de 1 000 mg/kg de poids corporel (voies orale et cutanée) – si l'administration se fait par inhalation, se référer au chapitre B.2 de la présente annexe; généralement la dose n'excédera pas 2 mg/l. Des considérations spécifiques au produit peuvent rendre nécessaire une dose supérieure, en fonction des besoins réglementaires. Le choix des doses fait toujours l'objet d'une justification.

26. Les données relatives à la toxicocinétique ou à la distribution tissulaire fondées sur une dose unique peuvent convenir pour déterminer le potentiel d'accumulation et/ou de persistance. Néanmoins, dans certaines circonstances, l'administration de doses répétées peut être nécessaire i) pour mieux évaluer le potentiel d'accumulation et/ou de persistance, ou l'évolution des paramètres toxicocinétiques (par exemple induction et inhibition enzymatiques), ou ii) pour répondre aux exigences du dispositif réglementaire en vigueur. Dans les études à doses répétées, si l'administration de doses faibles suffit généralement, il peut parfois s'avérer nécessaire d'administrer des doses élevées (voir également le paragraphe 57).

Administration de la substance d'essai

27. La substance d'essai est dissoute ou mise en suspension homogène dans le même véhicule que celui employé pour les autres études de toxicité par gavage oral réalisées avec la substance d'essai, si des informations sont disponibles à ce sujet. Le choix du véhicule fait l'objet d'une justification. Le choix du véhicule et le volume de dosage sont pris en compte lors de la conception de l'étude. La méthode d'administration classique est le gavage; néanmoins, l'administration de la substance dans une capsule de gélatine ou mélangée à la nourriture peut être avantageuse dans certaines situations (dans les deux cas, le choix fait l'objet d'une justification). Il convient en outre de vérifier la dose effectivement administrée à chaque animal.
28. Le volume maximal de liquide à administrer par gavage oral en une seule fois dépend de la taille des animaux d'expérience, du type de véhicule de dosage, et de la suppression ou du maintien de la nourriture avant l'administration de la substance d'essai. La décision de maintenir ou de restreindre l'alimentation avant l'administration de la dose fait l'objet d'une justification. Normalement, le volume est aussi faible que possible, que le véhicule employé soit aqueux ou non. Pour les rongeurs, le volume de dose ne dépasse pas normalement 10 ml/kg de poids corporel. Dans le cas de substances d'essai plus lipophiles, les volumes de véhicule utilisés peuvent être de 4 ml/kg de poids corporel ou plus. En cas de doses répétées, si le jeûne quotidien est contre-indiqué, il faut envisager des volumes de dose plus faibles (par exemple de 2 à 4 ml/kg de poids corporel). Si possible, l'utilisation de volumes de dose en accord avec ceux utilisés pour la substance d'essai dans des études orales par gavage est envisagée.
29. L'administration de la substance d'essai en intraveineuse (IV) et sa mesure dans le sang et/ou les excréta peuvent servir à déterminer la biodisponibilité ou l'absorption orale relative. Pour ce type d'étude, une dose unique de la substance d'essai (généralement équivalente, mais non supérieure, à la dose orale la plus faible – voir "Choix des doses") est administrée à l'aide d'un véhicule approprié. Cette dose est administrée dans un volume isotonique (par exemple 1 ml/kg de poids corporel) et au site choisi, à au moins quatre animaux du sexe approprié (des animaux des deux sexes peuvent être employés s'il y a lieu, voir paragraphe 16). L'administration intraveineuse de la substance d'essai suppose de préparer une dose intégralement dissoute ou mise en suspension. On fera en sorte que le véhicule choisi pour cette administration n'interfère pas avec le flux sanguin ou l'intégrité des cellules sanguines. Si la substance d'essai est perfusée, la vitesse de perfusion est consignée et normalisée pour tous les animaux, à condition qu'une pompe à perfusion soit utilisée. Il convient de recourir à l'anesthésie en cas de canulation de la veine jugulaire (pour administrer la substance d'essai et/ou faire un prélèvement sanguin) ou si l'on utilise l'artère fémorale pour l'administration. Le type d'anesthésie est mûrement réfléchi, car il peut avoir des conséquences toxicocinétiques. Les animaux doivent pouvoir se rétablir avant que la substance d'essai et le véhicule leur soient injectés.
30. D'autres voies d'administration, comme la voie cutanée et l'inhalation (voir paragraphes 74 à 78) peuvent également convenir pour certaines substances d'essai, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et des conditions d'utilisation ou de la voie d'exposition humaine prévisibles.

Mesures

Bilan massique

31. Le bilan massique est déterminé par la somme du pourcentage de la dose (radioactive) administrée excrétés dans l'urine, les fèces et l'air expiré, et du pourcentage présent dans les tissus, la carcasse résiduelle, et le liquide de lavage de la cage (voir paragraphe 46). En général, une récupération totale de plus de 90 % de la substance d'essai (radioactivité) administrée est considérée comme satisfaisante.

Absorption

32. Une estimation initiale de l'absorption peut être réalisée en excluant du bilan massique le pourcentage de la dose retrouvé dans le tractus gastro-intestinal et/ou dans les fèces. Pour le calcul du pourcentage d'absorption, voir le paragraphe 33. Pour l'analyse des excréta, voir les paragraphes 44 à 49. Si l'importance exacte de l'absorption faisant suite à l'administration d'une dose orale ne peut être établie à partir des études de bilan massique (par exemple, lorsque plus de 20 % de la dose administrée est présente dans les fèces), des explorations plus poussées peuvent être nécessaires. Elles peuvent comprendre soit 1) l'administration orale de la substance d'essai et la mesure de sa présence dans la bile, soit 2) l'administration orale et intraveineuse de la substance d'essai, et la mesure de la quantité nette de substance présente dans l'urine, plus dans l'air expiré, plus dans la carcasse pour chacune de ces deux voies. Dans les deux cas, la mesure de la radioactivité est utilisée comme méthode de substitution à l'analyse spécifique de la substance d'essai et de ses métabolites.
33. Pour étudier l'excrétion biliaire, on administre généralement la substance d'essai par voie orale. Dans ce type d'étude, les voies biliaires d'au moins quatre animaux du sexe approprié (ou des deux sexes le cas échéant) sont canulées et une dose unique de la substance d'essai est administrée. Après l'administration, il convient de surveiller aussi longtemps que nécessaire l'excrétion de radioactivité/substance d'essai dans la bile, afin d'estimer le pourcentage de la dose administrée excrété par cette voie, ce qui peut ensuite servir à calculer l'ampleur de l'absorption orale, de la manière suivante:

Pourcentage d'absorption = (quantités présentes dans la bile + l'urine + l'air expiré + la carcasse hors tractus gastro-intestinal)/quantité administrée × 100

34. Pour certaines classes de substances d'essai, une sécrétion directe de la dose absorbée peut avoir lieu au travers des membranes intestinales. Dans ce cas, la mesure du pourcentage de la dose présent dans les fèces après administration orale chez un rat aux voies biliaires canulées n'est pas jugée représentative de la dose non absorbée. Il est recommandé, si on prévoit une sécrétion intestinale, de calculer le pourcentage de la dose absorbé en estimant l'absorption par comparaison de l'excrétion après administration par voie orale et par voie intraveineuse (rat intact ou à voies biliaires canulées) (voir paragraphe 35). Il est également conseillé, quand la quantification de la sécrétion intestinale est jugée nécessaire, de mesurer l'excrétion chez le rat à voies biliaires canulées après administration intraveineuse de la dose.

Biodisponibilité

35. Il est possible de déterminer la biodisponibilité à partir de la cinétique plasmatique/sanguine des groupes oraux et IV, comme décrit aux paragraphes 50 à 52, par une analyse spécifique de la substance d'essai et/ou de son (ses) métabolite(s) pertinent(s), c'est-à-dire sans qu'il soit besoin de recourir à une substance d'essai radiomarkée. Le calcul de la biodisponibilité (F) de la substance d'essai ou de son (ses) métabolite(s) pertinents s'effectue alors comme suit:

$$F = (AUC_{\text{exp}}/AUC_{\text{IV}}) \times (Dose_{\text{IV}}/Dose_{\text{exp}})$$

où AUC est l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps et exp la voie d'administration (orale, cutanée ou par inhalation).

36. Afin d'évaluer les risques liés aux effets systémiques, on préfère généralement utiliser la biodisponibilité du composant toxique plutôt que le pourcentage d'absorption pour comparer les concentrations systémiques provenant d'études animales avec des données analogues de surveillance biologique tirées d'études sur l'exposition des travailleurs. La situation peut se complexifier si les doses se situent dans la plage non linéaire, aussi importe-t-il que l'étude de toxicocinétique détermine des doses dans la plage linéaire.

Distribution tissulaire

37. Connaître la distribution tissulaire d'une substance d'essai et/ou de ses métabolites est important pour identifier les tissus cibles, comprendre les mécanismes de toxicité à l'œuvre et obtenir des informations sur le potentiel d'accumulation et de persistance de la substance d'essai et de ses métabolites. Le pourcentage de dose (radioactive) totale dans les tissus et dans la carcasse résiduelle est mesuré au minimum à la fin de l'étude d'excrétion (par exemple normalement 7 jours après le dosage ou moins en fonction du comportement spécifique de la substance d'essai). Lorsque aucune substance d'essai n'est détectée dans les tissus à la fin de l'étude (par exemple parce que la substance peut avoir été éliminée avant la fin de l'étude en raison d'une courte demi-vie), il convient de prendre soin de ne pas mal interpréter les données. Dans ce type de situation, la distribution tissulaire est examinée au moment du pic de concentration plasmatique/sanguine (T_{max}) ou au maximum du taux d'excrétion urinaire de la substance d'essai (et/ou de ses métabolites) selon le cas, (voir paragraphe 38). De plus, il se peut que la collecte de tissus à d'autres moments soit nécessaire pour évaluer la variation de la distribution en fonction du temps (s'il y a lieu), pour aider à établir le bilan massique, et/ou si une autorité compétente l'exige. Parmi les tissus à prélever figurent le foie, la graisse, le tractus gastro-intestinal, le rein, la rate, le sang total, la carcasse résiduelle, les tissus des organes cibles et tout autre tissu potentiellement intéressant pour l'évaluation toxicologique de la substance d'essai, par exemple thyroïde, hématies, organes reproducteurs, peau, ceil (en particulier pour les animaux pigmentés). On envisagera d'analyser un plus large éventail de tissus aux mêmes moments afin d'optimiser l'utilisation des animaux et si des études de toxicité chronique ou subchronique mettent en évidence une toxicité pour certains organes cibles. Il convient également de consigner la concentration du résidu (radioactif) et les ratios tissu-plasma (sanguin).
38. Il est possible que l'évaluation de la distribution tissulaire à d'autres moments, tels qu'aux moments du pic de concentration plasmatique/sanguine (par exemple T_{max}) ou au maximum du taux d'excrétion urinaire, obtenue à partir des études de cinétique plasmatique/sanguine ou d'excrétion respectivement, soit aussi nécessaire ou exigée par une autorité compétente. Cette information peut être utile pour comprendre la toxicité et le potentiel d'accumulation et de persistance de la substance d'essai et des métabolites. Le choix des éléments à prélever fait l'objet d'une justification; les prélèvements destinés à être analysés sont généralement les mêmes que ceux énumérés au paragraphe 37.
39. Pour les études sur la distribution tissulaire, il est possible de quantifier la radioactivité en procédant à la dissection, l'homogénéisation, la combustion et/ou la solubilisation des organes, puis à un comptage par scintillation liquide des résidus piégés. Certaines techniques, actuellement à différents stades de développement, notamment l'autoradiographie quantitative du corps entier et l'autoradiographie microscopique des récepteurs, peuvent s'avérer utiles pour déterminer la distribution d'une substance d'essai dans les organes et/ou les tissus (3) (4).
40. Pour les voies d'administration autres que la voie orale, on prélève et analyse des tissus spécifiques, comme les poumons dans les études par inhalation ou la peau dans les études par voie cutanée. Voir les paragraphes 74 à 78.

Métabolisme

41. On recueille les excréta (et, le cas échéant, le plasma) afin d'identifier et de quantifier la substance d'essai et ses métabolites, non modifiés, selon la méthode indiquée aux paragraphes 44 à 49. Il est acceptable de regrouper les excréta pour faciliter l'identification des métabolites au sein d'un groupe de dose donné. Il est recommandé d'établir le profil des métabolites à chaque période de l'étude. Néanmoins, si l'absence d'échantillons ou de radioactivité empêche de le faire, il est acceptable de regrouper l'urine et les fèces recueillies à différents moments, mais provenant uniquement d'animaux du même sexe ayant reçu la même dose. Des méthodes qualitatives et quantitatives appropriées sont mises en œuvre pour étudier l'urine, les fèces et la radioactivité expirée par les animaux traités, ainsi que la bile, le cas échéant.
42. Un effort raisonnable est fait pour identifier tous les métabolites présents à hauteur de 5 % ou plus de la dose administrée et pour fournir un schéma métabolique de la substance d'essai. Il convient d'identifier les substances d'essai ayant été caractérisées, dans les excréta, comme comprenant 5 % ou plus de la dose administrée. L'identification équivaut à la détermination exacte de la structure des composants. Habituellement, l'identification est réalisée en soumettant simultanément à une chromatographie le métabolite et des étalons connus, en utilisant deux systèmes différents, ou grâce à des techniques à même de fournir une identification structurale positive, par exemple spectrométrie de masse, résonance magnétique nucléaire (RMN), etc. Dans le cas d'une co-chromatographie, il faut éviter d'utiliser des techniques chromatographiques employant la même phase stationnaire avec deux systèmes de solvants différents pour vérifier l'identité de métabolites, car alors les méthodes ne sont pas indépendantes. L'identification par co-chromatographie fait usage de deux systèmes dissemblables, analytiquement indépendants, par exemple une chromatographie sur couche mince (CCM) à phase inversée et une CCM à phase normale, ou une CCM et une chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Du moment que la qualité de la séparation chromatographique est acceptable, aucune confirmation supplémentaire par spectroscopie n'est demandée. Les méthodes qui apportent des informations structurales, telles que la chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse (CG-SM), la chromatographie liquide/spectrométrie de masse (CL-SM), ou la chromatographie liquide/spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) et la spectrométrie par RMN, peuvent également fournir une identification non ambiguë.
43. S'il est impossible d'identifier les métabolites présents à hauteur de 5 % ou plus de la dose administrée, il convient de le justifier ou de l'expliquer dans le rapport final. Il peut être avisé d'identifier les métabolites représentant moins de 5 % de la dose administrée, afin de mieux comprendre la voie métabolique en vue d'évaluer les dangers et/ou les risques liés à la substance d'essai. Une confirmation de la structure de ces métabolites est autant que possible fournie. Pour cela, il pourra être nécessaire d'établir leur profil dans le plasma, le sang ou d'autres tissus.

Excrétion

44. Le taux et l'importance de l'excrétion de la dose administrée sont déterminés par la mesure du pourcentage de la dose (radioactive) retrouvé dans l'urine, les fèces et l'air expiré. Ces données aideront également à établir le bilan massique. Les quantités de substance d'essai (radioactivité) éliminées dans l'urine, les fèces et l'air expiré sont évaluées à des intervalles de temps appropriés (voir les paragraphes 47 à 49). Les expériences à doses répétées sont conçues de manière à permettre d'obtenir des données sur l'excrétion, afin de remplir les objectifs définis au paragraphe 26. On pourra ainsi effectuer des comparaisons avec les expériences à dose unique.
45. Si une étude pilote montre que la substance d'essai (radioactivité) n'est pas excrétée en quantités significatives (voir paragraphe 49) dans l'air expiré, il ne sera pas nécessaire de collecter celui-ci dans le cadre de l'étude définitive.
46. Chaque animal est placé, pour la collecte des excréta (urine, fèces et air expiré), dans une unité individuelle d'étude du métabolisme. À la fin de chaque période de collecte (voir paragraphes 47 à 49), ces unités sont rincées à l'aide d'un solvant approprié (lavage de la cage) pour assurer une récupération maximale de la substance d'essai (radioactivité). La collecte des excréta s'achève au bout de 7 jours, ou après récupération, avant ce délai, d'au moins 90 % de la dose administrée.
47. La quantité totale de substance d'essai (radioactivité) dans l'urine est déterminée à deux moments au moins de la première journée de collecte, dont une fois 24 h après l'administration de la dose, puis quotidiennement jusqu'à la fin de l'étude. Il est recommandé de retenir plus de deux points d'échantillonnage pendant la première journée (par exemple, 6 h, 12 h et 24 h après l'administration de la dose). Les résultats des études pilotes sont analysés afin d'obtenir des informations sur les moments de collecte alternatifs ou supplémentaires à mettre en œuvre. Le calendrier de collecte fait l'objet d'une justification.
48. La quantité totale de substance d'essai (radioactivité) dans les fèces est déterminée quotidiennement, 24 h après l'administration de la dose et jusqu'à la fin de l'étude, sauf si les études pilotes suggèrent d'effectuer des prélèvements plus fréquents ou à d'autres moments. Dans ce cas, une justification est fournie.
49. La collecte du CO₂ expiré et d'autres produits volatils peut être interrompue dans une étude donnée quand on retrouve moins de 1 % de la dose administrée dans l'air exhalé pendant 24 h de collecte.

Études en fonction du temps

Cinétique sanguine/plasmatique

50. Ces études visent à estimer les principaux paramètres toxicocinétiques [par exemple $C_{\max}$, $T_{\max}$, demi-vie ($t_{1/2}$), AUC] concernant la substance d'essai. Elles peuvent se mener à dose unique, mais impliquent généralement deux doses ou plus. Le dosage est à définir en fonction de la nature de l'expérience et/ou de la question étudiée. Des données cinétiques peuvent être nécessaires pour résoudre des questions comme la biodisponibilité de la substance d'essai et/ou déterminer l'effet de la dose sur l'élimination (c'est-à-dire pour établir si la saturation de l'élimination dépend ou non de la dose).
51. Pour ce type d'étude, il convient d'utiliser au moins quatre animaux du même sexe par groupe de dose. Le choix du sexe des animaux employés fait l'objet d'une justification. L'utilisation d'animaux des deux sexes (quatre mâles et quatre femelles) est envisagée s'il existe des éléments attestant de différences de toxicité notables en fonction du sexe.
52. Après l'administration de la substance d'essai (radiomarquée), il convient de prélever des échantillons de sang sur chaque animal, à des moments et selon une méthode appropriés. Le volume et le nombre des échantillons sanguins prélevés par animal sont susceptibles d'être limités par les effets éventuels de prélèvements répétés sur la santé/la physiologie des animaux et/ou par la sensibilité de la méthode analytique. Les échantillons seront analysés séparément pour chaque animal. Dans certaines circonstances (par exemple caractérisation des métabolites), il peut être nécessaire de regrouper les échantillons prélevés sur plusieurs animaux. Ces échantillons regroupés sont clairement identifiés, et le regroupement fait l'objet d'une explication. Si une substance d'essai radiomarquée est utilisée, il peut y avoir lieu d'analyser la radioactivité totale. Dans ce cas, l'analyse est effectuée dans le sang total et le plasma, ou dans le plasma et les globules rouges, pour permettre de calculer le rapport sang/plasma. Dans d'autres circonstances, il peut être nécessaire de procéder à une étude plus approfondie requérant l'identification du composé parent et/ou de ses métabolites, ou d'évaluer la fixation aux protéines.

Autres études de cinétique tissulaire

53. Ces études ont pour objet d'obtenir des informations sur l'évolution dans le temps afin de répondre à des questions liées notamment au mode d'action toxique, à la bioaccumulation et à la biopersistance en déterminant la concentration de la substance d'essai dans différents tissus. Le choix des tissus et le nombre de points temporels évalués dépendront de l'aspect étudié et de la base de données toxicologiques disponible sur la substance d'essai. Pour concevoir ces études de cinétique tissulaire complémentaires, il convient de tenir compte des informations recueillies décrites aux paragraphes 37 à 40. Ces études peuvent nécessiter un dosage unique ou un dosage répété. La méthode retenue fait l'objet d'une justification détaillée.
54. Des études de cinétique tissulaire complémentaires peuvent être entreprises:
- lorsqu'on constate une demi-vie sanguine allongée, suggérant la possibilité d'une accumulation de la substance d'essai dans différents tissus, ou
 - pour voir si un niveau d'état stationnaire a été atteint dans des tissus particuliers (dans des études à doses répétées, par exemple, même quand un niveau d'état stationnaire a apparemment été atteint dans le sang, il peut être utile de s'assurer qu'il en est de même dans les tissus cibles).
55. Pour ce type d'étude en fonction du temps, il convient d'administrer une dose orale appropriée de la substance d'essai à au moins quatre animaux par dose et par point temporel, et de surveiller l'évolution dans le temps de la distribution dans les tissus choisis. À moins qu'une toxicité spécifique liée au sexe ait été observée, on emploiera des animaux d'un seul sexe. La question de savoir si l'analyse doit porter sur la radioactivité totale ou sur la substance mère et/ou ses métabolites dépendra du problème traité. La distribution tissulaire est évaluée à l'aide des techniques appropriées.

Induction/inhibition enzymatique

56. Des études sur les effets possibles de l'induction/inhibition enzymatique ou sur la biotransformation de la substance d'essai concernée peuvent être nécessaires dans l'un ou plusieurs des cas suivants:
- 1) lorsque des éléments indiquent une relation entre la biotransformation de la substance d'essai et l'augmentation de la toxicité;
 - 2) lorsque les données de toxicité disponibles indiquent une relation non linéaire entre la dose et le métabolisme;
 - 3) si les études sur l'identification des métabolites révèlent un métabolite potentiellement toxique qui pourrait être le produit d'une voie enzymatique induite par la substance d'essai;
 - 4) pour expliquer des effets a priori liés à des phénomènes d'induction enzymatique;

5) si l'on observe des modifications toxicologiques importantes dans le profil métabolique de la substance d'essai, dans le cadre d'expériences in vitro ou in vivo menées sur différentes espèces ou dans différentes conditions, il peut être nécessaire de caractériser l'enzyme ou les enzymes impliquées (par exemple, des enzymes de phase I comme les isoenzymes constituant le système des mono-oxygénases à cytochrome P 450, des enzymes de phase II comme les isoenzymes de la sulfotransférase ou de l'uridine diphosphate glucuronosyltransférase, ou tout autre enzyme pertinente). Ces informations peuvent servir à évaluer la pertinence des extrapolations interspèces.

57. Pour évaluer les variations toxicocinétiques liées à la substance d'essai, il convient de mettre en œuvre des protocoles d'étude adéquats, convenablement validés et justifiés. Ces études peuvent par exemple consister à administrer des doses répétées d'une substance d'essai non marquée, puis une dose unique radiomarquée le 14^e jour, ou des doses répétées d'une substance d'essai radiomarquée et des échantillonnages les 1^{er}, 7^e et 14^e jours pour déterminer le profil des métabolites. L'administration de doses répétées d'une substance d'essai radiomarquée peut également fournir des renseignements sur la bioaccumulation (voir paragraphe 26).

MÉTHODES COMPLÉMENTAIRES

58. Outre les expériences in vivo décrites dans la présente méthode d'essai, des méthodes complémentaires peuvent fournir des informations sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou l'élimination d'une substance d'essai chez certaines espèces.

Utilisation d'informations in vitro

59. Plusieurs aspects concernant le métabolisme de la substance d'essai peuvent être étudiés dans le cadre d'études in vitro faisant appel à des systèmes d'essai appropriés. Des hépatocytes fraîchement isolés ou en culture et des fractions subcellulaires (par exemple microsomes et cytosol ou fraction S9) du foie peuvent servir à étudier les métabolites possibles. Le métabolisme local dans l'organe cible, par exemple le poumon, peut être intéressant pour l'évaluation des risques. À cette fin, les fractions microsomales des tissus cibles peuvent être utiles. Les études sur microsomes peuvent permettre de traiter les différences potentielles entre les sexes et selon les stades de la vie, et de caractériser les paramètres enzymatiques (K_m et V_{max}) qui peuvent aider à évaluer la dose-dépendance du métabolisme en lien avec les niveaux d'exposition. En outre, les microsomes peuvent permettre d'identifier les enzymes microsomales impliquées dans le métabolisme de la substance d'essai qui peuvent servir pour l'extrapolation inter-espèces (voir aussi paragraphe 56). On peut également examiner le potentiel d'induction de la biotransformation à l'aide de fractions subcellulaires du foie (par exemple, microsomes et cytosol) d'animaux prétraités par la substance d'essai concernée, par le biais d'études in vitro d'induction sur les hépatocytes, ou à partir de lignées cellulaires spécifiques exprimant des enzymes pertinentes. Dans certaines circonstances et certaines conditions, on peut envisager d'utiliser des fractions subcellulaires provenant de tissus humains, afin de déterminer les éventuelles différences entre espèces en matière de biotransformation. Les résultats d'études in vitro peuvent également servir à l'élaboration de modèles toxicocinétiques à base physiologique (TCBP) (5).

60. Les études d'absorption cutanée in vitro peuvent fournir des renseignements supplémentaires pour caractériser l'absorption (6).

61. Des cultures primaires de cellules hépatiques et des coupes de tissus frais peuvent être utilisées pour répondre aux mêmes questions que les microsomes hépatiques. Dans certains cas, il est possible de répondre à certaines questions en utilisant des lignées cellulaires exprimant spécifiquement l'enzyme pertinente ou des lignées cellulaires génétiquement modifiées. Il peut aussi être utile d'étudier l'inhibition et l'induction d'isoenzymes particulières du cytochrome P450 (par exemple CYP1A1, 2E1, 1A2, etc.) et/ou d'enzymes de phase II par le composé parent dans le cadre d'essais in vitro. Les informations obtenues peuvent présenter de l'intérêt pour des composés de structure proche.

Utilisation des données toxicocinétiques provenant d'études de toxicité

62. L'analyse des échantillons de sang, de tissus et/ou d'excréta obtenus au cours d'autres études de toxicité peut fournir des données sur la biodisponibilité, l'évolution de la concentration plasmatique dans le temps (AUC, C_{max}), le potentiel de bioaccumulation, les taux d'élimination et les variations métaboliques et cinétiques liées au sexe ou au stade de vie.

63. Le plan d'étude peut aussi être adapté pour répondre à des questions concernant la saturation de l'absorption, les voies de biotransformation ou d'excrétion à des doses plus élevées, l'emprunt de nouvelles voies métaboliques à des doses plus élevées, ou la limitation des métabolites toxiques à des doses plus élevées.

64. D'autres aspects liés à l'évaluation des dangers peuvent aussi être abordés, notamment:

- la sensibilité en fonction de l'âge, qui dépend de l'état de la barrière hémato-encéphalique, des reins et/ou des capacités de détoxication,
- la sensibilité de certaines sous-populations due à des différences de capacité de biotransformation ou à d'autres différences toxicocinétiques,
- l'ampleur de l'exposition du fœtus par transfert transplacentaire des produits chimiques ou de celle du nouveau-né par le biais de la lactation.

Utilisation de modèles toxicocinétiques

65. Les modèles toxicocinétiques peuvent contribuer à différents aspects de l'évaluation des dangers et des risques, par exemple à la prévision de l'exposition systémique et de la dose délivrée aux tissus internes. En outre, pour aborder des questions particulières portant sur le mode d'action, ces modèles peuvent servir de base à l'extrapolation entre espèces, entre voies d'exposition, entre dosages, et à des fins d'évaluation des risques pour l'homme. Les données utiles à l'élaboration de modèles TCBP pour une substance d'essai sur une espèce quelconque sont 1) les coefficients de partage, 2) les constantes biochimiques et paramètres physiologiques, 3) les paramètres d'absorption des différentes voies d'exposition et 4) les données cinétiques in vivo pour l'évaluation des modèles [par exemple paramètres d'élimination pour les voies d'excrétion pertinentes ($> 10\%$), K_m et V_{max} pour le métabolisme]. Les données expérimentales utilisées pour élaborer le modèle sont obtenues par des méthodes scientifiquement valables, et les résultats du modèle sont validés. Les paramètres spécifiques à la substance d'essai ou à l'espèce, comme le taux d'absorption, le coefficient de partage sang-tissu et les constantes de vitesse métabolique, sont souvent déterminés pour faciliter l'élaboration de modèles non compartimentaux ou à base physiologique (7).

RÉSULTATS ET RAPPORT

66. Il est recommandé de faire figurer une table des matières dans le rapport d'essai.

Corps du rapport

67. Le corps du rapport présente les informations décrites par la présente méthode d'essai, organisées en sections et paragraphes de la manière suivante:

Résumé

68. Cette section du rapport d'étude résume la conception de l'étude et décrit les méthodes utilisées. Elle met également en relief les principaux résultats concernant le bilan massique, la nature et l'importance des métabolites, les résidus tissulaires, le taux d'élimination, le potentiel de bioaccumulation, les différences liées au sexe, etc. Ce résumé est suffisamment détaillé pour permettre une évaluation des résultats.

Introduction

69. Cette section du rapport présente les objectifs de l'étude, les raisons l'ayant motivée et les principes de sa conception, ainsi que les références utiles et un historique permettant de la resituer.

Matériels et méthodes

70. Cette section du rapport décrit en détail toutes les informations pertinentes, notamment:

a) Substance d'essai

Cette sous-section porte sur l'identification de la substance d'essai: nom chimique, structure moléculaire, détermination qualitative et quantitative de sa composition chimique, pureté chimique et, si possible, type et quantité des éventuelles impuretés. Elle comprend également des informations sur les propriétés physico-chimiques de la substance, notamment: état physique, couleur, coefficient de solubilité et/ou de partage brut, stabilité et, éventuellement, corrosivité. Le cas échéant, des informations sont également données sur les isomères. Si la substance d'essai est radiomarquée, cette sous-section renseigne sur le type de radionucléide, la position du marqueur, l'activité spécifique et la pureté radiochimique.

Il convient d'indiquer le type de véhicule, diluant, agent de suspension, émulsifiant ou autre matériau utilisé pour administrer la substance d'essai, ou d'en donner une description.

b) Animaux d'expérience

Cette sous-section renseigne sur les animaux d'expérience, notamment: choix de l'espèce et de la souche et justification de ce choix, âge au début de l'étude, sexe, poids corporel, état de santé et conditions d'élevage.

c) Méthodes

Cette sous-section décrit en détail la conception de l'étude et la méthode utilisée. Elle comprend les éléments suivants:

- 1) justification des éventuelles modifications apportées à la voie ou aux conditions d'exposition, s'il y a lieu;

- 2) justification du choix des niveaux de dose;
 - 3) description des éventuelles études pilotes utilisées pour la conception expérimentale des études de suivi. Les données à l'appui des études pilotes sont jointes;
 - 4) mode de préparation de la solution administrée et, le cas échéant, type de solvant ou de véhicule;
 - 5) nombre de groupes de traitement et nombre d'animaux par groupe;
 - 6) niveaux et volume des doses (et, si la radioactivité est utilisée, activité spécifique de la dose);
 - 7) voie(s) et méthodes d'administration;
 - 8) fréquence d'administration;
 - 9) période de jeûne (le cas échéant);
 - 10) radioactivité totale par animal;
 - 11) manipulation des animaux;
 - 12) collecte et traitement des échantillons;
 - 13) méthodes d'analyse utilisées pour la séparation, la quantification et l'identification des métabolites;
 - 14) limites de détection des méthodes employées;
 - 15) autres mesures et protocoles expérimentaux utilisés (notamment validation des méthodes d'analyse des métabolites).
- d) Analyse statistique

Si on recourt à l'analyse statistique pour dépouiller les résultats de l'étude, il convient d'apporter suffisamment d'informations sur la méthode d'analyse et le logiciel employés pour qu'un examinateur/statisticien indépendant puisse réévaluer et reconstruire l'analyse.

Si on recourt à une modélisation systémique (par exemple à un modèle TCBP), la présentation du modèle employé comporte une description complète du modèle, afin qu'un expert indépendant puisse reconstruire et valider celui-ci (voir le paragraphe 65 et l'appendice des définitions).

Résultats

71. Toutes les données sont récapitulées et présentées sous forme de tableaux accompagnés d'une évaluation statistique appropriée, comme décrit dans la présente section. Les données résultant du comptage de la radioactivité sont récapitulées et présentées de manière appropriée à l'étude, généralement en microgrammes ou milligrammes d'équivalents par masse d'échantillon, mais d'autres unités peuvent être utilisées. Cette section comporte des graphiques illustrant les résultats, reproduit les données chromatographiques et spectrométriques représentatives, identifie/quantifie les métabolites et présente les voies métaboliques proposées, y compris la structure moléculaire des métabolites. En outre, les renseignements suivants figurent, le cas échéant, dans cette section:
- 1) quantité et pourcentage de récupération de la radioactivité dans l'urine, les fèces, l'air expiré, ainsi que dans l'urine et les fèces récupérées lors du nettoyage de la cage.
 - Pour les études par voie cutanée, inclure également les données relatives à la récupération de la substance d'essai sur la peau traitée et lors du nettoyage cutané, les données sur la radioactivité résiduelle présente dans le dispositif couvrant la peau et l'unité d'étude du métabolisme, ainsi que les résultats de l'étude de nettoyage cutané; pour plus de précisions, voir les paragraphes 74 à 77.
 - Pour les études par inhalation, inclure également des données sur la récupération de la substance d'essai dans les poumons et dans les tissus nasaux (8); pour plus de précisions, voir le paragraphe 78;

- 2) distribution tissulaire, en pourcentage de la dose administrée et en concentration (microgrammes d'équivalents par gramme de tissu) et ratios tissu/sang et tissu/plasma;
- 3) bilan-matière élaboré pour chaque étude impliquant l'analyse des tissus et des excréta;
- 4) concentrations plasmatiques et paramètres toxicocinétiques (biodisponibilité, AUC, C_{max} , T_{max} , élimination, demi-vie) après administration de la substance par la ou les voies d'exposition pertinentes;
- 5) vitesse et importance de l'absorption de la substance d'essai après administration par la ou les voies d'exposition pertinentes;
- 6) quantités de substance d'essai et de métabolites (en pourcentage de la dose administrée) collectées dans les excréta;
- 7) référence aux données présentées en annexe, qui comprennent les données par animal pour tous les critères de mesure (par exemple administration de la dose, pourcentage de récupération, concentrations, paramètres toxicocinétiques, etc.);
- 8) graphique représentant les voies métaboliques proposées et la structure moléculaire des métabolites.

Discussion et conclusions

72. Dans cette section, il convient pour le ou les auteurs de:

- 1) proposer une voie métabolique, en s'appuyant sur les résultats concernant le métabolisme et l'élimination de la substance d'essai;
- 2) examiner les éventuelles différences potentielles liées à l'espèce ou au sexe concernant l'élimination et/ou la biotransformation de la substance d'essai;
- 3) présenter dans un tableau et examiner l'identité et l'importance des métabolites, les taux d'élimination, le potentiel de bioaccumulation et le niveau des résidus tissulaires de la substance mère et/ou de ses métabolites, ainsi que les éventuelles modifications dose-dépendantes des paramètres toxicocinétiques, s'il y a lieu;
- 4) intégrer à cette section toute donnée toxicocinétique pertinente obtenue au cours d'études de toxicité;
- 5) formuler une conclusion succincte pouvant être étayée par les résultats de l'étude;
- 6) ajouter des sections supplémentaires (si nécessaire ou opportun).

73. Les sections supplémentaires serviront à présenter des informations bibliographiques, tableaux, graphiques, annexes, etc.

AUTRES VOIES D'EXPOSITION

Voie cutanée

Traitement cutané

74. Cette section fournit des renseignements spécifiques sur les études de toxicocinétique par voie cutanée. Pour l'absorption cutanée, il convient de consulter le chapitre B.44 [Absorption cutanée: méthode in vivo (9)] de la présente annexe. Pour d'autres effets observés, tels que la distribution et le métabolisme, la présente méthode d'essai B.36 peut être utilisée. Pour le traitement par voie cutanée, on peut utiliser un ou plusieurs niveaux de dose. La substance d'essai (c'est-à-dire la préparation pure, diluée ou le mélange contenant la substance d'essai à appliquer sur la peau) est identique (ou représente un substitut réaliste) aux produits auxquels pourraient être exposés l'homme ou les autres espèces cibles potentielles. Le choix du ou des niveaux de dose s'effectue conformément aux indications des paragraphes 20 à 26 de la présente méthode d'essai. Parmi les facteurs à prendre en considération figurent l'exposition humaine potentielle et/ou les doses auxquelles une toxicité a été observée au cours d'autres études de toxicité cutanée. Si nécessaire, il convient de dissoudre la ou les doses cutanées dans un véhicule adéquat et de les appliquer dans un volume adapté à leur administration. Peu de temps avant l'essai, la fourrure de la région dorsale du tronc des animaux à tester est tondue. Le rasage peut être employé mais il est effectué environ 24 heures avant l'essai. Lorsque la fourrure est rasée ou tondue, cette opération s'effectue en évitant toute lésion de la peau qui pourrait entraîner une modification de sa perméabilité.

Environ 10 % de la superficie corporelle sont dégagés pour application de la substance d'essai. Dans le cas de substances d'essai hautement toxiques, la zone couverte peut être plus petite, mais il convient de recouvrir une surface aussi large que possible d'une pellicule mince et uniforme. La surface de traitement utilisée est la même pour tous les groupes d'essai par voie cutanée. Les zones traitées sont recouvertes à l'aide d'une protection adaptée maintenue en place. Les animaux sont encagés séparément.

75. Une étude de nettoyage cutané est menée afin d'évaluer la quantité de la dose appliquée susceptible d'être retirée de la peau lors d'un lavage de la zone traitée au savon doux et à l'eau. Cette étude peut également aider à établir le bilan massique quand la substance d'essai est administrée par voie cutanée. Pour ce type d'étude, il convient d'appliquer une dose unique de la substance d'essai à deux animaux. Le niveau de dose est choisi conformément aux indications du paragraphe 23 de la présente méthode d'essai (voir également le paragraphe 76 à propos du temps de contact avec la peau). La quantité de substance d'essai récupérée lors de ce lavage permet d'évaluer l'efficacité d'élimination de la substance d'essai par la procédure de nettoyage.
76. Sauf si sa corrosivité l'empêche, la substance d'essai est appliquée et maintenue sur la peau pendant un minimum de 6 heures. Une fois la protection retirée, la zone traitée est lavée selon la procédure décrite pour l'étude de nettoyage cutané (voir paragraphe 75). La protection et la solution ayant servi au nettoyage sont analysées à la recherche de résidus de la substance d'essai. À la fin de l'étude, les animaux sont euthanasiés conformément à (2), et la peau traitée est prélevée. Une section appropriée de la peau traitée est analysée pour déterminer la présence résiduelle de la substance d'essai (radioactivité).
77. Pour l'évaluation toxicocinétique des produits pharmaceutiques, des procédures différentes peuvent être nécessaires, en accord avec les dispositions réglementaires.

Inhalation

78. Pour ce type d'étude, on utilise une concentration unique de la substance d'essai, ou davantage si nécessaire. Le choix de la ou des concentrations s'effectue conformément aux indications des paragraphes 20 à 26 de la présente méthode d'essai. Les traitements par inhalation seront menés à l'aide d'un appareillage de type "cône nasal" ou "tête seule" pour empêcher l'absorption par d'autres voies d'exposition (8). Si d'autres méthodes d'exposition par inhalation sont retenues, il convient de justifier et de documenter ce choix. La durée d'exposition par inhalation est définie; elle est généralement comprise entre 4 et 6 heures.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) OCDE (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OCDE, Paris.
- (2) OCDE (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000), OCDE, Paris.
- (3) Solon E.G., Kraus L. (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.
- (4) Stumpf W.E. (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.
- (5) Loizou G., Spendiff M., Barton H.A., Bessems J., Bois F.Y., d'Yvoire M.B., Buist H., Clewell H.J. 3rd, Meek B., Gundert-Remy U., Goerlitz G., Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.
- (6) Chapitre B.45 de la présente annexe, Absorption cutanée: méthode in vitro.
- (7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Genève, Organisation mondiale de la santé, Programme international sur la sécurité des substances chimiques.
- (8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Série sur les essais et évaluations n° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

-
- (9) Chapitre B.44 de la présente annexe, Absorption cutanée: méthode in vivo.
- (10) Barton H.A. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.
- (11) Gibaldi M. and Perrier D., (1982), *Pharmacokinetics*, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.
-

Appendice

DÉFINITIONS

Absorption orale: pourcentage de la dose de substance d'essai absorbé à partir du site d'administration (à savoir le tractus gastro-intestinal). Ce paramètre essentiel peut permettre de comprendre quelle proportion de la substance d'essai administrée atteint la veine porte, et par la suite le foie.

Absorption: processus par le(s)quel(s) une substance chimique pénètre dans, ou traverse, des tissus. L'absorption se réfère au composé parent et à tous ses métabolites. À ne pas confondre avec la "biodisponibilité".

Accumulation (bioaccumulation): augmentation dans le temps de la quantité d'une substance d'essai présente dans les tissus (généralement les tissus adipeux, à la suite d'une exposition répétée); si une substance d'essai pénètre dans le corps à une vitesse supérieure à son taux d'élimination, cette substance s'accumule dans l'organisme et peut atteindre des concentrations toxiques.

ADME: acronyme de "Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion".

AUC (aire sous la courbe des concentrations plasmatiques): aire sous la courbe dans un diagramme représentant l'évolution dans le temps de la concentration d'une substance d'essai dans le plasma. Cette aire correspond à la quantité totale de substance d'essai absorbée par le corps pendant une période de temps prédéfinie. Dans des conditions de linéarité, l'AUC (du temps zéro à l'infini) est proportionnelle à la quantité totale de substance d'essai absorbée par le corps, indépendamment du taux d'absorption.

Autoradiographie microscopique des récepteurs (microautoradiographie des récepteurs): cette technique peut servir à étudier l'interaction xénobiotique avec des sites tissulaires ou des populations cellulaires spécifiques, par exemple dans le cadre d'études sur la fixation au récepteur ou le mode d'action spécifique qui peuvent nécessiter une qualité de résolution et de sensibilité impossible à obtenir par d'autres techniques comme l'autoradiographie du corps entier.

Autoradiographie (autoradiographie du corps entier): cette technique, qui sert à déterminer qualitativement et/ou quantitativement la localisation tissulaire d'une substance d'essai radioactive, utilise l'imagerie par rayons X ou, innovation plus récente, l'imagerie numérique par plaque au phosphore pour visualiser les molécules ou fragments de molécules radio-marquées en enregistrant le rayonnement émis au sein de l'objet étudié. Par rapport à la dissection des organes, l'autoradiographie quantitative du corps entier peut présenter des avantages pour évaluer la distribution de la substance d'essai, la récupération globale et la résolution du matériau radioactif dans les tissus. Par exemple, on peut utiliser cette technique sur un modèle animal pigmenté, afin d'évaluer l'association possible de la substance d'essai avec la mélanine, qui peut se lier à certaines molécules. Cependant, tout en offrant un moyen commode de visualiser l'ensemble des sites de fixation de grande capacité et de faible affinité dans le corps entier, cette technique est probablement moins performante pour identifier des sites cibles spécifiques tels que les sites de liaison au récepteur, dont la détection nécessite une résolution et une sensibilité relativement élevées. Lorsqu'on recourt à l'autoradiographie, les expériences visant à déterminer le bilan massique du composé administré sont menées sur un groupe séparé ou dans le cadre d'une étude distincte de l'étude de distribution tissulaire, dans laquelle tous les excréta (qui peuvent inclure également l'air expiré) et toutes les carcasses sont homogénéisés et analysés par comptage à scintillation liquide.

Bilan massique: comptabilité des entrées de la substance d'essai dans le système, et de ses sorties de celui-ci.

Bilan matière: voir "bilan massique".

Bioaccumulation: voir "Accumulation".

Biodisponibilité: fraction d'une dose administrée qui atteint la circulation systémique ou est rendue disponible sur le site de l'activité physiologique. Généralement, la biodisponibilité d'une substance d'essai se réfère au composé parent, mais elle peut également se référer à ses métabolites. Elle ne tient compte que d'une seule forme chimique. *Nota bene* biodisponibilité et absorption ne sont pas synonymes. La différence, par exemple, entre l'absorption orale (c'est-à-dire la présence dans la paroi intestinale et la veine porte) et la biodisponibilité (c'est-à-dire la présence dans le sang systémique et dans les tissus) peut, entre autres facteurs, provenir de la dégradation chimique liée au métabolisme de la paroi intestinale, à l'efflux vers la lumière intestinale ou encore au métabolisme présystémique dans le foie (10). La biodisponibilité du composant toxique (composé parent ou métabolite) est un paramètre essentiel, dans l'évaluation des risques pour la santé humaine (extrapolation de dose élevée à faible, extrapolation de voie à voie), pour dériver une valeur interne de la dose sans effet nocif observé (DSENO) ou de la dose de référence (BMD) externes (dose appliquée). Pour étudier les effets sur le foie en cas d'administration orale, l'absorption orale suffit. Néanmoins, pour évaluer tout autre effet que l'effet à la porte d'entrée, la biodisponibilité est généralement un paramètre plus fiable pour l'évaluation des risques.

Biopersistance: voir "Persistance".

Biotransformation: conversion chimique (généralement enzymatique), dans l'organisme, d'une substance d'essai donnée en une autre. Synonyme de "métabolisme".

C_{max}: concentration maximale (pic de concentration) dans le sang (plasma/sérum) après l'administration, ou excrétion maximale (pic d'excrétion) urinaire ou fécale après l'administration.

Coefficient de partage: également appelé coefficient de distribution, il mesure la solubilité différentielle d'une substance chimique dans deux solvants.

Compartiment: portion (ou unité) structurelle ou biochimique d'un corps, d'un tissu ou d'une cellule séparée du reste de ce corps, de ce tissu ou de cette cellule.

Concentration sanguine (plasmatique) à l'état stationnaire: état hors équilibre d'un système ouvert dans lequel toutes les forces agissant sur le système sont exactement contrebalancées par des forces opposées, de sorte que tous les composants du système ont une concentration stationnaire, bien que de la matière s'écoule au travers de ce système.

Concentration sanguine (plasmatique/sérique) maximale: concentration maximale (pic de concentration) dans le sang (plasma/sérum) après l'administration (voir aussi " $C_{\max}$ ").

Demi-vie ($t_{1/2}$): temps nécessaire pour que la concentration de la substance d'essai diminue de moitié dans un compartiment. Elle se réfère généralement à la concentration plasmatique ou à la quantité de substance d'essai présente dans l'ensemble du corps.

Distribution: dispersion d'une substance d'essai et de ses dérivés au travers d'un organisme.

Distribution tissulaire: déplacement réversible d'une substance d'essai d'un endroit du corps à un autre. La distribution tissulaire peut s'étudier par dissection, homogénéisation, combustion et comptage par scintillation liquide des organes ou par autoradiographie qualitative et/ou quantitative du corps entier. La première méthode est utile pour obtenir la concentration et le pourcentage de récupération dans les tissus et la carcasse des mêmes animaux, mais peut avoir une résolution trop faible pour tous les tissus et atteindre une récupération globale inférieure à l'optimum (< 90 %). Voir la définition de l'autoradiographie.

Enzymes/Isoenzymes: protéines qui catalysent des réactions chimiques. Les isoenzymes sont des enzymes qui catalysent des réactions chimiques similaires mais diffèrent par leur séquence d'acides aminés.

Excrétion biliaire: excrétion par les voies biliaires.

Excrétion: processus par le(s)quel(s) une substance d'essai administrée et/ou ses métabolites sont éliminés du corps.

Exogène: d'origine extérieure à l'organisme ou au système, ou produit à l'extérieur de lui.

Extrapolation: inférence d'une ou de plusieurs valeurs inconnues à partir de ce qui est connu ou a été observé.

Induction/induction enzymatique: synthèse d'enzymes en réponse à un stimulus environnemental ou à une molécule inductrice.

Linéarité/cinétique linéaire: en cinétique, un processus est linéaire quand tous les taux de transfert entre compartiments sont proportionnels aux quantités ou aux concentrations présentes, c'est-à-dire de premier ordre. En conséquence, les volumes d'élimination et de distribution sont constants, de même que les demi-vies. Les concentrations obtenues sont proportionnelles au taux d'administration (exposition), et l'accumulation est plus aisément prévisible. On peut juger de la linéarité/non-linéarité en comparant les paramètres pertinents, par exemple l'AUC, après administration de différentes doses ou après exposition unique et exposition répétée. L'absence de dose-dépendance peut indiquer la saturation des enzymes participant au métabolisme du composé; une augmentation de l'AUC après exposition répétée par rapport à une exposition unique peut indiquer une inhibition du métabolisme, et une diminution de l'AUC peut signaler une induction du métabolisme [voir aussi (11)].

Mécanisme (mode) de toxicité/d'action: le mécanisme d'action se réfère aux interactions biochimiques spécifiques par lesquelles une substance d'essai produit son effet. Le mode d'action se rapporte aux phénomènes plus généraux conduisant à la toxicité d'une substance d'essai.

Métabolisme: synonyme de "biotransformation".

Métabolites: produits du métabolisme ou des processus métaboliques.

Modélisation systémique (modèle toxicocinétique à base physiologique, à base pharmacocinétique, pharmacocinétique à base physiologique, à base biologique, etc.): modèle abstrait utilisant le langage mathématique pour décrire le comportement d'un système.

Paramètres enzymatiques: K_m , constante de Michaelis et $V_{\max}$, vitesse maximale.

Persistance (biopersistance): présence à long terme d'une substance chimique (dans un système biologique) s'expliquant par sa résistance à la dégradation/l'élimination.

Prévision à partir de données croisées: les informations sur les effets mesurés pour une ou plusieurs substances chimiques sont utilisées pour prédire l'effet observé pour la substance chimique cible.

Saturation: état dans lequel un ou plusieurs processus cinétiques (par exemple, absorption, métabolisme ou élimination) sont à leur maximum (c'est-à-dire "saturés").

Sensibilité: capacité d'une méthode ou d'un instrument de mesure à distinguer entre des réponses correspondant à différents niveaux d'une variable d'intérêt.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Tissu cible: tissu sur lequel se manifeste un effet indésirable majeur d'une substance toxique.

T_{max}: temps nécessaire pour atteindre C_{max}.

Toxicocinétique (pharmacocinétique): étude de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion des substances chimiques au cours du temps.

Validation des modèles: processus destiné à évaluer si un modèle décrit convenablement les données toxicocinétiques disponibles. Les modèles peuvent être évalués par comparaison statistique ou visuelle de leurs prévisions avec les valeurs expérimentales, en fonction d'une variable indépendante commune (par exemple le temps). L'ampleur de l'évaluation est justifiée en fonction de l'usage escompté du modèle.

Vitesse d'élimination: mesure quantitative de la vitesse à laquelle une substance d'essai est éliminée du sang, du plasma ou d'un tissu donné, par unité de temps.

Voie d'administration (orale, intraveineuse, cutanée, par inhalation, etc.): se rapporte aux moyens par lesquels une substance chimique est administrée dans le corps (par exemple, par gavage oral, oralement mélangée à la nourriture, par voie cutanée, par inhalation, en intraveineuse, etc.).

Voies de détoxication: série d'étapes conduisant à l'élimination des substances chimiques toxiques du corps, que ce soit par transformation métabolique ou par excrétion.»

8) le chapitre B.52 suivant est ajouté:

«B.52. TOXICITÉ AIGUË PAR INHALATION – MÉTHODE PAR CLASSE DE TOXICITÉ AIGUË

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 436 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Une première ligne directrice pour les essais de toxicité aiguë par inhalation (403) avait été adoptée en 1981 et a été révisée depuis [voir chapitre B.2 de la présente annexe (1)]. À la suite de l'adoption, en 2001, de la méthode par classe de toxicité aiguë par voie orale [chapitre B.1 *ter* de la présente annexe (5)], il est apparu approprié de développer une méthode par classe de toxicité aiguë par inhalation (2) (3) (4). Une évaluation rétrospective des performances de la méthode d'essai par classe de toxicité aiguë pour la toxicité aiguë par inhalation a montré que cette méthode était utilisable à des fins de classification et d'étiquetage (6). La méthode d'essai pour les essais de toxicité par inhalation faisant appel à la méthode par classe de toxicité aiguë permettra l'utilisation d'étapes successives de concentrations cibles fixées pour déterminer la classe de toxicité de la substance d'essai. Bien que la létalité soit le principal effet mesuré, les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance ou de détresse sévère sont euthanasiés afin de minimiser leur souffrance. Des précisions concernant les effets mesurés éthiquement acceptables sont disponibles dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE (7).
2. On trouvera dans le document d'orientation n° 39 sur les essais de toxicité aiguë par inhalation des indications pour la conduite et l'interprétation de la présente méthode d'essai (8).
3. Les définitions utilisées dans la présente méthode d'essai figurent à l'appendice 1 et dans le document d'orientation n° 39 (8).
4. Cette méthode d'essai fournit des informations qui permettent à la fois l'évaluation des dangers et le classement de la substance d'essai conformément au règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification pour les substances présentant une toxicité aiguë (9). Si des estimations ponctuelles des valeurs de la CL₅₀ ou des analyses de la courbe concentration- réponse sont nécessaires, il convient de se reporter au chapitre B.2 de la présente annexe (1). Pour plus d'informations sur le choix des méthodes d'essai, il convient de se reporter au document d'orientation n° 39 (8). La présente méthode d'essai n'est pas spécifiquement destinée à tester des articles spéciaux comme les substances isométriques ou fibreuses faiblement solubles ou les nanomatériaux manufacturés.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

5. Avant d'entreprendre un essai conformément à la présente méthode d'essai, le laboratoire d'essai devra prendre en compte toutes les informations disponibles sur la substance d'essai, y compris les études existantes dont les résultats éviteraient des essais supplémentaires, afin de recourir le moins possible aux animaux. Parmi les informations utiles pour la détermination de l'espèce, de la souche, du sexe, du mode d'exposition et des concentrations d'essai appropriés, citons: l'identité, la structure chimique et les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai; les résultats de tous les essais de toxicité in vitro ou in vivo auxquels elle a été soumise; son (ses) utilisation(s) escomptée(s) et les risques d'exposition humaine; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur les substances structurellement apparentées. Les concentrations susceptibles d'engendrer une souffrance ou une détresse sévères, du fait de propriétés corrosives ⁽¹⁾ ou fortement irritantes, ne sont pas testées à l'aide de cette méthode d'essai, voir document d'orientation 39 (8).

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Le principe de cet essai est d'obtenir, avec un processus séquentiel, des informations suffisantes sur la toxicité aiguë par inhalation de la substance d'essai, pour parvenir à son classement avec une exposition de 4 heures. Des objectifs réglementaires spécifiques peuvent nécessiter de recourir à d'autres durées d'exposition. Les essais pour chacun des niveaux de concentration définis porteront sur 3 animaux de chaque sexe. En fonction de la mortalité et/ou de l'état moribond des animaux, 2 étapes peuvent suffire pour permettre de juger de la toxicité aiguë de la substance d'essai. S'il est prouvé que l'un des sexes est plus sensible à la substance d'essai, l'essai peut se poursuivre avec seulement les animaux de ce sexe. Le résultat de l'étape précédente détermine l'étape suivante, c'est-à-dire:
- a) l'arrêt de l'essai;
 - b) un essai sur trois animaux par sexe; ou
 - c) un essai sur 6 animaux, tous du sexe le plus sensible à la substance d'essai, la limite inférieure de la classe de toxicité devant être déterminée à partir d'essais portant sur 6 animaux par groupe de concentration d'essai, indépendamment du sexe.
7. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés, et sont pris en compte dans l'interprétation des résultats de l'essai au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation de l'OCDE n° 19 sur les effets mesurés éthiquement acceptables détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente (7).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Choix des espèces animales**

8. Le choix s'orientera vers de jeunes rongeurs en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, il faudra justifier l'emploi d'autres espèces.

Préparation des animaux

9. Les femelles sont nullipares et non gravides. Le jour de leur exposition, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 8 à 12 semaines. Leur poids corporel ne devra pas excéder, pour chaque sexe, $\pm 20\%$ du poids moyen des animaux du même âge précédemment exposés. Sélectionnés au hasard, les animaux sont marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimation aux conditions de laboratoire, ils seront conservés dans leur cage pour une période d'au minimum 5 jours avant le début de l'essai. Les animaux sont également acclimatés aux appareils d'essai, pendant une courte période précédant l'essai, afin d'atténuer le stress causé par leur introduction dans un nouvel environnement.

Conditions d'élevage des animaux

10. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est de $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %, encore qu'il ne soit pas toujours possible de le faire si l'eau est utilisée comme véhicule. Avant et après exposition, les animaux sont généralement mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal, et ne doit engendrer qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés "nez seul", il peut être nécessaire de les acclimater aux tubes de contention. Ceux-ci ne doivent pas provoquer chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les contraintes qu'ils subissent peuvent en effet modifier les paramètres physiologiques mesurés de l'animal, comme sa température corporelle (hyperthermie) et/ou son volume respiratoire par minute. Si l'on dispose de données génériques montrant que de telles modifications ne se produisent pas de façon appréciable,

⁽¹⁾ L'évaluation de la corrosivité peut reposer sur un avis d'expert basé sur les éléments suivants: données expérimentales sur l'homme et l'animal, données (in vitro) existantes [voir, par exemple, le chapitre B.40 (11) de la présente annexe ou la ligne directrice 435 de l'OCDE (12), valeurs du pH, informations concernant des substances analogues ou toute autre donnée pertinente].

alors la période d'adaptation préalable aux tubes de contention n'est pas nécessaire. Les animaux exposés "corps entier" à un aérosol sont enfermés individuellement pendant l'exposition pour empêcher la filtration de l'aérosol par la fourrure de leurs congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

Chambres d'inhalation

11. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature de la substance d'essai et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition "nez seul" (qui inclut les dispositifs "tête seule", "nez seul" et "museau seul") est privilégié. Le mode d'exposition "nez seul" est généralement choisi pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition "corps entier" peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais elle est justifiée dans le rapport de l'étude. Pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre d'exposition "corps entier", on veillera à ce que le "volume" total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation 39 (8) décrit les principes des techniques d'exposition "corps entier" ou "nez seul", ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques

CONDITIONS D'EXPOSITION

Administration des concentrations

12. Il est recommandé une durée fixe d'exposition de quatre heures, sans compter le temps d'équilibration. D'autres durées d'exposition sont possibles pour répondre à des besoins spécifiques, cependant une justification devra être apportée dans le rapport d'étude, voir document d'orientation 39 (8). Les animaux exposés "corps entier" demeurent seuls dans la chambre afin d'éviter l'ingestion de la substance d'essai par le toilettage de leurs compagnons. Les animaux sont privés de nourriture pendant la période d'exposition. Dans une exposition "corps entier", les animaux peuvent boire de l'eau.
13. Les animaux sont exposés à la substance d'essai présentée sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou sous une forme mixte. L'état physique à tester dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, de la concentration choisie, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'elle se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les substances d'essai chimiquement réactives ou hygroscopiques sont testées sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion.

Répartition granulométrique

14. Une mesure de la taille des particules est réalisée pour tous les aérosols et les vapeurs susceptibles de se condenser pour former des aérosols. Pour que toutes les régions pertinentes de l'appareil respiratoire soient exposées, il est recommandé d'utiliser des aérosols dont le diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) se situe entre 1 et 4 μm , avec un écart type géométrique (σ_g) compris entre 1,5 et 3,0 (8) (13) (14). Un effort raisonnable est fourni pour remplir ces conditions, mais si tel n'est pas le cas, un jugement d'expert est nécessaire. Par exemple, les particules des fumées métalliques peuvent avoir une taille inférieure à cette norme, tandis que les particules chargées, les fibres et les substances hygroscopiques (dont la taille augmente dans l'environnement humide du tractus respiratoire) peuvent avoir une taille supérieure.

Préparation de la substance d'essai dans un véhicule

15. Pour atteindre la concentration et la taille granulométrique appropriées de la substance d'essai, il est possible d'avoir recours à un véhicule; en règle générale l'eau est choisie de préférence. Les substances particulières peuvent être soumises à des procédés mécaniques afin d'atteindre la répartition granulométrique requise, mais un soin particulier devra être pris de ne pas décomposer ou altérer la substance d'essai. Lorsque les procédés mécaniques sont suspectés d'avoir altéré la composition de la substance d'essai (température extrême due aux frictions d'un broyage excessif, par exemple), la composition de la substance d'essai devra être vérifiée analytiquement. On prendra soin de ne pas contaminer la substance d'essai. Il n'est pas nécessaire de tester les substances granulaires non friables qui sont élaborées précisément pour ne pas être inhalables. Un test d'usure de surface est réalisé pour démontrer que la manipulation de la substance granulaire ne produit pas de particules respirables. Dans le cas contraire, un essai de toxicité par inhalation est réalisé.

Animaux témoins

16. Un groupe témoin négatif (air) n'est pas nécessaire. Lorsqu'un véhicule autre que l'eau est utilisé pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin du véhicule est utilisé seulement quand on ne dispose pas de données historiques sur la toxicité. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude de la substance d'essai préparée dans un véhicule, celui-ci est considéré comme non toxique à la concentration testée; il n'y a donc pas lieu d'utiliser de témoin du véhicule.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION

Débit d'air dans la chambre d'exposition

17. Le débit d'air dans la chambre est contrôlé avec soin, suivi en continu et enregistré au moins toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi de la concentration de l'atmosphère d'essai (ou stabilité temporelle) constitue une mesure complète de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les

paramètres dynamiques pertinents de la production de l'atmosphère d'essai. On prendra particulièrement soin d'éviter toute re-respiration dans les chambres d'exposition "nez seul" lorsque le débit d'air à travers le système d'exposition ne permet pas de produire une circulation dynamique de l'atmosphère contenant la substance d'essai. Des méthodologies sont prévues pour démontrer l'absence de re-respiration dans les conditions expérimentales choisies (8) (15). La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasse pas 1 %. Si ces conditions ne peuvent être respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone sont mesurées.

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

18. La température de la chambre d'exposition est maintenue à 22 ± 3 °C. Dans les cas d'exposition "nez seul" et "corps entier" l'humidité relative dans la zone où respire l'animal est suivie et enregistrée trois fois au minimum pour les durées allant jusqu'à 4 heures, et toutes les heures pour les durées plus courtes. Le taux d'humidité relative est idéalement compris entre 30 et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse être atteint (par exemple, dans le cas d'un mélange à base d'eau), ou qu'il ne puisse être mesuré en raison d'interférences de la substance d'essai avec la méthode d'essai.

Substance d'essai: concentration nominale

19. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale est la masse de la substance d'essai divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle donne une indication de la capacité de production du système d'essai, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes de production.

Substance d'essai: concentration réelle

20. La concentration réelle est la concentration de la substance d'essai dans la zone de la chambre d'inhalation où les animaux respirent. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (par exemple, échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols ne contenant qu'un seul composant en poudre ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et des caractérisations spécifiques à la substance d'essai sont également effectuées par une pré-étude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol contenant plusieurs composants en poudre, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut s'avérer nécessaire de soumettre la substance d'essai (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour des agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que toutes les phases ont été recueillies selon la méthode choisie. Les concentrations cibles, nominales et réelles sont fournies dans le rapport d'étude, mais seules les concentrations réelles sont utilisées dans les analyses statistiques pour calculer la valeur des concentrations létales.
21. Il est recommandé de n'employer si possible qu'un seul lot de la substance d'essai, et l'échantillon de la substance est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il convient de réaliser une caractérisation de la substance d'essai afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes: temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification de la substance d'essai, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).
22. L'atmosphère d'exposition est maintenue aussi constante que possible, et suivie soit en continu, soit par intermittence en fonction de la méthode d'analyse. Lorsque l'injection s'effectue de façon intermittente, les échantillons d'atmosphère de la chambre sont prélevés au moins deux fois sur une étude de quatre heures. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, le recueil d'un échantillon pour toute la période d'exposition est acceptable. Si des fluctuations nettes apparaissent d'un échantillon à un autre, la prochaine concentration d'essai devra utiliser quatre échantillons par exposition. Les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne n'excèdent pas ± 10 % pour les gaz et vapeurs et ± 20 % pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de production de la substance d'essai, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition t_{95} . Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation 39 (8).
23. Pour des mélanges très complexes constitués de gaz ou vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion ou substances d'essai propulsées à partir de produits/dispositifs spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisira donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général le principe actif du mélange. Quand la substance d'essai est un mélange, la concentration analytique devra être indiquée pour le mélange global et pas uniquement pour le principe actif ou le composant (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation 39 (8).

Substance d'essai: répartition granulométrique

24. La répartition granulométrique des aérosols est déterminée au minimum deux fois pour chaque exposition de 4 heures, à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un spectromètre de mesure de la taille des particules aérodynamiques. Si les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade ou un autre instrument se révèlent équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude. Pour confirmer la capacité de recueil des particules de l'outil principal, un second instrument devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique se rapproche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre, voir document d'orientation 39 (8). Si cette équivalence est établie au début de la phase d'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de réduire au minimum les données douteuses qui nécessiteraient de répéter une exposition. Une répartition granulométrique est effectuée dans le cas des vapeurs, s'il est possible qu'une condensation de la vapeur conduise à la formation d'un aérosol, ou si des particules sont détectées dans une atmosphère de vapeur susceptible de présenter des phases mixtes (voir paragraphe 14).

MODE OPÉRATOIRE**Essai principal**

25. Pour chaque étape, trois animaux de chaque sexe, ou six animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, seront utilisés. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées "nez seul", il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Le niveau de concentration à utiliser comme dose initiale est choisi parmi les quatre niveaux fixés; le niveau de concentration initiale est celui le plus susceptible de présenter une toxicité pour certains des animaux traités. Les schémas d'essai pour les gaz, les vapeurs et les aérosols (présentés dans les appendices 2 à 4) correspondent aux essais effectués aux valeurs limites des catégories 1 à 4 du règlement relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage (9), pour les gaz (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 h) (appendice 2), pour les vapeurs (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 h) (appendice 3) et pour les aérosols (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4 h) (appendice 4). La catégorie 5, que ne prévoit pas le règlement (CE) n° 1272/2008 (9), se rapporte à des concentrations dépassant les concentrations limites respectives. Chacune des concentrations de départ possède son propre schéma d'essai. En fonction du nombre d'animaux morts ou euthanasiés, le mode opératoire d'essai suit les flèches indiquées jusqu'à ce qu'une catégorisation puisse être établie.
26. L'intervalle de temps entre l'exposition des différents groupes est déterminé par le moment d'apparition, la durée et la gravité des signes de toxicité observés. L'exposition des animaux au niveau de concentration supérieur est retardée jusqu'à ce que l'on soit raisonnablement sûr que les animaux précédemment soumis au traitement ont survécu. Il est recommandé d'espacer de trois à quatre jours les expositions à chaque niveau de concentration afin de permettre l'observation d'une toxicité retardée. L'intervalle de temps peut être ajusté, par exemple en cas de réponses peu concluantes.

Essai limite

27. L'essai limite est utilisé si l'on sait ou si l'on prévoit que la substance d'essai sera virtuellement non toxique, c'est-à-dire qu'elle ne suscitera une réponse de toxicité qu'au-delà de la concentration limite réglementaire. Des informations sur la toxicité de la substance d'essai peuvent être tirées d'essais déjà pratiqués sur des substances ou mélanges analogues, en tenant compte de l'identité et du pourcentage des composants dont la toxicité est avérée. Si l'on manque d'informations sur la toxicité de la substance d'essai, ou si l'on s'attend à ce qu'elle soit toxique, l'essai principal est réalisé; le document d'orientation 39 fournit de plus amples informations à ce sujet (8).
28. Selon le mode opératoire normal, trois animaux par sexe, ou six animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont exposés à des concentrations de 20 000 ppm pour les gaz, 20 mg/l pour les vapeurs et 5 mg/l pour les poussières/brouillards. Si elles sont atteintes, ces concentrations servent de limite d'essai pour la présente méthode d'essai. Pour les essais d'aérosols, le principal objectif est d'atteindre une taille de particule qui soit respirable (c'est-à-dire un DAMM de 1 à 4 µm), ce qui est possible avec la plupart des substances d'essai à des concentrations de 2 mg/l. Les essais sur des aérosols à des concentrations supérieures à 2 mg/l ne sont tentés que si l'on peut obtenir des particules de taille respirable, voir document d'orientation 39 (8). Selon le SGH (16), il est déconseillé de réaliser des essais au-delà des concentrations limites, pour des raisons de bien-être des animaux. Les essais en catégorie 5 du SGH (16), non prévue par le règlement (CE) n° 1272/2008 (9), ne sont envisagés que s'il est très probable que leurs résultats présenteront un intérêt direct pour la protection de la santé humaine, et une justification est alors fournie dans le rapport d'essai. En cas de substance potentiellement explosive, on prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de provoquer une explosion. Afin d'éviter le recours inutile à des animaux, un essai sans animaux est effectué avant l'essai limite pour s'assurer qu'il est possible d'atteindre dans la chambre les conditions expérimentales d'un essai limite.

OBSERVATIONS

29. Un examen clinique des animaux est pratiqué régulièrement pendant la période d'exposition. Après l'exposition, des examens cliniques sont réalisés au minimum deux fois le jour de l'exposition, ou plus fréquemment suivant la réponse des animaux au traitement, et au minimum une fois par jour par la suite pendant une période de 14 jours. La durée de la période d'observation n'est pas fixée, mais est déterminée par la nature et le moment d'apparition des signes cliniques, ainsi que par la durée de la période de récupération. Les moments d'apparition et de disparition des signes de toxicité sont importants, en particulier lorsque les signes de toxicité ont tendance à être retardés. Toutes les observations sont systématiquement enregistrées individuellement pour chaque animal. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante

sont euthanasiés pour des raisons de bien-être animal. Lors de l'examen clinique des signes de toxicité, il convient de veiller à ne pas confondre une piètre apparence initiale et des troubles respiratoires passagers, imputables à la procédure d'exposition, avec les effets liés au traitement. Les principes et critères résumés dans le document d'orientation sur les effets mesurés éthiquement acceptables sont pris en considération (7). Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont euthanasiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.

30. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, mais aussi sur les changements affectant l'appareil respiratoire, le système circulatoire, les systèmes nerveux autonome et central, ainsi que l'activité somatomotrice et le comportement. Toute différenciation entre les effets locaux et systémiques est consignée autant que possible. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et le coma doivent retenir l'attention. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement.

Poids corporel

31. Le poids corporel de chacun des animaux est enregistré une fois lors de la période d'acclimatation, le jour de l'exposition (jour 0) juste avant celle-ci, et au moins les jours 1, 3 et 7 (puis de façon hebdomadaire par la suite) ainsi qu'au moment de la mort ou de l'euthanasie, s'il est postérieur au jour 1. Le poids corporel est un indicateur critique reconnu de la toxicité, on surveillera donc attentivement les animaux, dont le poids reste constamment inférieur de 20 % ou plus à celui précédant l'étude. Les animaux survivants sont pesés et euthanasiés à la fin de la période postexposition.

Pathologie

32. Tous les animaux d'expérience, y compris ceux morts au cours de l'essai ou euthanasiés et écartés de l'étude pour des raisons de bien-être animal, subissent une autopsie macroscopique. Lorsqu'un animal est découvert mort et que son autopsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour minimiser l'autolyse. Les autopsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal en prêtant particulièrement attention aux voies respiratoires.
33. D'autres observations, ajoutées a priori à dessein, peuvent être envisagées afin d'élargir l'interprétation de l'étude, comme la mesure du poids pulmonaire des rats survivants et/ou la mise en évidence d'une irritation par examen de l'appareil respiratoire au microscope. Les organes examinés peuvent être ceux pour lesquels une réaction au traitement est connue ou attendue et ceux montrant une pathologie macroscopique chez les animaux survivant au moins 24 heures. Un examen microscopique de l'intégralité de l'appareil respiratoire peut fournir des informations utiles pour les substances d'essai réactives à l'eau, comme les acides et les substances hygroscopiques.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

34. Pour chacun des animaux, le poids corporel et les conclusions de l'autopsie sont fournis. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux et indiquer pour chaque groupe d'essai: le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de l'autopsie.

Rapport d'essai

35. Le rapport d'essai contient, s'il y a lieu, les renseignements suivants:

Animaux d'expérience et conditions d'élevage:

- description des conditions d'encagement, y compris: nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire,
- espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- méthode de randomisation,
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau),
- description d'un éventuel conditionnement préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine ou traitement de maladie.

Substance d'essai:

- nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (y compris isomérisation),
- données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule:

- justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (s'il ne s'agit pas de l'eau),
- données historiques ou concordantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation:

- description de la chambre d'inhalation avec ses dimensions et son volume,
- source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la production de l'atmosphère,
- équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle,
- source d'air, traitement de l'air fourni/évacué et système de climatisation utilisé,
- méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai,
- différence de pression (positive ou négative),
- orifices d'exposition par chambre ("nez seul") ou emplacement des animaux dans le système ("corps entier"),
- homogénéité/stabilité temporelle de l'atmosphère d'essai,
- situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition,
- débits d'air, débit d'air/orifice d'exposition ("nez seul") ou rapport du volume de l'animal à la chambre ("corps entier"),
- informations sur l'équipement utilisé, le cas échéant, pour mesurer l'oxygène et le dioxyde de carbone,
- temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}),
- nombre de changements de volume par heure,
- doseurs (s'il y en a).

Données concernant l'exposition:

- justification du choix de la concentration cible dans l'étude principale,
- concentrations nominales (masse totale de substance d'essai produite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre),
- concentrations réelles de la substance d'essai obtenues dans la zone où respirent les animaux; pour les mélanges à tester produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément,
- toutes les concentrations atmosphériques sont rapportées en unités de masse (mg/l, mg/m³, etc.); les unités de volume (ppm, ppb) peuvent aussi être indiquées entre parenthèses,
- répartition granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian de masse (DAMM) et écart type géométrique (σ_g), ainsi que leur méthode de calcul. Les autres analyses de la taille de particules sont consignées.

Conditions expérimentales

- détails sur la préparation de la substance d'essai, y compris sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des substances solides ou pour préparer les solutions de la substance d'essai. Lorsque des procédés mécaniques sont susceptibles d'avoir altéré la composition de la substance d'essai, inclure les résultats des analyses effectuées pour vérifier la composition de la substance d'essai,
- description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci,
- détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération de la substance d'essai à partir du milieu d'échantillonnage),
- justification du choix des concentrations d'essai.

Résultats:

- tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans la chambre d'inhalation,
- tableau de données sur les concentrations nominales et réelles dans la chambre d'inhalation,
- tableau de données sur la taille des particules, notamment données analytiques sur le prélèvement d'échantillons, la répartition granulométrique et les calculs du DAMM et de σ_g ,
- tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux montrant des signes de toxicité, y compris de mortalité, et nature, sévérité et durée des effets),
- poids corporel de chacun des animaux enregistrés lors de l'essai, date et heure de leur mort si celle-ci intervient avant l'euthanasie prévue; moment d'apparition et évolution des signes de toxicité et, le cas échéant, leur réversibilité,
- pour chaque animal, résultats de l'autopsie et observations histopathologiques disponibles,
- classement dans les catégories du règlement (CE) n° 1272/2008 et valeur limite de la CL₅₀.

Discussion et interprétation des résultats:

- un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente méthode d'essai, par exemple en ce qui concerne la concentration limite ou la taille des particules,
- la respirabilité des particules est abordée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules n'ont pu être remplis,
- la cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre la concentration réelle et la concentration nominale, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude,
- la cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés,
- une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (7).

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Chapitre B.2 de la présente annexe, Toxicité aiguë (inhalation).
- (2) Holzhütter H.-G., Genschow E., Diener W., and Schleder E. (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.
- (3) Diener W., Kayser D. and Schleder E. (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

- (4) Diener W. and Schlede E. (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC₅₀ Tests. *ALTEX* 1: 129-134.
 - (5) Chapitre B.1 *ter* de la présente annexe, Toxicité orale aiguë — méthode de la classe de toxicité aiguë.
 - (6) OCDE (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 105, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
 - (7) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 19, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
 - (8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 39, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
 - (9) Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006 (JO L 353 du 31.12.2008, p. 1).
 - (10) Chapitre B.40 de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: essai de résistance électrique transcutanée (RET).
 - (11) Chapitre B.40 *bis* de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: essai sur modèle de peau humaine.
 - (12) OCDE (2005). Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n° 435, OCDE, Paris. Disponible sur l'internet (<http://www.oecd.org/env/testguidelines>).
 - (13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.
 - (14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.
 - (15) Pauluhn J. and Thiel A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27: 160-167
 - (16) Nations unies (2007), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), ST/SG/AC.10/30, Nations unies, New York et Genève. Disponible sur l'internet (http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html).
-

Appendice 1

DÉFINITION

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

*Appendice 2***Procédure à suivre pour chacune des concentrations initiales dans le cas des gaz (ppm/4 h)**Remarques générales ⁽¹⁾

Pour chaque concentration initiale, les schémas d'essai figurant dans le présent appendice indiquent la procédure à suivre.

Appendice 2 bis: concentration initiale de 100 ppm.

Appendice 2 ter: concentration initiale de 500 ppm.

Appendice 2 quater: concentration initiale de 2 500 ppm.

Appendice 2 quinquies: concentration initiale de 20 000 ppm.

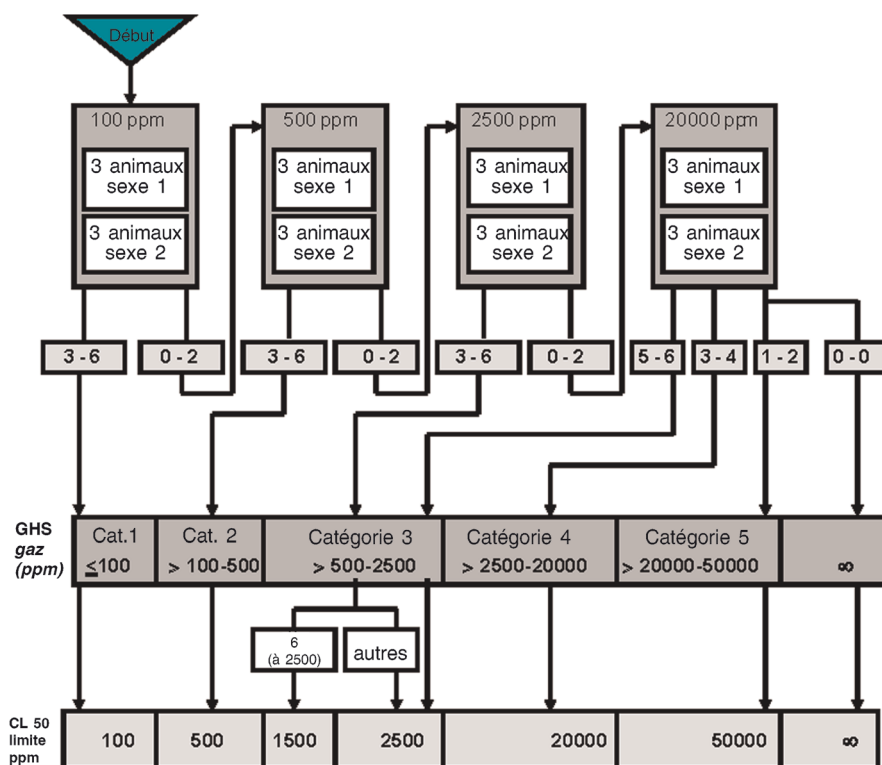
Selon le nombre d'animaux morts ou euthanasiés, la procédure d'essai se poursuit en suivant les flèches indiquées.

⁽¹⁾ Les tableaux ci-après renvoient au système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). L'équivalent de ce système au sein de l'Union européenne est le règlement (CE) n° 1272/2008. Dans le cas de la toxicité aiguë par inhalation, le règlement (CE) n° 1272/2008 (9) ne prévoit pas la catégorie 5.

Appendice 2 bis

Toxicité aiguë par inhalation:

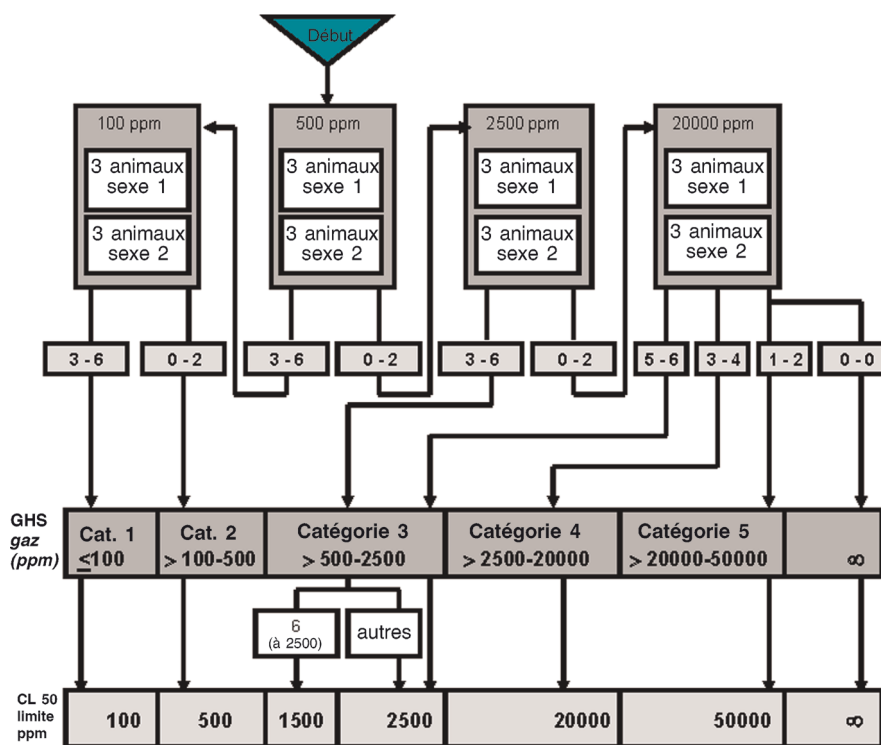
Procédure d'essai avec une concentration initiale de 100 ppm/4 h pour les gaz



- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/ concentration testée
- GHS: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à ≥ 20 000 ppm/4h: voir document d'orientation 39 (8)

Appendice 2 ter

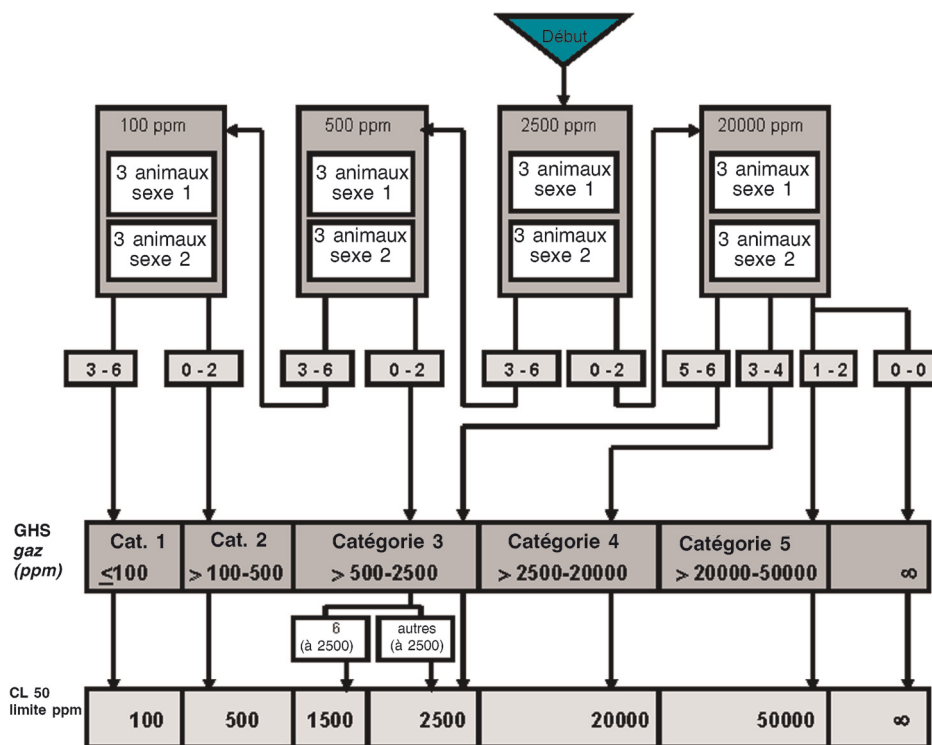
Toxicité aiguë par inhalation:
procédure d'essai avec une concentration initiale de 500 ppm/4h pour les gaz



- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/ concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à ≥ 20 000 ppm/4h: voir document d'orientation 39 (8)

Appendice 2 quater

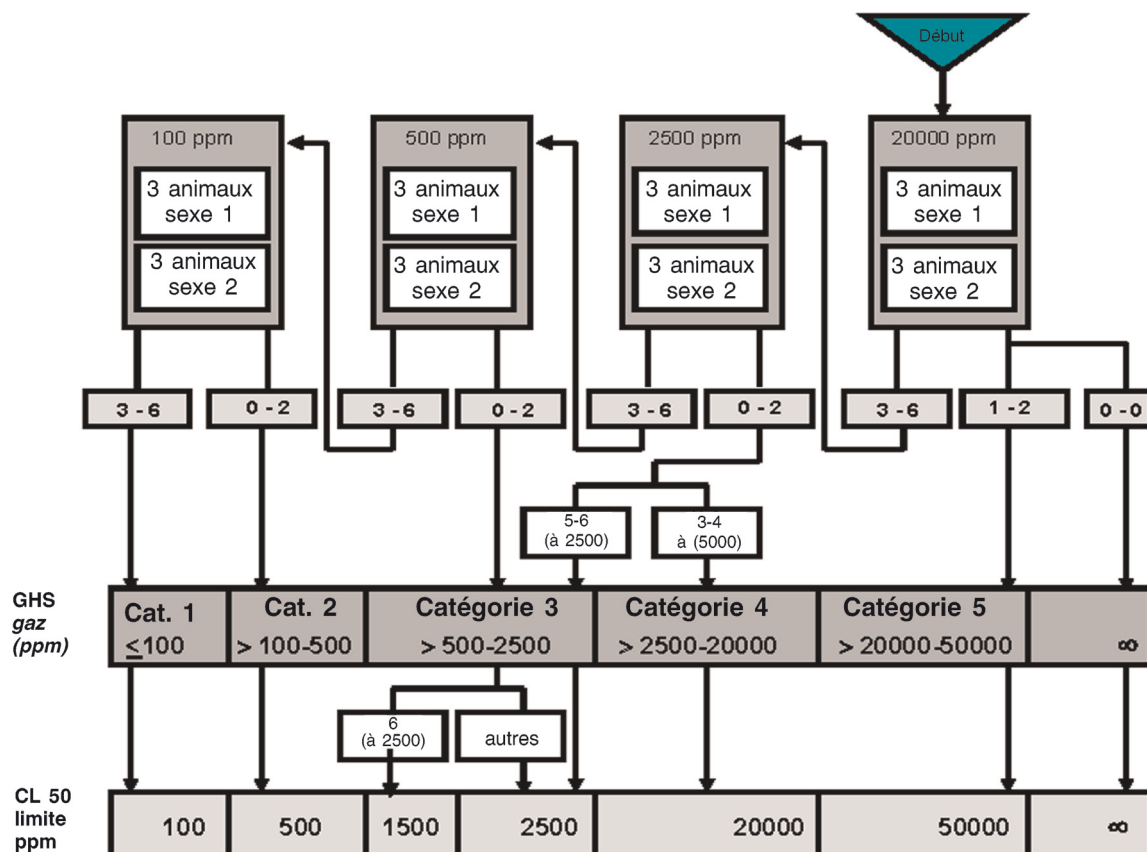
Toxicité aiguë par inhalation:
procédure d'essai avec une concentration initiale de 2 500 ppm/4h pour les gaz



- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à ≥ 20 000 ppm/4h: voir document d'orientation 39 (8)

Appendice 2 quinquies

Toxicité aiguë par inhalation:
procédure d'essai avec une concentration initiale de 20 000 ppm/4h pour les gaz



- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à ≥ 20 000 ppm/4h: voir document d'orientation 39 (8)

*Appendice 3***Procédure à suivre pour chacune des concentrations initiales dans le cas des vapeurs (mg/l/4 h)**Remarques générales ⁽¹⁾

Pour chaque concentration initiale, les schémas d'essai figurant dans le présent appendice indiquent la procédure à suivre.

Appendice 3 *bis*: concentration initiale de 0,5 mg/l.

Appendice 3 *ter*: concentration initiale de 2,0 mg/l.

Appendice 3 *quater*: concentration initiale de 10 mg/l.

Appendice 3 *quinquies*: concentration initiale de 20 mg/l.

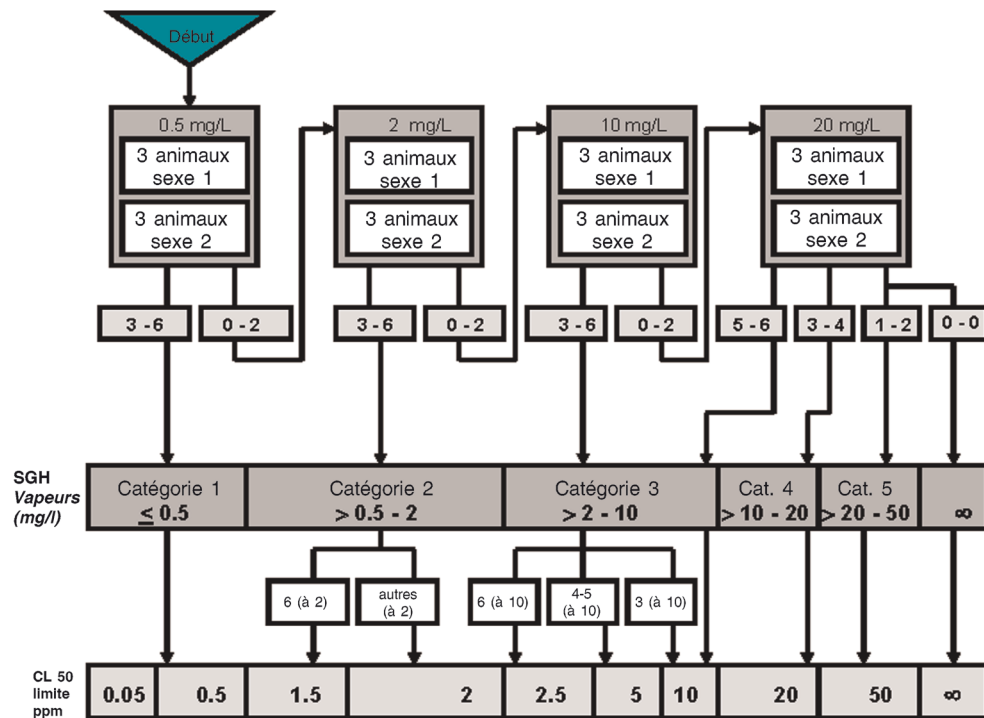
Selon le nombre d'animaux morts ou euthanasiés, la procédure d'essai se poursuit en suivant les flèches indiquées.

⁽¹⁾ Les tableaux ci-après renvoient au système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). L'équivalent de ce système au sein de l'Union européenne est le règlement (CE) n° 1272/2008. Dans le cas de la toxicité aiguë par inhalation, le règlement (CE) n° 1272/2008 (9) ne prévoit pas la catégorie 5.

Appendice 3 bis

Toxicité aiguë par inhalation:

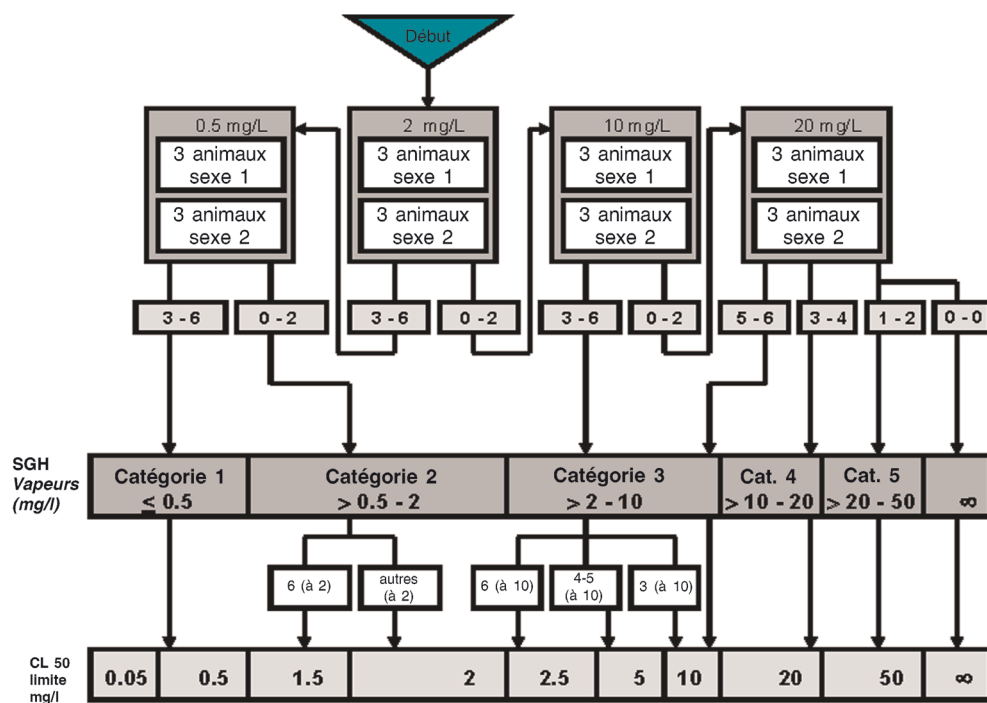
procédure d'essai avec une concentration initiale de 0,5 mg/l/4h pour les vapeurs



- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à 50 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

Appendice 3 ter

Toxicité aiguë par inhalation:
procédure d'essai avec une concentration initiale de 2 mg/l/4h pour les vapeurs

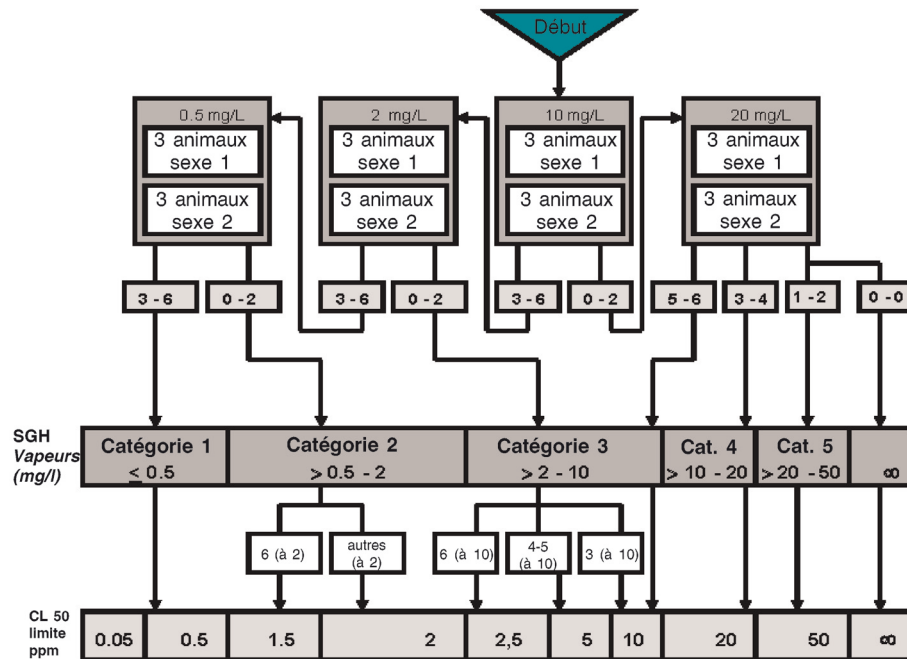


- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à 50 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

Appendice 3 quater

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 10 mg/l/4h pour les vapeurs

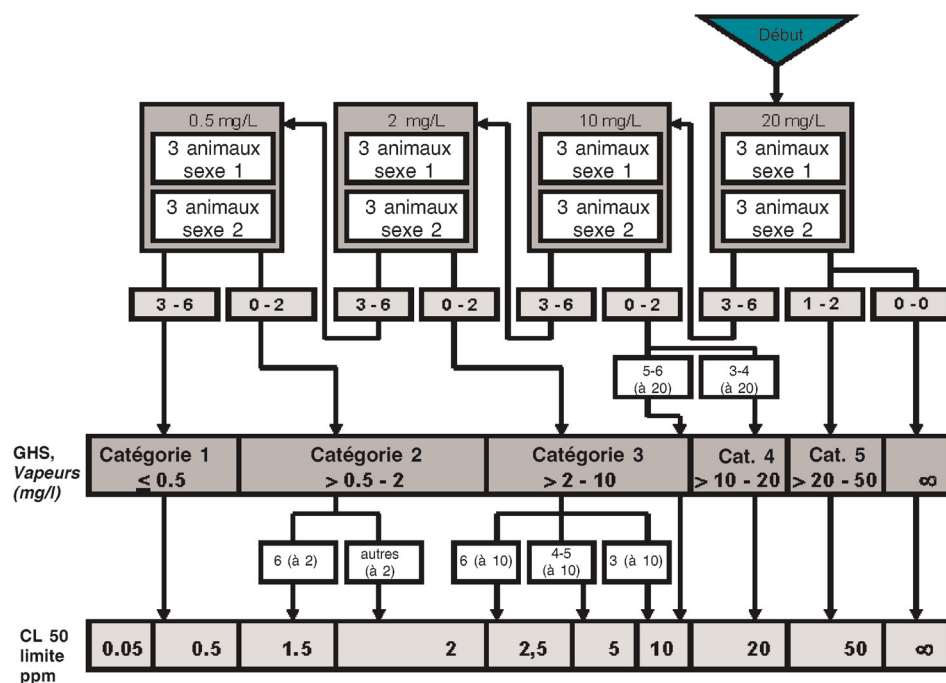


- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à 50 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

Appendice 3 quinquies

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 20 mg/l/4h pour les vapeurs



- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à 50 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

*Appendice 4***Procédure à suivre pour chacune des concentrations initiales dans le cas des aérosols (mg/l/4 h)**Remarques générales ⁽¹⁾

Pour chaque concentration initiale, les schémas d'essai figurant dans le présent appendice indiquent la procédure à suivre.

Appendice 4 *bis*: concentration initiale de 0,05 mg/l.

Appendice 4 *ter*: concentration initiale de 0,5 mg/l.

Appendice 4 *quater*: concentration initiale de 1 mg/l.

Appendice 4 *quinquies*: concentration initiale de 5 mg/l.

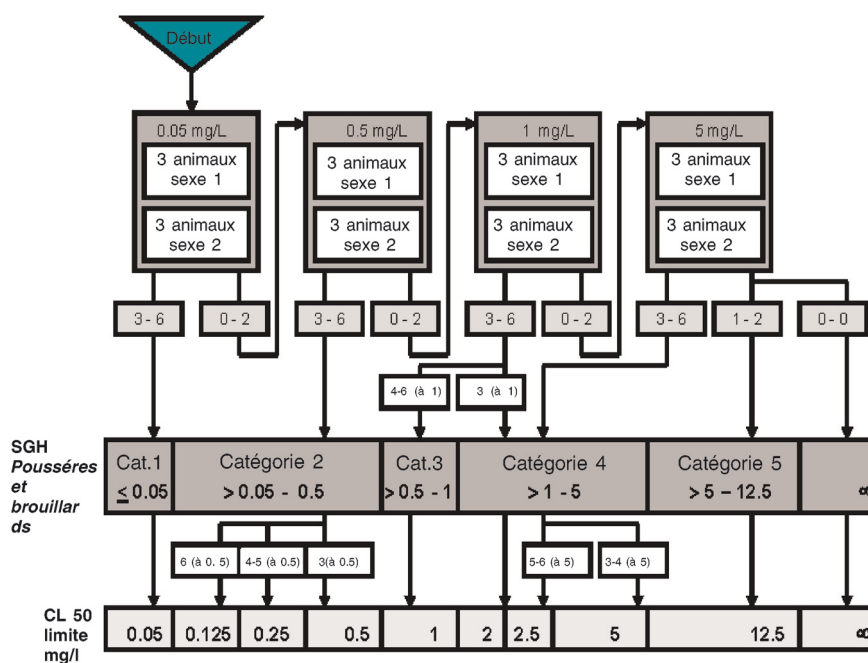
Selon le nombre d'animaux morts ou euthanasiés, la procédure d'essai se poursuit en suivant les flèches indiquées.

⁽¹⁾ Les tableaux ci-après renvoient au système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). L'équivalent de ce système au sein de l'Union européenne est le règlement (CE) n° 1272/2008. Dans le cas de la toxicité aiguë par inhalation, le règlement (CE) n° 1272/2008 (9) ne prévoit pas la catégorie 5.

Appendice 4 bis

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 0.05 mg/l/4h pour les vapeurs

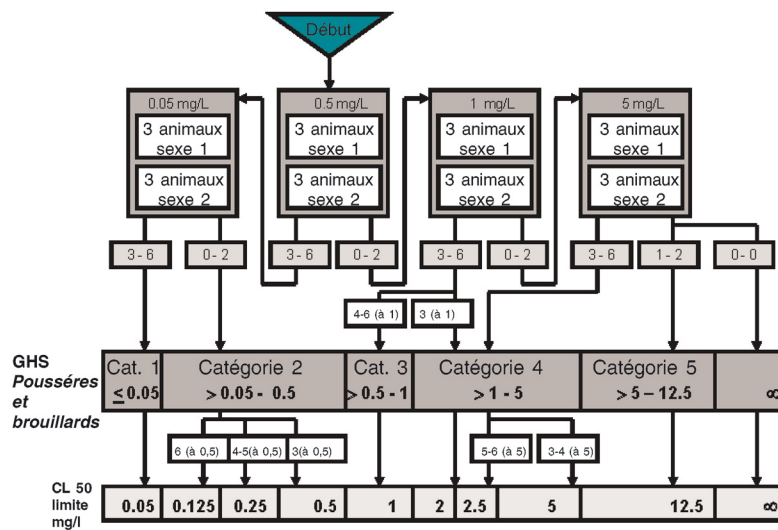


- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- SGH: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à 12,5 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

Appendice 4 ter

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 0,5 mg/l/4h pour les aérosols

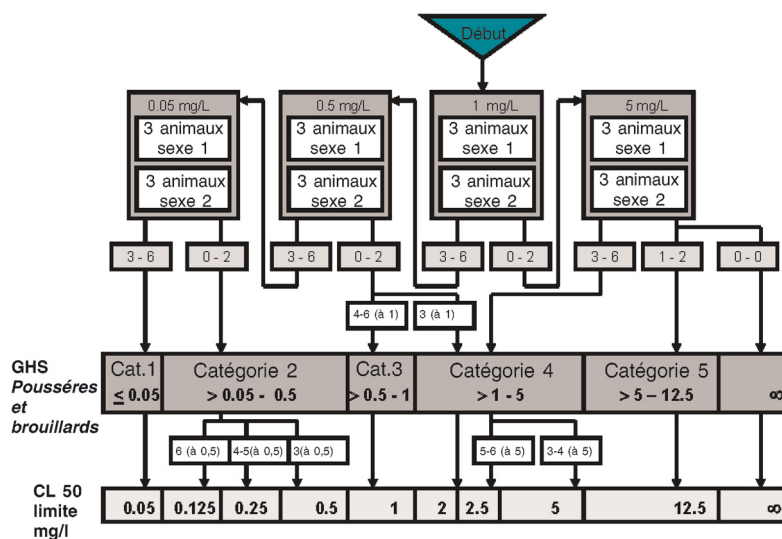


- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- GHS: Système général harmonisé de classification
- ∞: non classé
- Essai à 12,5 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

Appendice 4 quater

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 1 mg/l/4h pour les aérosols

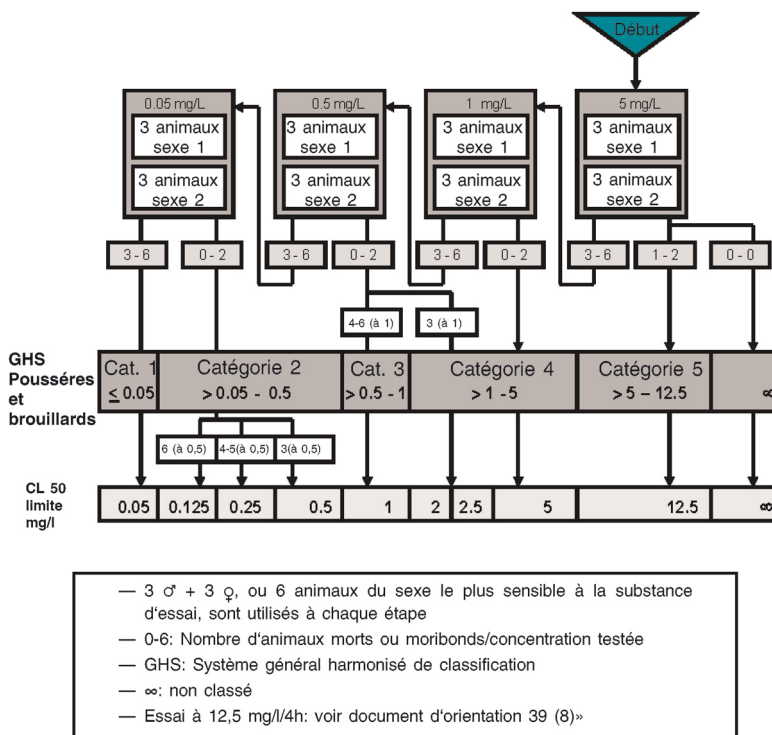


- 3 ♂ + 3 ♀, ou 6 animaux du sexe le plus sensible à la substance d'essai, sont utilisés à chaque étape
- 0-6: Nombre d'animaux morts ou moribonds/concentration testée
- GHS: Système général harmonisé de classification
- ∞ : non classé
- Essai à 12,5 mg/l/4h: voir document d'orientation 39 (8)

Appendice 4 quinquies

Toxicité aiguë par inhalation:

Procédure d'essai avec une concentration initiale de 5 mg/l/4h pour les aérosols



9) le chapitre C.10 est remplacé par le texte suivant:

«C.10. ESSAI DE SIMULATION – TRAITEMENT AÉROBIE DES EAUX USÉES: C.10-A: UNITÉS DE TRAITEMENT PAR BOUES ACTIVÉES – C.10-B: BIOFILMS

C.10-A: Unités de traitement par boues activées

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 303 (2001) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Dans les années 50, on s'est rendu compte que les nouveaux tensioactifs provoquaient un gonflement excessif de la mousse dans les stations de traitement des eaux usées et les cours d'eau. Ils n'étaient pas complètement éliminés par le traitement aérobie et limitaient dans certains cas l'élimination d'autres matières organiques. Ce constat a été à l'origine de nombreuses études sur les moyens d'éliminer les tensioactifs des eaux usées et sur les possibilités d'application des nouvelles substances chimiques produites par l'industrie au traitement des eaux usées. Des modèles d'unités représentant les deux principaux types de traitement biologique aérobie des eaux usées (boues activées et lits à ruissellement, ou lits bactériens) ont été utilisés à cette fin. Il aurait en effet été peu commode et très coûteux de répartir chaque nouvelle substance entre différentes stations de traitement à grande échelle et d'assurer un suivi des essais, même au niveau local.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

Unités de traitement par boues activées

2. Les descriptions de modèles d'unités à boues activées mentionnent des dimensions comprises entre 300 ml et environ 2 000 ml. Certaines unités, répliques assez fidèles de stations en vraie grandeur, comportaient des bassins de décantation où les boues séjournaient avant d'être renvoyées par pompage dans le bassin d'aération, tandis que d'autres n'étaient pas équipées pour cette opération, par exemple le modèle de Swisher (1). La dimension de l'appareil résulte d'un compromis: il doit être assez grand pour fonctionner correctement sur le plan mécanique et traiter un volume d'échantillons suffisant sans que son fonctionnement en soit altéré et, d'autre part, il ne doit pas occuper trop d'espace ni demander une quantité de matériel excessive.

3. Deux types d'appareils, appliqués au départ à l'étude des tensioactifs, ont été abondamment utilisés avec des résultats satisfaisants: les unités d'Husmann (2) et les unités à vase poreux (3) (4), qui sont décrites dans la présente méthode d'essai. D'autres unités ont également fait leurs preuves, par exemple celle d'Eckenfelder (5). Compte tenu du coût relativement élevé et des efforts exigés par la conduite de cet essai de simulation, des essais de sélection plus simples et moins onéreux, qui figurent à présent au chapitre C.4-A à F de la présente annexe (6), ont été étudiés en parallèle. L'expérience acquise avec de nombreux tensioactifs et d'autres produits chimiques a montré que ceux qui donnaient un résultat positif aux essais de sélection (facilement biodégradables) se dégradaient aussi au cours de l'essai de simulation. Certaines des substances rejetées par les essais de sélection étaient acceptées d'après les essais de biodégradabilité intrinsèque [chapitres C.12 (7) et C.19 (8) de la présente annexe] mais une partie seulement des substances formant ce dernier groupe se dégradait au cours de l'essai de simulation, tandis que les substances écartées par les essais de biodégradabilité intrinsèque n'étaient pas dégradées au cours des essais de simulation (9) (10) (11).
4. Les essais de simulation conduits sous une seule combinaison de conditions expérimentales suffisent à remplir certains objectifs; les résultats sont exprimés en pourcentage d'élimination de la substance d'essai ou du carbone organique dissous (COD). Ce type d'essai est décrit dans la présente méthode d'essai. Toutefois, contrairement à la précédente version du présent chapitre, qui n'abordait qu'un seul type d'appareil traitant des eaux usées synthétiques en mode couplé suivant une méthode relativement grossière d'épuisement des boues, le présent texte propose plusieurs variations. Il présente plusieurs options concernant les types d'appareil, les modes de fonctionnement, les eaux usées et l'évacuation des boues épuisées. Il s'aligne étroitement sur la norme ISO 11733 (12), qui a été examinée très attentivement durant sa préparation, bien que la méthode n'ait pas fait l'objet d'un essai circulaire.
5. Pour d'autres objectifs, il est nécessaire de connaître la concentration de la substance d'essai dans l'effluent avec plus de précision, ce qui demande une méthode plus élaborée. Le débit des boues épuisées, par exemple, doit subir un contrôle plus précis durant chaque journée d'essai et sur toute la période de l'essai, et il faut faire tourner les unités à plusieurs débits de boues épuisées. Pour que l'étude soit plus complète, les essais doivent aussi être menés à deux ou trois températures différentes: le mode opératoire est exposé par Birch (13) (14) et résumé à l'appendice 6. Toutefois, les connaissances actuelles ne permettent pas de décrire quels modèles cinétiques sont applicables à la biodégradation des produits chimiques lors du traitement des eaux usées et dans le milieu aquatique en général. La cinétique de Monod, donnée à titre d'exemple à l'appendice 6, est limitée aux substances dont la concentration atteint au moins 1 mg/l, mais de l'avis de certains, même sous cette condition, cela reste à démontrer. Des essais réalisés à des concentrations plus proches de celles trouvées dans les eaux usées sont présentés à l'appendice 7, mais ces essais et ceux de l'appendice 6 ne figurent qu'en appendices et ne font pas l'objet de méthodes d'essai.

Lits

6. Les modèles de lits percolateurs ont beaucoup moins retenu l'attention, sans doute parce qu'ils sont plus encombrants et moins compacts que les modèles de stations à boues activées. Gerike *et al.* ont mis au point des unités à lits percolateurs qu'ils ont fait fonctionner en mode couplé (15). Ces lits étaient relativement grands (hauteur 2 m; volume 60 l) et demandaient pas moins de 2 l/h d'eaux usées chacun. Baumann *et al.* (16) ont simulé des lits percolateurs en insérant dans des tubes de 1 m (14 mm de diamètre interne) des bandes de polyester "velues" préalablement plongées dans des boues activées concentrées pendant 30 minutes. La substance d'essai, qui constituait la seule source de carbone dans une solution de sels minéraux, était introduite par le haut du tube vertical et la biodégradation était évaluée d'après les mesures du COD dans l'effluent et du CO₂ dans les dégagements gazeux.
7. Les filtres biologiques ont été simulés d'une autre manière (15): on a alimenté les surfaces internes de tubes rotatifs légèrement inclinés par rapport à l'horizontale d'eaux usées (environ 250 ml/h) avec et sans la substance d'essai, puis recueilli les effluents pour analyse du COD et/ou de la substance d'essai étudiée.

PRINCIPE DE L'ESSAI

8. Cette méthode a été conçue pour déterminer l'élimination et la biodégradation primaire et/ou finale de substances organiques solubles dans l'eau par des micro-organismes aérobies dans un système d'essai à fonctionnement continu et simulant l'action des boues activées. Un milieu organique facilement biodégradable et la substance d'essai organique forment la source de carbone et d'énergie des micro-organismes.
9. Deux unités d'essai à fonctionnement continu (stations à boues activées ou vases poreux) tournent en parallèle dans des conditions identiques choisies en fonction de la finalité de l'essai. Normalement, le temps de rétention hydraulique moyen est de 6 h et l'âge moyen des boues (temps de rétention des boues) est de 6 à 10 jours. Les boues sont épuisées par application de l'une des deux méthodes et la substance d'essai est habituellement ajoutée à une concentration comprise entre 10 et 20 mg/l de carbone organique dissous (COD) aux eaux à traiter (milieu organique) d'une seule des unités. La deuxième unité sert de témoin pour déterminer la biodégradation dans le milieu organique.
10. Le COD, de préférence, ou la demande chimique en oxygène (DCO), ainsi que la concentration de la substance d'essai (si nécessaire), sont déterminés par une analyse spécifique conduite sur des échantillons d'effluents fréquemment prélevés de l'unité qui reçoit la substance d'essai. On suppose que la différence de concentration du COD ou de la DCO dans les effluents de l'unité d'essai et de l'unité témoin est due à la substance d'essai ou à ses métabolites organiques. On la compare ensuite à la concentration du COD ou de la DCO dans les eaux à traiter attribuable à la substance d'essai, afin de déterminer les quantités de substance d'essai éliminées.

11. On parvient normalement à distinguer la biodégradation de la bioadsorption en étudiant attentivement la courbe d'élimination en fonction du temps, et elle peut ordinairement être confirmée par un essai de biodégradabilité immédiate conduit à l'aide d'un inoculum acclimaté provenant de l'unité qui reçoit la substance d'essai.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

12. Il est nécessaire de connaître la pureté, la solubilité dans l'eau, la volatilité et les caractéristiques d'adsorption de la substance d'essai pour être en mesure d'interpréter les résultats correctement. Les substances volatiles et insolubles ne peuvent normalement être testées sans précautions particulières (voir appendice 5). Il faudrait connaître également la formule chimique développée ou, au moins, empirique, pour calculer les valeurs théoriques et/ou vérifier les valeurs mesurées de paramètres tels que la demande théorique en oxygène (DthO), le carbone organique dissous (COD) et la demande chimique en oxygène (DCO).
13. Des données sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes (voir appendice 4) peuvent aussi être utiles à la sélection des concentrations d'essai appropriées, et essentielles pour l'interprétation correcte de faibles valeurs de biodégradation.

NIVEAUX DE SEUIL

14. Dans l'application initiale de cet essai de simulation (de confirmation) à la biodégradation primaire des tensioactifs, la mise sur le marché du tensioactif était subordonnée à un taux d'élimination supérieur à 80 pour cent. À défaut d'atteindre un taux de 80 pour cent, on peut mener cet essai de simulation (de confirmation) à l'issue duquel le tensioactif ne sera mis sur le marché que s'il est éliminé à plus de 90 pour cent. En général, avec les produits chimiques, la question d'un résultat d'essai positif ou négatif n'entre pas en jeu, et le pourcentage d'élimination obtenu peut servir à calculer en gros la concentration probable dans l'environnement à introduire dans l'évaluation des risques dus aux substances chimiques. Les résultats ont tendance à être de type tout ou rien. Le pourcentage d'élimination du COD atteint dans plusieurs études sur des substances chimiques pures était supérieur à 90 pour cent pour plus des trois quarts des produits chimiques présentant un degré de biodégradabilité significatif et supérieur à 80 pour cent pour plus de 90 pour cent d'entre eux.
15. Relativement peu de substances chimiques, par exemple des tensioactifs, sont présentes dans les eaux usées aux concentrations (environ 10 mg C/l) appliquées dans cet essai. Certains produits chimiques peuvent être inhibiteurs à de telles concentrations, tandis que la cinétique d'élimination d'autres substances risque d'être différente aux faibles concentrations. Il est possible d'évaluer la dégradation avec plus de précision en recourant à des méthodes modifiées et en choisissant des concentrations de la substance d'essai réalistement faibles; les résultats obtenus pourraient servir à calculer les constantes cinétiques. Cependant, non seulement les techniques expérimentales ne sont pas encore entièrement validées, mais les modèles cinétiques, qui reproduisent les réactions de biodégradation, n'ont pas été établis (voir appendice 7).

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

16. Pour s'assurer que le mode opératoire est correctement suivi, il est quelquefois utile de tester des substances dont le comportement est connu, parallèlement aux substances d'essai étudiées. Il s'agit notamment de l'acide adipique, du 2-phénylphénol, du bnaphthol, de l'acide diphénique, de l'acide 1-naphthoïque, etc. (9) (10) (11).

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS DES ESSAIS

17. Il existe beaucoup moins de rapports d'essais de simulation que de rapports d'essais de biodégradabilité immédiate. La reproductibilité entre essais conduits simultanément est bonne (de 10 à 15 pour cent) pour des substances d'essai dégradées à 80 pour cent ou plus, mais la variabilité augmente pour les substances moins bien dégradées. Certaines substances limites ont donné des résultats très disparates (par exemple 10 pour cent, 90 pour cent) à différentes reprises au cours des neuf semaines de l'essai.
18. Les résultats obtenus à l'aide des deux types d'appareils ne différaient guère, mais certaines substances ont subi une dégradation plus poussée et plus constante avec les eaux usées domestiques qu'avec les eaux usées synthétiques reconstituées selon la formule de l'OCDE.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Appareils

Système d'essai

19. Le système d'essai d'une seule substance comprend une unité d'essai et une unité témoin, mais les analyses spécifiques (biodégradation primaire) ne demandent qu'une unité d'essai. Une unité témoin peut servir à plusieurs unités d'essai recevant des substances d'essai identiques ou différentes. En cas de couplage (appendice 3), chaque unité d'essai doit avoir sa propre unité témoin. Le système d'essai peut consister en un modèle de station à boues activées: unité d'Husmann (appendice 1, figure 1) ou vase poreux (appendice 1, figure 2). Dans les deux cas, il faut employer des récipients de stockage de capacité suffisante pour accueillir les eaux à traiter et les effluents ainsi que des pompes pour doser les eaux à traiter, mélangés ou non à la solution contenant la substance d'essai.

20. Chaque unité à boues activées se compose d'un récipient d'aération d'une capacité connue de quelque trois litres de boues activées et d'un décanteur secondaire qui contient environ un litre et demi; il est possible de modifier les volumes dans une certaine mesure en ajustant la hauteur du décanteur. L'utilisation de récipients de dimensions différentes est permise à condition de leur faire supporter des charges hydrauliques comparables. S'il n'y a pas moyen de maintenir la température de l'enceinte d'essai dans la gamme souhaitée, on recommande d'employer des récipients à chemise d'eau thermostatée. Les boues activées du décanteur sont ramenées dans le récipient d'aération, en continu ou à intervalles réguliers, à l'aide d'un émulseur à air ou d'une pompe doseuse, pour y être recyclée.
21. Le système du vase poreux consiste en un cylindre poreux à fond conique placé à l'intérieur d'un récipient légèrement plus grand de la même forme, mais fabriqué en matière plastique imperméable. Le matériau qui convient au cylindre poreux est du polyéthylène de 2 mm d'épaisseur dont les pores n'excèdent pas 90 µm. La séparation des boues et du milieu organique traité est opérée par un passage différentiel à travers la paroi poreuse. Les effluents se déversent dans l'espace annulaire d'où ils débordent dans le récipient collecteur. Aucune décantation n'a lieu, si bien qu'il n'y a pas de retour de boues. L'ensemble du système peut être monté dans un bain-marie thermostaté. Les vases poreux s'obstruent et risquent de déborder au début. Si cela se produit, il faut remplacer le revêtement poreux interne par un revêtement propre en commençant par siphonner les boues du vase dans un seau propre avant d'enlever le revêtement obstrué. Après avoir essuyé le cylindre imperméable extérieur, on place un revêtement propre et on remet la boue dans le vase. Si des boues adhèrent sur les côtés du revêtement obstrué, celles-ci doivent être soigneusement grattées et transférées. Le nettoyage des vases obstrués s'effectue d'abord à l'aide d'un mince jet d'eau pour enlever les boues restantes, ensuite par trempage dans une solution diluée d'hypochlorite de sodium, puis dans l'eau, et s'achève par un rinçage complet à l'eau.
22. Il convient d'appliquer des techniques appropriées à l'aération des boues dans les récipients d'aération des deux systèmes, par exemple des cubes frittés (pierres diffuseuses) et de l'air comprimé. Si nécessaire, l'air sera épuré par passage à travers un filtre convenable, et lavé. Une quantité d'air suffisante doit être insufflée dans le système pour maintenir l'aérobiose et conserver les boues à l'état de floc pendant toute la durée de l'essai.

Appareil de filtration ou centrifugeuse

23. Les échantillons seront filtrés à travers une membrane possédant une porosité adéquate (diamètre d'ouverture nominal de 0,45 µm) qui adsorbe les substances organiques solubles et libère le moins possible de carbone organique. Si les lits utilisés libèrent du carbone organique, il faut les laver soigneusement à l'eau chaude afin d'évacuer le carbone organique lixiviable. Une centrifugeuse tournant à 40 000 m/s² peut remplacer l'appareil de filtration.

Matériel d'analyse

24. Appareils permettant de déterminer:

- le COD (carbone organique dissous) et le COT (carbone organique total), ou la DCO (demande chimique en oxygène),
- la substance donnée, s'il y a lieu,
- les solides en suspension, le pH, la concentration d'oxygène dans l'eau,
- la température, l'acidité, l'alcalinité,
- l'ammonium, les nitrites et les nitrates, si l'essai est réalisé dans des conditions nitrifiantes.

Eau

25. Eau du robinet renfermant moins de 3 mg/l de COD. Mesurer l'alcalinité si elle est inconnue.
26. Eau désionisée contenant moins de 2 mg/l de COD.

Milieu organique

27. Les eaux usées synthétiques, les eaux usées domestiques ou un mélange des deux sont acceptés comme milieu organique. Il a été démontré (11) (14) que les eaux usées domestiques employées seules augmentaient souvent le pourcentage d'élimination du COD et entraînaient même l'élimination et la biodégradation de certaines substances chimiques non biodégradées par les eaux usées synthétiques formulées selon l'OCDE. En outre, l'addition constante ou intermittente d'eaux usées domestiques stabilise souvent les boues activées, y compris sa capacité à décanter convenablement, laquelle est déterminante. Aussi préconise-t-on l'utilisation d'eaux usées domestiques. On mesure la concentration du COD ou de la DCO. L'acidité ou l'alcalinité du milieu organique doivent être connues. Il peut être nécessaire de tamponner le milieu organique par un composé approprié (hydrogénocarbonate de sodium ou dihydrogénophosphate de potassium) s'il est faiblement acide ou alcalin, pour maintenir le pH à environ $7,5 \pm 0,5$ dans le récipient d'aération durant l'essai. La quantité de tampon à ajouter et le moment de cette addition seront décidés au cas par cas. Lorsqu'on utilise des mélanges de façon continue ou intermittente, le COD (ou la DCO) de ces mélanges doivent être maintenus à une valeur à peu près constante, par exemple par dilution dans l'eau.

Eaux usées synthétiques

28. Dans chaque litre d'eau du robinet, dissoudre 160 mg de peptone, 110 mg d'extrait de viande, 30 mg d'urée, 28 mg d'hydrogénophosphate de potassium anhydre (K_2HPO_4), 7 mg de chlorure de sodium (NaCl), 4 mg de chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) et 2 mg de sulfate de magnésium heptahydraté ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$). Cette eau usée synthétique formulée selon l'OCDE offre un exemple où la concentration moyenne de COD dans les eaux à traiter atteint quelque 100 mg/l. Utiliser en alternance d'autres compositions donnant à peu près la même concentration de COD, plus proches des eaux usées domestiques. Si les eaux à traiter doivent être moins concentrées, diluer les eaux usées synthétiques, à 1/1 par exemple, dans de l'eau du robinet afin d'obtenir une concentration d'environ 50 mg/l. Ces eaux à traiter "allégées" favoriseront la croissance des organismes nitrifiants; cette modification devra être mise à profit au cas où s'avère nécessaire l'étude de la simulation de stations d'épuration des eaux usées en régime nitrifiant. Ces eaux usées synthétiques, à base d'eau distillée, peuvent être confectionnées sous une forme concentrée et stockées à environ 1 °C pendant une semaine au maximum. Selon les besoins, diluer avec de l'eau du robinet (ce milieu n'est pas satisfaisant, notamment parce qu'il présente une concentration en azote très élevée et une teneur en carbone relativement faible, mais rien de mieux n'a été suggéré, en dehors d'un apport supplémentaire de tampon phosphate et de peptone).

Eaux usées domestiques

29. Utiliser des eaux usées qui viennent d'être décantées, recueillies quotidiennement dans une station d'épuration qui reçoit principalement des eaux usées domestiques. Elles doivent être prélevées avant la sédimentation primaire, au niveau du déversoir de la cuve de sédimentation primaire ou dans les eaux brutes de la station de traitement par boues activées. Les eaux usées peuvent être utilisées après plusieurs jours de stockage (généralement pas plus de sept) à environ 4 °C, s'il est prouvé que le COD (ou la DCO) n'ont pas diminué de manière significative (c'est-à-dire de moins de 20 pour cent) durant le stockage. Afin de limiter la perturbation du système, il conviendrait d'ajuster le COD (ou la DCO) de chaque nouveau lot avant son utilisation à une valeur constante adéquate, par exemple en le diluant avec de l'eau du robinet.

Boues activées

30. Prélever les boues activées destinées à l'inoculation dans la cuve d'aération d'une station d'épuration des eaux usées correctement exploitée ou d'une unité à boues activées conçue à l'échelle expérimentale traitant principalement des eaux usées domestiques.

Solutions mères de la substance d'essai

31. Pour les substances présentant une solubilité convenable, préparer des solutions mères aux concentrations appropriées (par exemple, 1 à 5 g/l) dans de l'eau désionisée, ou dans la fraction minérale de l'eau usée synthétique. En ce qui concerne les substances insolubles et volatiles, se reporter à l'appendice 5. Déterminer le COD et le carbone organique total (COT) de la solution mère et répéter les mesures à chaque nouveau lot. Si la différence entre le COD et le COT excède 20 pour cent, il faut vérifier l'hydrosolubilité de la substance d'essai. Comparer le COD ou la concentration de la substance d'essai mesurée par une analyse spécifique de la solution mère à la valeur nominale, pour s'assurer que la récupération est suffisante (elle doit normalement dépasser 90 pour cent). Vérifier, en particulier pour les dispersions, si le COD peut être utilisé comme paramètre d'analyse ou si seule une technique d'analyse spécifique de la substance d'essai est applicable. Les dispersions imposent la centrifugation des échantillons. Pour chaque nouveau lot, mesurer le COD, la DCO, ou la substance d'essai par une analyse spécifique.
32. Déterminer le pH de la solution mère. Les valeurs extrêmes indiquent que l'addition de la substance est susceptible d'influencer le pH des boues activées dans le système d'essai. Dans ce cas, il faut neutraliser la solution mère à pH $7 \pm 0,5$ avec de faibles quantités d'un acide ou d'une base inorganiques, tout en évitant la précipitation de la substance d'essai.

MODE OPÉRATOIRE

33. Le mode opératoire est décrit pour les unités à boues activées; pour le système du vase poreux, il doit être légèrement adapté.

Préparation de l'inoculum

34. Au début de l'essai, inoculer le système d'essai avec des boues activées ou un inoculum contenant une faible concentration de micro-organismes. L'inoculum est conservé dans un endroit aéré à température ambiante avant d'être utilisé dans les 24 heures. Dans le premier cas, on prélève un échantillon de boues activées de la cuve d'aération d'une station d'épuration biologique des eaux usées exploitée avec efficacité ou d'une installation de traitement de laboratoire qui soit essentiellement alimentée par des eaux usées domestiques. S'il y a lieu de simuler des conditions nitrifiantes, collecter les boues d'une station de traitement des eaux usées en régime nitrifiant. Déterminer la concentration des solides en suspension et, si nécessaire, concentrer les boues par décantation pour que le volume ajouté au système d'essai soit minimal. Vérifier que la teneur en matière sèche de départ tourne autour de 2,5 g/l.
35. Dans le deuxième cas, 2 ml/l à 10 ml/l d'un effluent d'une station d'épuration biologique des eaux usées constitueront l'inoculum. Afin de réunir autant d'espèces bactériennes que possible, il peut être utile d'ajouter des inoculums de diverses autres sources, par exemple les eaux de surface. Dans ces conditions, les boues activées vont se former et se développer dans le système d'essai.

Dosage du milieu organique

36. Nettoyer méticuleusement les récipients destinés à recevoir les eaux à traiter et les effluents ainsi que les tuyaux reliant ces deux récipients, afin de prévenir toute prolifération de micro-organismes, au début de l'essai et tout au long de celui-ci. Assembler les systèmes d'essai dans une pièce thermostatée (normalement entre 20 et 25 °C) ou utiliser des unités d'essai à chemise d'eau. Préparer un volume suffisant du milieu organique requis (paragraphe 27-29). Commencer par remplir le récipient d'aération et le décanteur avant d'introduire l'inoculum (paragraphe 34, 35). Actionner le dispositif d'aération de telle sorte que les boues soient maintenues en suspension et en aérobiose, et entamer le dosage des eaux à traiter et le recyclage des boues décantées. Doser le milieu organique des récipients de stockage et introduire ce dernier dans les récipients d'aération (paragraphe 20, 21) des unités d'essai et témoin et recueillir leurs effluents respectifs dans des récipients de stockage similaires. Le temps de rétention hydraulique normal de 6 heures sera assuré par un pompage du milieu organique à raison de 0,5 l/h. Pour confirmer ce débit, mesurer la quantité quotidienne de milieu organique dosé en enregistrant la diminution de volume du milieu dans les récipients de stockage. Il faudrait faire appel à d'autres méthodes de dosage pour déterminer les effets du déversement intermittent et du traitement de "choc" par des produits chimiques.
37. Si le milieu organique est préparé en vue d'une utilisation dont la durée dépasse un jour, il y a lieu de le réfrigérer à environ 4 °C ou de le conserver par une autre méthode adéquate, afin de prévenir la croissance des micro-organismes et la biodégradation en dehors des unités d'essai (paragraphe 29). Si l'on emploie une eau usée synthétique, il est possible de préparer et d'entreposer à environ 4 °C une solution mère concentrée (par exemple dix fois la concentration normale, voir paragraphe 28). Cette solution mère peut être convenablement mélangée à un volume adéquat d'eau du robinet avant usage, ou être pompée directement, tandis que le volume adéquat d'eau du robinet est pompé séparément.

Dosage de la substance d'essai

38. Un volume approprié de la solution mère de la substance d'essai (paragraphe 31) est introduit dans le récipient de stockage des eaux à traiter ou dosé directement, à l'aide d'une autre pompe, dans le récipient d'aération. La concentration d'essai moyenne normale dans les eaux à traiter doit se situer entre 10 mg/l et 20 mg/l de COD, et la concentration maximale à 50 mg/l. Si l'hydrosolubilité de la substance d'essai est faible ou si des effets toxiques risquent de se produire, abaisser la concentration à 5 mg/l de COD ou même moins, mais seulement si une méthode d'analyse spécifique est applicable (les substances d'essai dispersées peu solubles dans l'eau peuvent être ajoutées par le biais de techniques de dosage spéciales, voir appendice 5).
39. Une fois que le système est stabilisé et élimine le COD du milieu organique avec efficacité (environ 80 pour cent), commencer à ajouter la substance d'essai. Il est important de vérifier que toutes les unités travaillent avec le même rendement avant d'ajouter la substance d'essai; si ce n'est pas le cas, il est souvent utile de mélanger les différentes boues et de redistribuer des volumes égaux aux unités. Lorsqu'on utilise un inoculum de quelque 2,5 g/l (poids sec) de boues activées, la substance d'essai peut être ajoutée dès le début de l'essai, car l'addition directe de quantités croissantes dès le départ offre l'avantage de pouvoir rendre les boues activées mieux adaptables à la substance d'essai. Quelles que soient les modalités de l'adjonction de la substance d'essai, il est recommandé de mesurer les débits et/ou les volumes correspondants dans le(s) récipient(s) de stockage à intervalles réguliers.

Manipulation des boues activées

40. La concentration des solides des boues activées se stabilise normalement durant l'essai, quel que soit l'inoculum utilisé, entre 1 et 3 g/l (poids sec) suivant la qualité et la concentration du milieu organique, les conditions expérimentales, la nature des micro-organismes présents et l'influence de la substance d'essai.
41. Déterminer les solides en suspension dans les récipients d'aération au moins une fois par semaine en jetant les boues excédentaires, afin de maintenir la concentration entre 1 g/l et 3 g/l (poids sec), ou veiller à la constance de l'âge moyen des boues, qui doit généralement se situer entre 6 et 10 jours. Si l'on choisit, par exemple, un temps de rétention des boues de 8 jours, on enlèvera chaque jour 1/8 du volume des boues activées dans le récipient d'aération et on le jettera. Effectuer cette opération quotidiennement ou, de préférence, utiliser une pompe automatique intermittente. Le maintien de la concentration des solides en suspension à une valeur constante ou entre des limites étroites ne fige pas le temps de rétention des boues, qui est la variable permettant de déterminer la concentration de la substance d'essai dans l'effluent.
42. Tout au long de l'essai, ôter au moins une fois par jour la boue qui adhère aux parois du récipient d'aération et du décanteur et remettre cette dernière en suspension. Inspecter et nettoyer régulièrement tous les tuyaux afin de prévenir la croissance d'un biofilm. Recycler les boues décantées du décanteur en la renvoyant dans le récipient d'aération, de préférence par pompage intermittent. Le système des vases poreux ne comporte pas de recyclage, mais il faut veiller à placer des cylindres internes propres avant que le volume n'atteigne une croissance significative dans le récipient (paragraphe 21).
43. Une mauvaise décantation et des pertes de boues peuvent se produire dans les unités d'Husmann. On peut y remédier en effectuant en parallèle dans les unités d'essai et les unités témoin une ou plusieurs des opérations énumérées ci-dessous:

- ajouter des boues fraîches ou un floculant (2 ml par récipient d'une solution de FeCl_3 à 50 g/l, par exemple) à intervalles réguliers, par exemple hebdomadaires, en s'assurant que le FeCl_3 ne réagit pas avec la substance d'essai et ne la fasse pas précipiter,
- remplacer l'émulseur à air par une pompe péristaltique, afin d'instaurer un flux de recirculation des boues à peu près égal au débit entrant à appliquer et de permettre la formation d'une zone anaérobie dans les boues décantées (la géométrie du dispositif airlift limite le débit minimum du retour des boues à environ douze fois celui des eaux à traiter),
- pomper les boues, par intermittence, du décanteur vers le récipient d'aération (par exemple pendant 5 minutes toutes les 2,5 heures afin de recycler 1 à 1,5 l/h,
- utiliser un agent antimousse non toxique à une concentration minimale pour empêcher les pertes dues à la formation de mousse (de l'huile de silicone, par exemple),
- insuffler de l'air à travers les boues dans le décanteur par puissantes saccades (par exemple pendant 10 secondes toutes les heures),
- doser le milieu organique par intervalles dans le récipient d'aération (par exemple pendant 3 à 10 minutes toutes les heures).

Échantillonnage et analyse

44. À intervalles réguliers, mesurer la concentration d'oxygène dissous, la température et le pH des boues activées dans les récipients d'aération. Faire en sorte qu'il y ait toujours suffisamment d'oxygène disponible ($> 2 \text{ mg/l}$) et que la température demeure dans la gamme requise (normalement de 20°C à 25°C). Maintenir le pH à $7,5 \pm 0,5$ en dosant de petites quantités d'une base ou d'un acide inorganiques que l'on introduit dans le récipient d'aération ou dans les eaux à traiter, ou en augmentant le pouvoir tampon du milieu organique (voir paragraphe 27). Si une nitrification a lieu, elle génère de l'acide, l'oxydation de 1 mg d'azote produisant l'équivalent de quelque 7 mg de CO_2 . La fréquence des mesures dépend du paramètre à mesurer et de la stabilité du système, et peut varier entre une cadence journalière et hebdomadaire.
45. Déterminer le COD ou la DCO dans les eaux à traiter des récipients d'essai et témoins. Mesurer la concentration de la substance d'essai dans les eaux brutes par une analyse spécifique ou estimer cette variable d'après la concentration dans la solution mère (paragraphe 31), le volume utilisé et la quantité d'eaux usées dosées dans l'unité d'essai. Il est recommandé de calculer la concentration de la substance d'essai afin de réduire la variabilité des données relatives à la concentration.
46. Prélever des échantillons appropriés dans l'effluent recueilli (par exemple des échantillons composites sur 24 heures) qui seront filtrés à travers une membrane à pores de $0,45 \mu\text{m}$ ou centrifugés à environ $40\,000 \text{ m/s}^2$ pendant près d'un quart d'heure. Il convient de recourir à la centrifugation si la filtration pose des difficultés. Déterminer le COD ou la DCO au moins deux fois, afin de mesurer par une analyse spécifique de la substance d'essai la biodégradation finale et, selon les besoins, la biodégradation primaire.
47. L'utilisation de la DCO peut donner lieu à des problèmes analytiques aux faibles concentrations et n'est donc recommandée que si la concentration d'essai est suffisante (environ 30 mg/l). S'agissant de substances très adsorbantes, on préconise de mesurer la quantité de substance adsorbée dans les boues par une technique d'analyse spécifique de la substance d'essai.
48. La fréquence de l'échantillonnage dépend de la durée supposée de l'essai. Un rythme de trois fois par semaine est recommandé. Une fois que les unités fonctionnent de manière efficace, on leur laisse une période d'adaptation de une à six semaines maximum après l'introduction de la substance d'essai, afin de leur permettre d'atteindre un état stationnaire. Il faut, de préférence, obtenir au moins 15 valeurs valables pendant la phase plateau (paragraphe 59), qui dure normalement trois semaines, pour évaluer le résultat de l'essai. L'essai peut s'arrêter là si l'on a atteint un degré d'élimination suffisant (par exemple supérieur à 90 pour cent) et si l'on possède ces 15 valeurs issues d'analyses conduites chaque jour de semaine pendant trois semaines. L'essai ne doit normalement pas se prolonger au-delà de 12 semaines après l'addition de la substance d'essai.
49. Si les boues sont nitrifiantes et que les effets de la substance d'essai sur la nitrification sont à étudier, analyser des échantillons prélevés dans les effluents de l'unité d'essai et de l'unité témoin, au moins une fois par semaine pour l'ammonium et/ou les nitrites et nitrates.
50. Toutes les analyses doivent être exécutées le plus vite possible, en particulier celles qui portent sur l'azote. Au cas où les analyses doivent être différées, conserver les échantillons à environ 4°C à l'obscurité dans des bouteilles pleines et bouchées hermétiquement. S'il y a lieu de stocker les échantillons pendant plus de 48 heures, on les conservera par congélation, acidification (par exemple 10 ml/l d'une solution d'acide sulfurique à 400 g/l) ou par adjonction d'un toxique approprié [par exemple 20 ml/l d'une solution de chlorure de mercure (II) à 10 g/l]. S'assurer que la technique de conservation n'influence pas les résultats de l'analyse.

Couplage des unités d'essai

51. Si l'on effectue un couplage (appendice 3), échanger quotidiennement la même quantité de boues activées (de 150 ml à 1 500 ml pour les récipients d'aération contenant trois litres de liquide) entre les récipients d'aération de l'unité d'essai et de l'unité témoin. Si la substance d'essai s'adsorbe fortement sur les boues, n'échanger que le surnageant des décanteurs. Introduire dans les deux cas un facteur de correction dans le calcul des résultats de l'essai (paragraphe 55).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

52. Calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai en termes de COD ou de DCO pour chaque évaluation programmée dans le temps à l'aide de l'équation suivante:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

où

D_t = pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO à l'instant t ;

C_s = COD ou DCO dans les eaux à traiter, induits par la substance d'essai, estimés de préférence à partir de la solution mère (mg/l);

E = valeur mesurée du COD ou de la DCO dans les effluents d'essai à l'instant t (mg/l);

E_o = valeur mesurée du COD ou de la DCO dans les effluents témoins à l'instant t (mg/l).

53. Le degré d'élimination du COD ou de la DCO du milieu organique de l'unité témoin est utile pour évaluer l'activité de biodégradation des boues activées pendant l'essai. Calculer le pourcentage d'élimination selon l'équation suivante:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

où

D_B = pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO du milieu organique de l'unité témoin à l'instant t ;

C_M = COD ou DCO du milieu organique des eaux brutes témoins (mg/l).

Calculer, facultativement, le pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO engendrés par le milieu organique et la substance d'essai dans l'unité d'essai, à partir de l'équation suivante:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

où

D_T = pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO dans la totalité des eaux brutes d'essai;

C_T = COD ou DCO de la totalité des eaux brutes d'essai ou calculés à partir des solutions mères (mg/l).

54. Calculer l'élimination de la substance d'essai si elle a été mesurée par une méthode d'analyse spécifique à chaque instant d'évaluation, selon l'équation suivante:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

où

D_{ST} = pourcentage d'élimination primaire de la substance d'essai à l'instant t ;

S_i = concentration mesurée ou estimée de la substance d'essai dans les eaux brutes d'essai (mg/l);

S_e = concentration mesurée de la substance d'essai dans les eaux brutes d'essai à l'instant t (mg/l).

55. En mode couplé, compenser la dilution de la substance d'essai dans le récipient d'aération, occasionnée par l'échange de boues, par un facteur de correction (voir appendice 3). Si on a appliqué un temps de rétention hydraulique moyen de six heures et échangé la moitié du volume de boues activées contenu dans le récipient d'aération, il faut corriger les valeurs déterminées de l'élimination quotidienne (D_t , paragraphe 52) afin d'obtenir le degré réel d'élimination, D_{tc} , de la substance d'essai, à partir de l'équation suivante:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Expression des résultats de l'essai

56. Tracer une courbe des pourcentages d'élimination D_t (ou D_{tc}) et D_{ST} , le cas échéant, en fonction du temps (voir appendice 2). Certaines conclusions peuvent être tirées de l'allure de la courbe d'élimination de la substance d'essai (proprement dite ou à travers le COD) sur le processus d'élimination.

Adsorption

57. Si l'on observe une élimination élevée de la substance d'essai en termes de COD dès le début de l'essai, cette substance est probablement évacuée par adsorption sur les solides des boues activées. Il est possible de prouver ce phénomène en mesurant la substance d'essai adsorbée au moyen d'une analyse spécifique. Il est rare que l'élimination du COD de substances adsorbables demeure élevée tout au long de l'essai; normalement, le degré d'élimination est élevé au départ puis décline progressivement jusqu'à une valeur d'équilibre. Si toutefois la substance d'essai était de nature à acclimater la population de micro-organismes d'une façon ou d'une autre, l'élimination du COD de la substance d'essai augmenterait pour atteindre une valeur plateau élevée.

Phase de latence

58. Beaucoup de substances d'essai, comme cela se produit dans les essais de sélection statiques, traversent une phase de latence avant que la biodégradation n'opère à plein régime. Durant la phase de latence, les bactéries qui dégradent s'accliment ou s'adaptent et n'éliminent presque pas la substance d'essai, ensuite elles commencent à croître. Cette phase s'achève et la phase de dégradation est censée débiter lorsque environ 10 pour cent de la quantité initiale de la substance d'essai est éliminée (y compris par adsorption, le cas échéant). La phase de latence est souvent très variable et peu reproductible.

Phase plateau

59. Le plateau de la courbe d'élimination d'un essai conduit en continu est défini comme la phase au cours de laquelle la dégradation est maximale. La phase plateau doit durer au moins trois semaines et être déterminée par une quinzaine de valeurs mesurées valables.

Degré moyen d'élimination de la substance d'essai

60. Calculer la moyenne des valeurs d'élimination (D_t) de la substance d'essai durant la phase plateau. Arrondi au nombre entier le plus proche (1 %), elle représente le degré d'élimination de la substance d'essai. On recommande également de calculer l'intervalle de confiance à 95 % de la valeur moyenne.

Élimination du milieu organique

61. Porter sur un graphique le pourcentage d'élimination du COD ou de la DCO du milieu organique dans l'unité témoin (D_B) en fonction du temps. Indiquer le degré d'élimination moyen comme pour la substance d'essai (paragraphe 60).

Indication de la biodégradation

62. Si la substance d'essai n'est pas adsorbée de façon significative sur les boues activées et que la courbe d'élimination présente le profil typique d'une courbe de biodégradation avec phase de latence, dégradation et plateau (paragraphe 58, 59), l'élimination mesurée est attribuable à coup sûr à la biodégradation. Si l'élimination est élevée au début, l'essai de simulation ne permet pas de faire la distinction entre les processus d'élimination biologiques et non biologiques. Dans ces cas-là, comme dans d'autres où la biodégradation suscite des doutes, (par exemple si on observe une séparation), analyser les substances d'essai adsorbées ou effectuer des essais de biodégradation statiques supplémentaires fondés sur des paramètres qui attestent clairement des processus biologiques. Il s'agit d'essais basés sur la consommation d'oxygène [chapitres C.4-D, E et F de la présente annexe (6)] ou sur la mesure de la production de dioxyde de carbone [chapitre C.4-C de la présente annexe (6)] ou de l'essai au CO_2 dans l'espace de tête de l'ISO (18), à conduire sur un inoculum préexposé provenant de l'essai de simulation. Si l'élimination du COD et de la substance proprement dite ont été mesurées, des différences significatives (le premier étant inférieur à la seconde) entre les pourcentages indiquent que les effluents renferment des produits organiques intermédiaires susceptibles d'être plus difficiles à dégrader que la substance parente.

Validité des résultats de l'essai

63. L'obtention d'informations sur l'activité de biodégradation normale de l'inoculum est subordonnée à la détermination du degré d'élimination du milieu organique (paragraphe 53) dans l'unité témoin. L'essai est considéré comme valable si le degré d'élimination du COD ou de la DCO dans la ou les unités témoins est supérieur à 80 pour cent après deux semaines et qu'aucun phénomène inhabituel n'a été observé.
64. Si on a utilisé une substance de référence immédiatement biodégradable, le degré de biodégradation (D_t , paragraphe 52) doit être supérieur à 90 pour cent.
65. Si l'essai est mené dans des conditions nitrifiantes, la concentration moyenne dans les effluents doit être < 1 mg/l d'azote ammoniacal et < 2 mg/l d'azote sous forme de nitrites.
66. Faute de remplir ces critères (paragraphe 63-65), recommencer l'essai en prélevant l'inoculum à une source différente, mettre une substance de référence à l'essai et réexaminer tout le mode opératoire.

Rapport d'essai

67. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

Substance d'essai:

- nature chimique,
- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques.

Conditions d'essai:

- type de système d'essai; toute modification imposée par l'essai de substances insolubles et volatiles,
- type de milieu organique,
- proportion et nature des effluents industriels dans les eaux usées, s'ils sont connus,
- inoculum, nature et site(s) de prélèvement, concentration et prétraitement éventuel,
- solution mère de la substance d'essai: teneur en COD et en COT; mode de préparation, s'il s'agit d'une suspension; concentration d'essai appliquée; justifier pourquoi, le cas échéant, on s'écarte de l'intervalle 10 à 20 mg/l de COD; méthode d'addition; date de la première addition; toute modification,
- âge moyen des boues et temps de rétention hydraulique moyen; méthode d'épuisement des boues; méthodes pour vaincre le foisonnement, pertes de boue, etc.,
- techniques d'analyse employées,
- température d'essai,
- qualités du foisonnement des boues, indice des boues, matières en suspension de la liqueur mixte,
- tout écart du mode opératoire normal et toute circonstance susceptibles d'avoir affecté les résultats.

Résultats de l'essai:

- toutes les données mesurées (COD, DCO, analyses spécifiques, pH, température, concentration d'oxygène, solides en suspension, substances azotées, le cas échéant),
- toutes les valeurs calculées de D_t (ou D_{t0}), D_B , D_{St} présentées sous forme de tableau et de courbes d'élimination,
- informations sur les phases de latence et de plateau, durée de l'essai, degré d'élimination de la substance d'essai et du milieu organique dans l'unité témoin, données statistiques, conclusions sur la biodégradabilité et validité de l'essai,
- examen des résultats.

BIBLIOGRAPHIE:

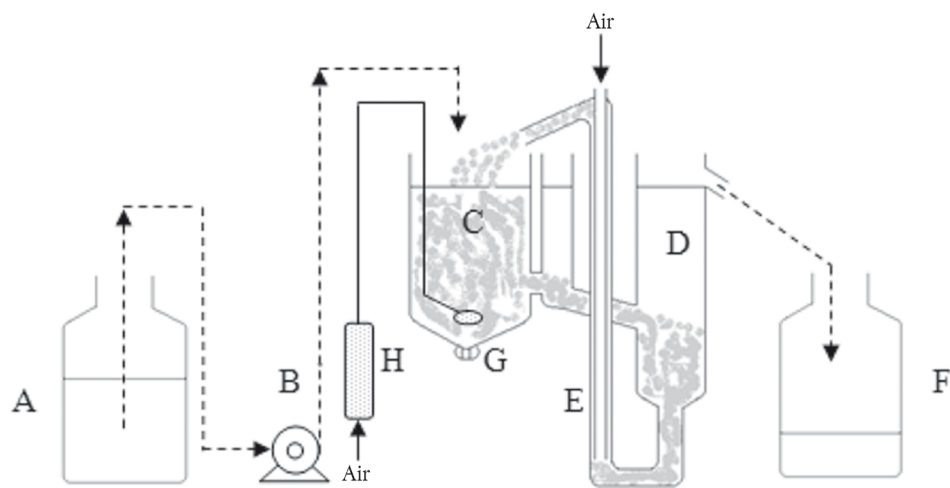
- (1) Swisher R.D. (1987). "Surfactant Biodegradation", 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1 085 pp.
 - (2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.
 - (3) Painter H.A. and King E.F. (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.
 - (4) Painter H.A. and King E.F. (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.
 - (5) Eckenfelder, W.W. (19) US EPA.
 - (6) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité "facile".
 - (7) Chapitre C.12 de la présente annexe, Biodégradation – Test S.C.A.S. modifié.
 - (8) Chapitre C.19 de la présente annexe, Estimation du coefficient d'adsorption (K_{OC}) sur le sol et les boues d'épuration par chromatographie liquide haute performance (HPLC).
 - (9) Gerike P. and Fischer W.K. (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.
 - (10) Gerike P. and Fischer W.K. (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.
 - (11) Painter H.A. and Bealing D. (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
 - (12) ISO 11733 (1995; révision 2004). Détermination de l'élimination et de la biodégradabilité des composés organiques en milieu aqueux – Essai de simulation des boues activées.
 - (13) Birch R.R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.
 - (14) Birch R.R. (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.
 - (15) Gerike P., Fischer W.K. and Holtmann W. (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.
 - (16) Baumann U., Kuhn G. and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.
 - (17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.
 - (18) ISO 14593 (1998). Qualité de l'eau – Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques – Méthode par analyse du carbone inorganique dans des récipients hermétiquement clos (Essai au CO_2 dans l'espace de tête).
-

Appendice 1

Figure 1

Matériel utilisé pour évaluer la biodégradabilité

Unité d'Husmann



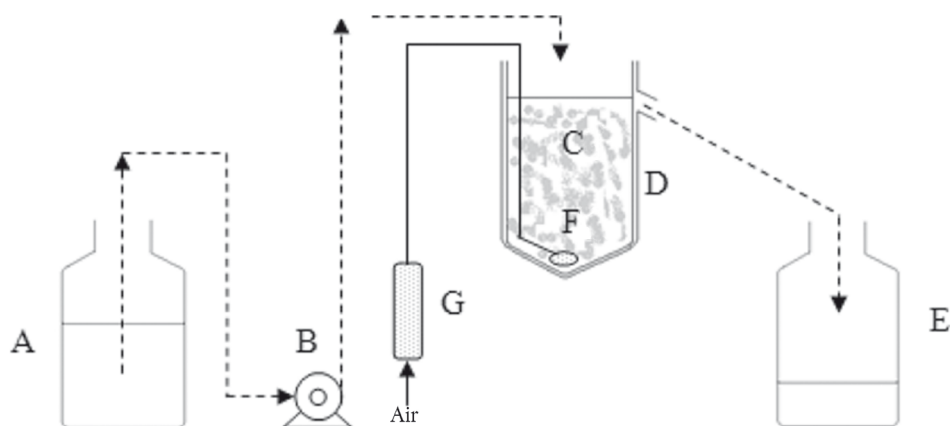
- A. Récipient de stockage
- B. Pompe doseuse
- C. Récipient d'aération (3 litres)
- D. Décanteur

- E. Émulseur à air
- F. Collecteur
- G. Cuve d'aération
- H. Débitmètre d'air

Figure 2

Matériel utilisé pour évaluer la biodégradabilité

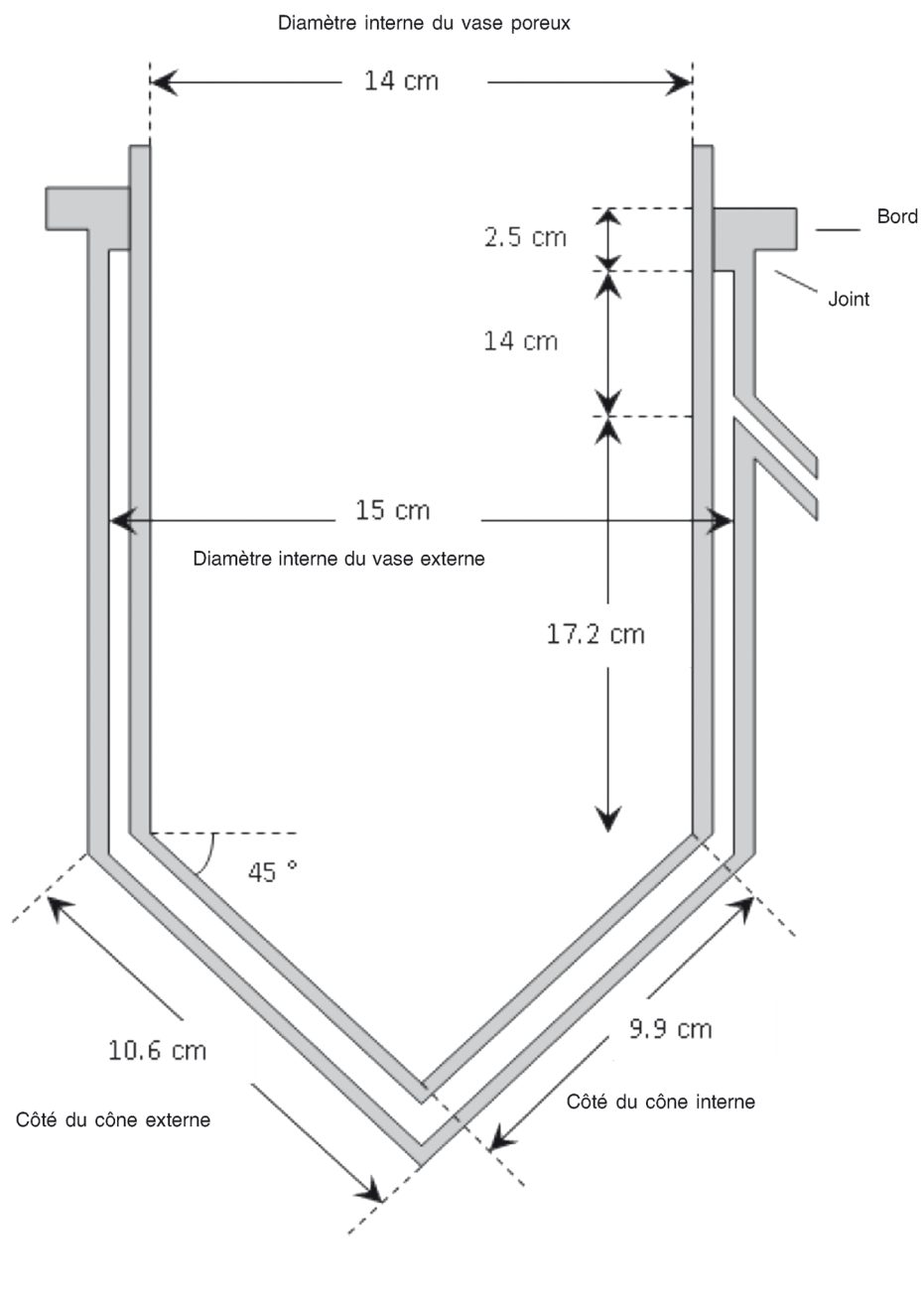
Vase poreux



- A. Récipient de stockage
- B. Pompe doseuse
- C. Vase d'aération poreux
- D. Enveloppe imperméable

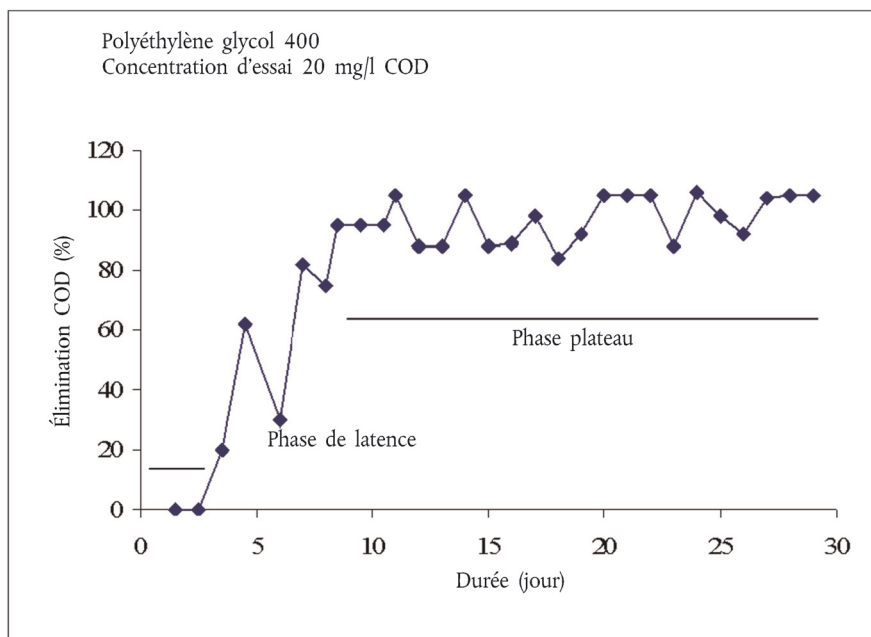
- E. Collecteur
- F. Diffuseur
- G. Débitmètre d'air

Figure 3

Agrandissement du vase d'aération poreux de 3 litres

Appendice 2

Exemple d'une courbe d'élimination



Appendice 3

COMPLÉMENT D'INFORMATION

COUPLAGE DES UNITÉS D'ESSAI

Pour tenter d'égaliser les populations de micro-organismes dans les boues de l'unité d'essai, qui reçoit les eaux usées et une substance d'essai, et de l'unité témoin, qui ne reçoit que les eaux usées, on a instauré un échange de boue quotidien entre ces deux unités (1). Ce procédé dit "de couplage" a donné lieu à la méthode des unités couplées. Le couplage, réalisé au départ sur des unités à boues activées de Husmann, a aussi été appliqué à des unités à vase poreux (2) (3). Les résultats obtenus avec les unités couplées et non couplées, qu'il s'agisse des unités d'Husmann ou des unités à vase poreux, ne donnent lieu à aucune différence significative, si bien qu'il n'y a aucun avantage à investir plus de temps et d'énergie dans le couplage.

Les échanges de boue peuvent laisser croire à une élimination assez considérable, puisqu'une partie de la substance d'essai est transférée et que l'écart entre la concentration de la substance d'essai dans les effluents d'essai et dans les effluents témoins se comble. Il faut donc appliquer des facteurs de correction qui dépendent de la fraction échangée et du temps de rétention hydraulique moyen. Une méthode de calcul plus détaillée a été publiée (1).

Calculer le degré d'élimination corrigé du COD ou de la DCO selon la formule générale suivante:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12) \%$$

où

D_{tc} = pourcentage d'élimination corrigé du COD ou de la DCO;

D_t = pourcentage d'élimination déterminé du COD ou de la DCO;

a = fraction volumique échangée entre les unités à boues activées;

r = temps de rétention hydraulique moyen (h)

Si, par exemple, la moitié du volume du récipient d'aération est échangée ($a = 0,5$) et que le temps de rétention hydraulique moyen est de 6 h, la formule de correction devient:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Fischer W., Gerike P., Holtmann W. (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.
- (2) Painter H.A., Bealing D.J. (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen B.N., Muntau H., Angeletti G.
- (3) Painter H.A., King E.F. (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

Appendice 4

ÉVALUATION DE L'INHIBITION DES BOUES ACTIVÉES

Inhibition par les substances d'essai

1. Il se peut qu'une substance chimique (ou des eaux usées) ne soient ni dégradées ni éliminées au cours de l'essai de simulation et qu'elles inhibent de surcroît les micro-organismes des boues. D'autres composés chimiques sont biodégradés à faible concentration, mais ont une action inhibitrice à des concentrations supérieures (hormèse). Les effets inhibiteurs peuvent avoir été révélés à un stade précédent ou être déterminés par un essai de toxicité, conduit sur un inoculum semblable ou identique à celui utilisé au cours de l'essai de simulation (1). Ces méthodes ont trait à l'inhibition de la fixation d'oxygène [chapitre C.11 de la présente annexe (2) et norme ISO 8192 (3)] ou à l'inhibition de la croissance des organismes des boues [norme ISO 15522 (4)].
2. Une inhibition survenant au cours d'un essai de simulation se manifestera par une différence de COD ou de DCO entre les effluents du récipient d'essai et ceux du récipient témoin supérieure au COD ajouté par la substance d'essai. En d'autres termes, la présence de la substance d'essai abaissera le pourcentage d'élimination du COD (et de la demande biochimique en oxygène DBO, de la demande chimique en oxygène DCO, et/ou de l'ion NH_4^+) du milieu organique traité. Si cela se produit, il faudrait recommencer l'essai en ramenant la concentration de la substance d'essai jusqu'à un niveau où elle n'est pas inhibitrice et éventuellement aussi en diminuant davantage sa concentration jusqu'à une valeur où elle est biodégradée. Néanmoins, si la substance d'essai (ou les eaux usées) altèrent le processus à toutes les concentrations testées, il est vraisemblable que la substance est difficile, voire impossible, à traiter par voie biologique, mais il peut être pertinent de répéter l'essai avec des boues activées prélevées à une autre source et/ou en soumettant les boues à une acclimatation plus progressive.
3. Par contre, si la substance d'essai est éliminée par voie biologique du premier coup dans l'essai de simulation, il convient d'accroître sa concentration si l'on cherche à savoir si elle a un pouvoir inhibiteur.
4. N'oublions pas, lorsqu'on tente de déterminer les degrés d'inhibition, que la population d'une boue activée est susceptible d'évoluer, si bien qu'avec le temps, les micro-organismes peuvent devenir résistants vis-à-vis d'une substance inhibitrice.
5. Calcul du degré d'inhibition:

Les pourcentages d'élimination globaux R_o de la DBO, du COD, de la DCO, etc., dans les unités d'essai et témoins peuvent être calculés comme suit:

$$R_o = 100 (I - E)/I \%$$

où:

I = concentration de la DBO, du COD, de la DCO etc., dans les eaux à traiter des récipients d'essai ou témoins (mg/l);
E = concentrations respectives dans les effluents (mg/l).

I et E doivent être corrigés pour tenir compte du COD provenant de la substance d'essai dans les unités d'essai, sinon le calcul du pourcentage d'inhibition sera incorrect.

Le degré d'inhibition découlant de la présence de la substance d'essai peut être calculé selon cette formule:

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 (R_c - R_e)/R_c$$

où:

R_c = pourcentage d'élimination dans les récipients témoins;
 R_e = pourcentage d'élimination dans les récipients d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Reynolds L. *et al.* (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. *Chemosphere* 16: 2259.
- (2) Chapitre C.11 de la présente annexe, Biodégradation – boues activées: essai d'inhibition de la respiration.
- (3) ISO 8192 (2007) Qualité de l'eau – Essai d'inhibition de la consommation d'oxygène par des boues activées pour l'oxydation du carbone et de l'ammonium.
- (4) ISO 15522 (1999) Détermination de l'effet inhibiteur des constituants de l'eau sur la croissance des micro-organismes de boues activées.

Appendice 5

Substances d'essai peu solubles dans l'eau – substances volatiles**Substances peu solubles dans l'eau**

Il semble qu'il y ait peu de publications rapportant des essais de simulation de traitement des eaux usées conduits sur des substances peu solubles dans l'eau et insolubles (1) (2) (3).

Il n'existe pas de méthode de dispersion universelle applicable à toutes les substances d'essai insolubles. Sur les quatre catégories de méthodes décrites dans la norme ISO 10634 (4), les deux qui paraissent convenir à la dispersion des substances destinées à un essai de simulation font appel à des agents émulsifiants et/ou à des ultrasons. La stabilité de la dispersion obtenue doit être établie pour une période d'au moins 24 heures. Des dispersions convenablement stabilisées contenues dans des réservoirs agités en permanence (paragraphe 38), seront ensuite dosées dans le récipient d'aération séparément des eaux usées domestiques ou synthétiques.

Si les dispersions sont stables, étudier comment déterminer la substance d'essai sous sa forme dispersée. Comme le COD risque fort d'être inapproprié, il faudrait mettre au point une méthode d'analyse spécifique de la substance d'essai applicable aux effluents, aux solides des effluents et à la boue activée. Le devenir de la substance d'essai dans la simulation du traitement par boues activées serait alors déterminé dans les phases solides et liquides. On établirait ainsi un bilan massique pour savoir si la substance d'essai a été biodégradée. Mais ce dernier n'indique que la biodégradation primaire. Il faudrait tâcher de démontrer la biodégradation finale par le biais d'un essai de biodégradabilité immédiate au respiromètre [chapitre C.4 de la présente annexe (5), C, F ou D] en utilisant comme inoculum une boue exposée à la substance d'essai au cours de l'essai de simulation.

Substances volatiles

L'application d'un essai de simulation du traitement des eaux usées aux substances volatiles est discutable et problématique. Comme pour les substances d'essai peu solubles dans l'eau, les rapports décrivant des essais de simulation sur des substances volatiles semblent très rares. On adapte un appareil classique de mélange intégral en bouchant hermétiquement le récipient d'aération et le décanteur, en mesurant et contrôlant le flux d'air par des débitmètres et en faisant passer les gaz sortants par des pièges afin de recueillir les matières organiques volatiles. Dans certains cas, une pompe à vide dirige les gaz sortants vers un piège froid ou un piège purgeur contenant du Tenax ou un gel de silice pour analyse par chromatographie en phase gazeuse. La substance d'essai retenue par le piège peut être déterminée par analyse.

L'essai est réalisé en deux parties. Les unités fonctionnent d'abord sans boue, mais en pompant les eaux usées synthétiques additionnées de la substance d'essai dans le récipient d'aération. On analyse la substance d'essai dans des échantillons d'eaux à traiter, d'effluents et de gaz sortants pendant quelques jours. À partir des données recueillies, il est possible de calculer le pourcentage (R_{VS}) de substance d'essai extraite du système.

Ensuite l'essai biologique normal (avec boue) est mené dans des conditions expérimentales identiques à celles de l'étude d'extraction. On mesure aussi le COD ou la DCO pour s'assurer que les unités fonctionnent efficacement. La substance d'essai est mesurée de temps à autre dans les eaux à traiter, les effluents et les gaz sortants au cours de la première partie de l'essai, et plus fréquemment après l'acclimatation. Les données tirées de la phase stationnaire permettent à nouveau de calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai dans la phase liquide par les processus physiques et biologiques (R_T) ainsi que la proportion (R_V) extraite du système.

Calcul:

- a) Dans l'essai non biologique, le pourcentage (R_{VP}) de substance d'essai extraite du système peut être calculé à partir de la formule suivante:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

où

R_{VP} = élimination de la substance d'essai par volatilisation (%),

S_{VP} = substance d'essai collectée par le piège, exprimée en équivalent de concentration dans la phase liquide (mg/l),

S_{IP} = concentration de la substance d'essai dans les eaux à traiter (mg/l).

- b) Dans l'essai biologique, le pourcentage (R_V) de la substance d'essai extraite du système peut être calculé à partir de la formule suivante:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

où

R_V = élimination de la substance d'essai par volatilisation au cours de l'essai biologique (%),

S_V = substance d'essai collectée par le piège au cours de l'essai biologique, exprimée en équivalent de concentration dans les flux liquides entrants (mg/l),

S_I = concentration de la substance d'essai dans les eaux brutes (mg/l).

- c) Dans l'essai biologique, le pourcentage (R_T) de substance d'essai éliminée par tous les processus est régi par l'équation suivante:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

où

S_E = concentration de la substance d'essai dans les effluents (liquides) (mg/l).

- d) Aussi, le pourcentage (R_{BA}) enlevé par biodégradation et par adsorption peut-il être calculé comme suit:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Il conviendrait de réaliser d'autres essais pour déterminer si la substance d'essai est adsorbée, auquel cas une correction supplémentaire pourrait être apportée.

- e) Une comparaison entre la proportion de substance d'essai extraite lors de l'essai biologique (R_V) et de l'essai non biologique (R_{VP}) montre l'effet global du traitement biologique sur l'émission de la substance d'essai dans l'atmosphère.

Exemple: Benzène

Temps de rétention des boues = 4 jours

Eaux usées synthétiques: temps de rétention = 8 heures

$$S_{IP} = S_I = 150 \text{ mg/l}$$

$$S_{VP} = 150 \text{ mg/l} \quad (S_{EP} = 0)$$

$$S_V = 22,5 \text{ mg/l}$$

$$S_E = 50 \text{ µg/l}$$

Donc,

$$R_{VP} = 100 \%, R_V = 15 \%$$

$$R_T = 100 \% \text{ and } R_{BA} = 85 \%$$

On a supposé qu'il n'y avait pas adsorption du benzène sur la boue.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Horn J.A., Moyer J.E., Hale J.H. (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.
 - (2) Pitter P., Chudoba J. (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.
 - (3) Stover E.L., Kincannon D.F. (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.
 - (4) ISO 10634 (1995) Qualité de l'eau – Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.
 - (5) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité "facile".
-

Appendice 6

Effets du temps de rétention des boues (TRB) sur les possibilités de traitement des substances chimiques

INTRODUCTION

1. La méthode décrite dans le corps de texte a été conçue pour vérifier si les substances chimiques testées (généralement celles connues comme étant intrinsèquement, mais pas immédiatement biodégradables) pouvaient être biodégradées dans les limites imposées par les stations d'épuration des eaux usées. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'élimination et de biodégradation. Les conditions de fonctionnement des unités à boues activées et le choix des eaux à traiter autorisent une variation assez marquée de la concentration de la substance d'essai dans les effluents. Les essais ne portent que sur une seule concentration nominale de solides des boues ou sur un seul temps de rétention nominal des boues (TRB), et les régimes d'épuisement des boues décrits sont susceptibles de faire varier considérablement le TRB durant l'essai, d'un jour à l'autre et sur une journée.
2. Dans cette variante (1) (2), le TRB est régulé dans des limites beaucoup plus étroites tout au long de chaque période de 24 heures (comme à grande échelle), si bien que la concentration des effluents est plus constante. On recommande les eaux usées domestiques, qui donnent des pourcentages d'élimination plus réguliers et plus élevés. Les effets de plusieurs valeurs du TRB sont aussi examinés et l'incidence d'une gamme de températures sur la concentration dans les effluents peut être déterminée dans une étude plus détaillée.
3. Il n'existe pas encore de consensus général sur les modèles cinétiques qui reproduisent la biodégradation des substances chimiques dans les conditions d'une station de traitement des eaux usées. S'agissant des données collectées, le modèle de croissance bactérienne et d'utilisation du substrat de Monod a été choisi (1) (2) dans la mesure où la méthode était destinée à ne s'appliquer qu'aux substances chimiques produites par tonnes et donc présentes à des concentrations supérieures à 1 mg/l dans les eaux usées. La validité du modèle simplifié et des hypothèses émises a été établie à l'aide d'une série d'alcooléthoxylates (2) (3) manifestant des degrés variables de biodégradabilité primaire.

Note: cette variante reprend en grande partie le texte de la présente méthode d'essai C.10-A, seuls les détails qui s'en écartent étant mentionnés ci-après.

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. Des unités à boues activées comportant un vase poreux, conçues pour faciliter l'épuisement (presque) continu de la liqueur mixte grâce à un réglage très précis du temps de rétention des boues (TRB, ou θ_d), fonctionnent en mode non couplé et couvrent une gamme de temps de rétention et, facultativement, de températures. Le temps de rétention varie généralement entre 2 et 10 jours et la température entre 5 et 20 °C. Les eaux usées, de préférence domestiques, et une solution de la substance d'essai sont dosées séparément dans les unités à des fréquences induisant le temps de rétention des eaux usées requis (3 à 6 heures) et la concentration voulue de la substance d'essai dans les eaux à traiter. Les unités témoins qui ne reçoivent pas la substance d'essai tournent en parallèle, à des fins de comparaison.
5. D'autres types d'appareils peuvent être utilisés, mais il faut être très attentif à bien maîtriser le TRB. Lorsqu'on utilise, par exemple, des installations qui comprennent un décanteur, il peut être nécessaire de tenir compte de la perte de solides via les effluents de l'installation. En outre, les erreurs dues à la variation de la quantité de boue dans le décanteur doivent être évitées par des précautions particulières.
6. Les unités fonctionnent sous chaque combinaison de conditions choisie et, une fois l'équilibre atteint, on mesure les concentrations moyennes de la substance d'essai dans les effluents à l'état stationnaire et, facultativement, le COD, sur une période d'environ trois semaines. L'évaluation du pourcentage d'élimination de la substance d'essai et, facultativement, du COD, sera complétée par une représentation graphique de la relation entre les conditions de fonctionnement de l'installation et la concentration dans les effluents. À partir de là, il est possible de calculer des constantes cinétiques expérimentales et de prévoir les conditions dans lesquelles la substance d'essai peut être traitée.

INFORMATION SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

7. Appliquer les paragraphes 12 et 13 du chapitre C.10-A.

NIVEAUX DE SEUILS

8. Appliquer les paragraphes 14 et 15 du chapitre C.10-A.

SUBSTANCE D'ESSAI DE RÉFÉRENCE

9. Appliquer le paragraphe 16 du chapitre C.10-A.

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS D'ESSAI

10. Appliquer les paragraphes 17 et 18 du chapitre C.10-A.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareils

11. Une unité qui convient ici est une adaptation du système du vase poreux (appendice 6.1). Elle consiste en un vase interne (ou revêtement) en polypropylène poreux de 3,2 mm d'épaisseur dont les pores mesurent environ 90 µm; l'assemblage est soudé bout à bout, ce qui rend l'unité plus robuste que celle décrite au paragraphe 21 du présent chapitre, C.10-A). Le revêtement est entouré d'une enveloppe en polyéthylène imperméable qui comprend deux parties: une base circulaire perforée pour laisser passer deux tuyaux à air et un tuyau transportant la boue épuisée, et un cylindre vissé sur le dessus de la base et doté d'une sortie placée de manière à ce qu'il déverse un volume connu (3 l) dans le vase poreux. L'un des deux tuyaux à air est équipé d'une pierre diffuseuse et l'autre est ouvert aux extrémités et disposé à angle droit de la pierre dans le vase. Ce système crée suffisamment de turbulences pour assurer un mélange intégral des composants du vase et engendrer des concentrations en oxygène dissous supérieures à 2 mg/l.
12. Les unités, en nombre adéquat, sont placées dans un bain-marie ou dans des locaux à température constante et thermostatées entre 5 et 20 °C (± 1 °C). On emploie deux pompes pour doser la solution de la substance d'essai et les boues décantées dans les récipients d'aération aux débits requis (respectivement 0-1,0 ml/min et 0-25 ml/min) et une troisième pompe pour évacuer la boue épuisée des récipients d'aération. Le débit nécessairement très lent des boues épuisées est imprimé par une pompe qui fonctionne à une vitesse supérieure et par intermittences, au moyen d'un minuteur qui l'actionne, par exemple, pendant 10 secondes par minute avec un débit de 3 ml/min, ce qui donne un débit de boue épuisée de 0,5 ml/min.

Appareil de filtration ou centrifugeuse

13. Appliquer le paragraphe 23 du chapitre C.10-A.

Matériel d'analyse

14. Appliquer le paragraphe 24 du chapitre C.10-A.

Eau

15. Appliquer les paragraphes 25 et 26 du chapitre C.10-A.

Milieu organique

16. Appliquer le paragraphe 27 du chapitre C.10-A.

Eaux usées synthétiques

17. Appliquer le paragraphe 28 du chapitre C.10-A.

Eaux usées domestiques

18. Appliquer le paragraphe 29 du chapitre C.10-A.

Boues activées

19. Appliquer le paragraphe 30 du chapitre C.10-A.

Solutions mères de la substance d'essai

20. Appliquer les paragraphes 31 et 32 du chapitre C.10-A.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation de l'inoculum

21. Voir chapitre C.10-A, paragraphe 34 uniquement – utiliser des boues activées (environ 2,5 g/l).

Nombre d'unités d'essai

22. S'agissant d'un essai simple, qui ne vise qu'à mesurer le pourcentage d'élimination, un seul TRB suffit, mais si on veut réunir les données nécessaires pour calculer les constantes cinétiques expérimentales, on aura besoin de 4 ou 5 valeurs de TRB. Les valeurs choisies sont généralement comprises entre 2 et 10 jours. Il est plus pratique de réaliser un essai en appliquant 4 ou 5 valeurs de TRB simultanément à la même température; les études plus poussées portent sur les mêmes valeurs de TRB, ou éventuellement sur une gamme de valeurs différentes, à d'autres

températures fixées entre 5 et 20 °C. La biodégradation primaire (utilisation principale) ne requiert normalement qu'une seule unité par combinaison de conditions. Il faut ajouter une unité témoin par combinaison de conditions, qui reçoit les eaux usées mais pas la substance d'essai, pour la biodégradation finale. Si on suppose que les eaux usées employées renferment la substance d'essai, il y a lieu d'incorporer des unités témoins lorsqu'on évalue la biodégradation primaire, et d'apporter les corrections nécessaires aux calculs.

Dosage du milieu organique et de la substance d'essai

23. Voir le chapitre C.10-A, paragraphes 36 à 39, mais remarquer que la solution de la substance d'essai est dosée séparément et différents débits de boues épuisées sont appliqués. Surveiller fréquemment, par exemple deux fois par jour et ajuster si nécessaire à ± 10 pour cent, les débits des eaux à traiter, des effluents et des boues épuisées. Si les méthodes d'analyse posent des difficultés avec les eaux usées domestiques, mener l'essai avec de l'eau usée synthétique, en s'assurant que différents milieux donnent des résultats cinétiques comparables.

Manipulation des boues activées

24. S'aligner sur le chapitre C.10-A, paragraphes 40 à 43, mais ne réguler le TRB que par un débit "constant" de boues épuisées.

Échantillonnage et analyse

25. Se référer au chapitre C.10-A, paragraphes 44 à 50, à cette exception près qu'on déterminera la concentration de la substance d'essai et, facultativement, le COD, mais la DOC ne doit pas être utilisée.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

26. Suivre le chapitre C.10-A, paragraphes 52 à 54.

Expression des résultats de l'essai

27. Suivre le chapitre C.10-A, paragraphes 56 à 62.

Calcul des constantes cinétiques

28. Il est plus réaliste de mentionner la concentration moyenne de la substance d'essai à l'état stationnaire dans l'effluent et de décrire comment elle varie en fonction des conditions de fonctionnement de l'installation que de citer le pourcentage de biodégradation primaire. L'équation [6] de l'appendice 6.2 est utile à cet égard, qui livre des valeurs de K_S , μ_m et ϑ_{SC} , le temps de rétention critique des boues.

[Des valeurs approximatives de K_S et de μ_m peuvent aussi être déduites à l'aide d'un programme informatique simple qui ajuste la courbe théorique calculée à partir de l'équation [2] (appendice 6.2) aux valeurs expérimentales. Bien qu'une solution donnée ne constitue pas une réponse absolue, on peut parvenir à une approximation raisonnable de K_S et de μ_m].

Variabilité des résultats

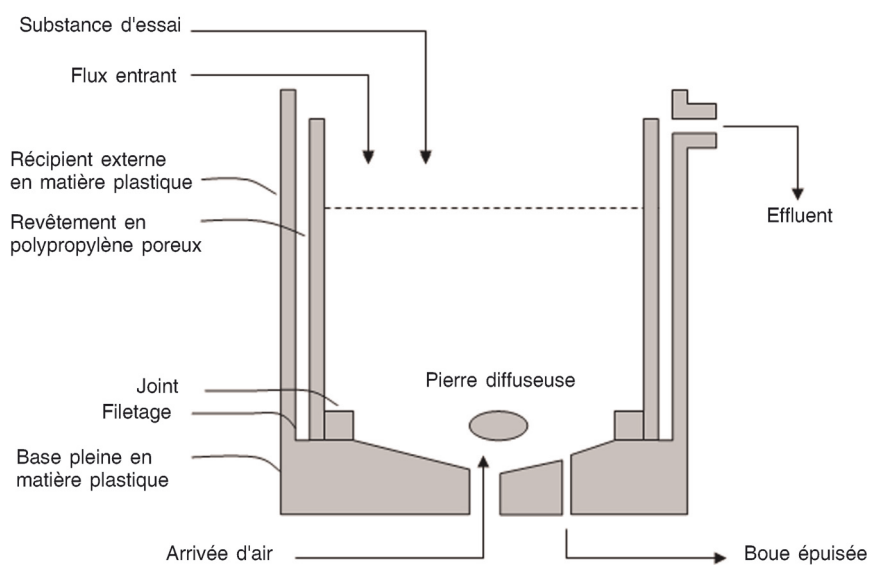
29. Il est fréquent de trouver des paramètres cinétiques variables pour une même substance. On pense que les conditions de croissance des boues et les conditions dans lesquelles s'est déroulé l'essai (comme au paragraphe 5 et dans d'autres essais) ont une incidence marquée sur les résultats. Un aspect de cette variabilité a été examiné par Grady *et al.* (4), qui ont proposé que les termes "effectif" et "intrinsèque" s'appliquent à deux états extrêmes représentant les limites de l'état physiologique qu'une culture peut atteindre au cours d'une expérience cinétique. Si l'état est maintenu durant l'essai, les valeurs du paramètre cinétique reflètent les conditions du milieu dans lequel les micro-organismes ont été prélevés; ces valeurs sont dites "effectives". À l'autre extrême, si les conditions de l'essai autorisent le plein développement du système de synthèse des protéines et donc un taux de croissance maximum, les paramètres cinétiques résultants sont dits "intrinsèques" et ne dépendent que de la nature du substrat et des types de bactéries qui composent la culture. À titre indicatif, on obtiendra des valeurs effectives en appliquant un rapport de la concentration du substrat sur les micro-organismes qui dégradent (S_0/X_0) faible, par exemple de 0,025, et les valeurs intrinsèques apparaîtront avec un rapport élevé, par exemple d'au moins 20. Dans les deux cas, S_0 doit être supérieur ou égal à la valeur applicable de K_S , la constante de demi-saturation.
30. La variabilité et d'autres aspects de la cinétique de biodégradation ont été examinés lors d'une réunion récente du SETAC (5). Qu'elles aient fait l'objet de publications ou qu'il s'agisse de projets, ces études devraient bientôt livrer une image plus claire de la cinétique qui gouverne le traitement des eaux usées dans les stations et permettre ainsi de mieux interpréter les données existantes et d'avancer des conceptions plus pertinentes concernant de futures méthodes d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Birch R.R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.
 - (2) Birch R.R. (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. JAOCS, 61(2): 340-343.
 - (3) Birch R.R. (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.
 - (4) Grady C.P.L., Smets B.F. and Barbeau D.S. (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.
 - (5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales S.G., Feitjel T., King H., Fox K., Verstraete W. 4-6th September 1996. SETAC – Europe, Brussels.
-

Appendice 6.1

Vase poreux avec régulation du TRB



Appendice 6.2

Calcul des constantes cinétiques

1. En supposant que la cinétique de Monod s'applique et compte tenu d'un bilan massique de solides actifs et de substrat dans le système à boues activées (1), les expressions suivantes décrivent l'état stationnaire:

$$\text{ou} \quad \frac{1}{\vartheta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad [1]$$

$$\text{Où:} \quad S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \vartheta_s)}{\vartheta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \quad [2]$$

S_1 = concentration de substrat dans les effluents (mg/l)

K_s = constante de demi-saturation, concentration à laquelle $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = taux de croissance spécifique (d^{-1})

μ_m = valeur maximale de μ_m (d^{-1})

K_d = vitesse de dégradation spécifique des solides actifs (d^{-1})

ϑ_s = temps de rétention moyen des boues, TRB (d)

L'étude de cette équation amène les conclusions suivantes:

- i) La concentration dans les effluents est indépendante de celle qui règne dans les eaux à traiter (S_0); aussi, le pourcentage de biodégradation varie-t-il avec la concentration dans les eaux à traiter, S_0 .
- ii) Le seul paramètre réglé de l'installation qui affecte S_1 est le temps de rétention des boues, ϑ_s .
- iii) Une concentration donnée dans les eaux à traiter, S_0 , correspondra à un temps de rétention critique des boues selon la relation:

$$\text{Où:} \quad \frac{1}{\vartheta_{sc}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad [3]$$

ϑ_{sc} = temps de rétention critique des boues, en dessous duquel les micro-organismes qui dégradent seront expulsés de l'installation.

- iv) Comme les autres paramètres de l'équation [2] sont liés à la cinétique de croissance, la température est susceptible d'affecter la teneur en substrat dans les effluents et l'âge critique des boues, en d'autres termes, le temps de rétention des boues nécessaire pour obtenir un certain degré de traitement augmenterait à mesure que la température diminuerait.

2. Soit un bilan massique de solides dans le système à vase poreux, et en supposant que la concentration des solides dans les effluents de la station, X_2 , est faible comparée à celle du récipient d'aération, X_1 , le temps de rétention des boues s'exprime comme suit:

$$\text{et} \quad \vartheta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \quad [4]$$

$$\text{où:} \quad \vartheta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

où:

V = volume du récipient d'aération (l)

X_1 = concentration des solides dans le récipient d'aération (mg/l)

X_2 = concentration des solides dans l'effluent (mg/l)

Q_0 = débit des eaux à traiter (l/d)

Q_1 = débit des boues épuisées (l/d)

Il est donc possible de régler le temps de rétention des boues sur n'importe quelle valeur présélectionnée en régulant le débit des boues épuisées, Q_1 .

Conclusions:

3. Cet essai vise principalement à permettre de prédire la concentration dans les effluents et, à partir de là, la concentration de la substance d'essai dans les eaux réceptrices.
4. La courbe de S_1 en fonction de ϑ_s autorise parfois une évaluation immédiate du temps de rétention critique des boues, ϑ_{SC} ; voir par exemple la courbe 3 à la figure 1. Si c'est impossible, on peut calculer ϑ_{SC} en même temps que des valeurs approximatives de μ_m et K_s , en traçant S_1 en fonction de $S_1 \cdot \vartheta_s$.

L'équation [1] est reformulée en ces termes:

$$\frac{S_1 \cdot \vartheta_s}{1 + \vartheta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [5]$$

Si K_d est petit, alors $1 + \vartheta_s \cdot K_d \sim 1$ et [5] devient:

$$S_1 \cdot \vartheta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [6]$$

Par la suite, la courbe devrait prendre l'allure d'une droite (voir figure 2) de pente $1/\mu_m$ et intercepter K_s/μ_m ; et $\vartheta_s \sim 1/\mu_m$.

Figure 1

Trois températures; cinq TRB

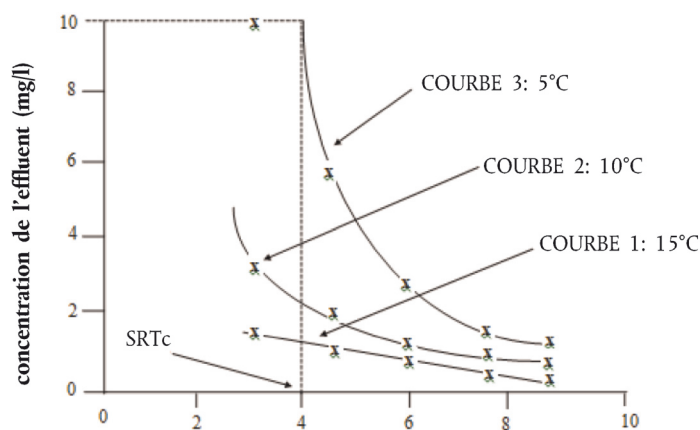
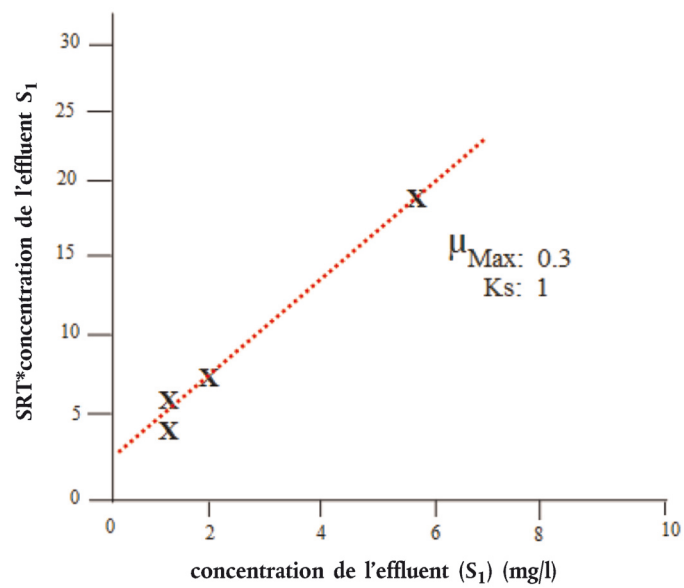


Figure 2

Droite de régression $TRB \cdot S_1$ en fonction de S_1 à $T = 5^\circ\text{C}$



Glossaire

concentration de l'effluent.

courbe.

Appendice 7

ESSAIS RÉALISÉS À FAIBLES CONCENTRATIONS ($\mu\text{g/L}$)

1. De nombreuses substances chimiques sont normalement présentes dans le milieu aquatique, même dans les eaux usées, à de très faibles concentrations ($\mu\text{g/L}$). À de telles teneurs, elles ne servent probablement pas de substrats primaires pour la croissance, et il est plus vraisemblable qu'elles subissent une dégradation en tant que substrats secondaires sans intervenir dans la croissance, parallèlement à diverses substances chimiques carbonées naturelles. Par conséquent, les dégradations de ces substances chimiques ne correspondront pas au modèle décrit à l'appendice 6. De nombreux modèles pourraient les représenter et, dans les conditions qui régissent les systèmes de traitement des eaux usées, celles-ci peuvent probablement se refléter simultanément dans plusieurs modèles. Il faudra entreprendre des recherches bien plus poussées pour élucider ce problème.
2. En attendant, le mode opératoire exposé dans le corps de texte (chapitre C.10-A) peut être suivi, mais il ne s'applique qu'à la biodégradabilité primaire, à des concentrations suffisamment basses ($< 100 \mu\text{g/L}$), et requiert une méthode d'analyse validée. Le pourcentage de biodégradation peut être calculé (voir au paragraphe 54 de la présente méthode d'essai), mais à condition de tenir compte des processus non biologiques (adsorption, volatilité, etc.). L'étude conduite par Nyholm et son équipe (1) (2) sur un cycle de quatre heures dans un système à lit de contact en est un exemple. Ils ont opposé des pseudo-constantes de premier ordre pour cinq substances chimiques ajoutées à des eaux usées synthétiques à raison de 5 à $100 \mu\text{g/L}$ (s'agissant de la biodégradabilité finale, des substances d'essai marquées au ^{14}C peuvent être utilisées). La description d'un procédé n'entre pas dans le cadre de la présente méthode d'essai dans la mesure où aucun ne fait encore l'unanimité, bien qu'une méthode proposée pour la norme ISO 14592 (3) contienne des indications concernant l'emploi de substances marquées au ^{14}C .

Essai de biodégradation en semi-continu à l'aide de boues activées

3. Un essai plus simple en deux étapes a été présenté ultérieurement (4) (5) (6); la méthode en semi-continu à l'aide de boues activées (SCBA) est suivie par des essais cinétiques à court terme pratiqués sur des échantillons prélevés dans les unités SCBA. Les débits de boues épuisées sont connus dans le système SCBA (contrairement à la méthode d'essai originale C.12), qui est alimenté par des eaux usées synthétiques (formule de l'OCDE modifiée) ou par des eaux usées domestiques. Les eaux usées synthétiques ont été modifiées (à cause de la fluctuation du pH et de la mauvaise décantabilité des boues) par addition d'un tampon phosphate, d'un extrait de levure, de chlorure de fer (III) et de sels d'oligo-éléments, et leur DCO a été relevée jusqu'à environ 750 mg/L moyennant une augmentation de la concentration de peptone et d'extrait de viande. Les unités tournaient en cycles de 24 heures: aération pendant 23 heures, épuisement des boues, décantation, enlèvement du surnageant (effluent), suivis par l'adjonction des eaux usées synthétiques et de la substance d'essai jusqu'à $100 \mu\text{g/L}$ (c'est-à-dire à peu près la même concentration que celle appliquée dans l'essai à court terme). Une fois par semaine, on remplace 10 pour cent de la totalité des boues par des boues fraîches, afin de maintenir l'équilibre de la population de micro-organismes.
4. Les concentrations de la substance d'essai sont mesurées au début et à la fin de l'aération, et l'essai est poursuivi jusqu'à ce que l'élimination de la substance d'essai devienne constante, ce qui peut prendre une semaine à plusieurs mois.

Essai à court terme

5. Pratiquer un essai à court terme (8 heures, par exemple), afin de déterminer la pseudo-constante cinétique de premier ordre relative à la dégradation de la substance d'essai dans des boues activées ayant des origines et des évolutions différentes, mais connues. En particulier, prélever des échantillons de boues des réacteurs SCBA – à la fin d'une période d'aération lorsque la concentration de substrat organique est basse – au cours d'un essai d'acclimatation (paragraphe 3, 4). On peut aussi prélever des boues d'une unité SCBA tournant en parallèle et non exposée à la substance d'essai, pour comparaison. Aérer des mélanges de boue et de substance d'essai incorporée à deux ou plusieurs concentrations comprises entre 1 et $50 \mu\text{g/L}$, sans ajouter d'eaux usées synthétiques ni d'autre substrat organique. La substance d'essai restant en solution est mesurée à intervalles réguliers, par exemple toutes les heures, suivant la dégradabilité de la substance, durant une période qui n'excède pas 24 heures. Centrifuger les échantillons avant de les soumettre à une analyse appropriée.

Calculs

6. Les données provenant des unités SCBA servent à calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai (paragraphe 54). Une constante de vitesse moyenne, K_1 (établie en fonction de la concentration des solides en suspension), peut aussi être calculée à partir de la formule suivante:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS (1/\text{g h})$$

Où:

t = durée d'aération (23 h)

C_e = concentration à la fin de la période d'aération ($\mu\text{g/L}$)

C_i = concentration au début de l'aération ($\mu\text{g/L}$)

SS = concentration des solides des boues activées (g/L)

7. Dans l'essai à court terme, tracer la courbe du logarithme de la concentration (%) restante en fonction du temps; la pente de la partie initiale (10-50 pour cent de dégradation) de la courbe est équivalente à K_1 , la pseudo-constante de premier ordre. Établir la constante en fonction de la concentration des solides des boues en divisant la pente par la concentration de ces solides. Le résultat indiqué doit préciser les concentrations initiales de la substance d'essai et des solides en suspension, le temps de rétention des boues, la charge et la source des boues ainsi que, le cas échéant, la préexposition à la substance d'essai.

Variabilité des résultats

8. La variabilité et d'autres aspects de la cinétique de biodégradation ont été examinés lors d'une réunion récente du SETAC (7). Qu'elles aient fait l'objet de publications ou qu'il s'agisse de projets, ces études devraient bientôt livrer une image plus claire de la cinétique qui gouverne le traitement des eaux usées dans les stations et permettre ainsi de mieux interpréter les données existantes et d'avancer des conceptions plus pertinentes concernant de futures méthodes d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Nyholm N., Jacobsen B.N., Pedersen B.M., Poulsen O., Dambourg A. and Schultz B. (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. *Biodegradability. Wat. Res.* 26: 339-353.
- (2) Jacobsen B.N., Nyholm N., Pedersen B.M., Poulsen O., and Ostfeldt P. (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. *Wat. Res.* 27: 1505-1510.
- (3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.
- (4) Nyholm N., Ingerslev F., Berg U.T., Pedersen J.P. and Frimer-Larsen H. (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations *Chemosphere* 33 (5): 851-864.
- (5) Berg U.T. and Nyholm N. (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. *Chemosphere* 33 (4): 711-735.
- (6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.
- (7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, S.G. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th September 1996. SETAC – Europe, Brussels.

C.10-B: Biofilms**INTRODUCTION**

1. Les essais de simulation s'appliquent normalement aux substances chimiques qui ont donné un résultat négatif à l'essai de biodégradabilité immédiate [chapitre C.4-A à F de la présente annexe (9)], mais un résultat positif à l'essai de biodégradabilité intrinsèque. Exceptionnellement, les essais de simulation se pratiquent aussi en vue d'obtenir des informations supplémentaires sur une substance d'essai, en particulier les substances chimiques produites en grandes quantités, et l'on recourt normalement à l'essai de traitement par boues activées (C.10-A). Toutefois, dans certaines circonstances, il y a lieu de connaître certaines données particulières concernant la réaction d'une substance chimique à des méthodes de traitement des eaux usées comportant des biofilms, à savoir des lits à ruissellement ou lits bactériens, des disques biologiques et des lits fluidisés. Différents dispositifs ont été créés à cette fin.
2. Gerike *et al.* (1) ont utilisé de grands lits bactériens en mode couplé à l'échelle pilote. Ces lits occupaient beaucoup d'espace et exigeaient des volumes relativement élevés d'eaux usées domestiques ou synthétiques. Truesdale *et al.* (2) ont décrit des lits plus petits (1,83 m × 0,15 m de diamètre) alimentés par des eaux usées naturelles dépourvues de tensioactifs, mais qui demandaient encore des volumes assez importants. Il ne fallait pas moins de 14 semaines pour qu'un biofilm arrive à "maturité" et 4 à 8 semaines supplémentaires après la première introduction du tensioactif d'essai pour l'acclimatation.
3. Baumann *et al.* (3) ont mis au point un lit beaucoup plus petit à base de polyester "velu" préalablement plongé dans des boues activées, servant de substrat inerte pour le biofilm. La substance d'essai constituait la seule source de carbone et la biodégradabilité était évaluée d'après la mesure du carbone organique dissous (COD) dans les eaux à traiter et les effluents, et la quantité de CO₂ dans les dégagements gazeux.
4. Une approche assez différente a été tentée par Gloyna *et al.* (4), qui ont inventé le réacteur tubulaire rotatif. Ils ont cultivé un biofilm sur la surface interne d'un tube rotatif, sur la superficie connue, en y faisant passer des eaux à traiter qu'ils déversaient au sommet du tube légèrement incliné par rapport à l'horizontale. Le réacteur a servi à étudier la biodégradabilité des tensioactifs (5) ainsi que l'épaisseur optimale du biofilm et la diffusion à travers le film (6). Ces auteurs ont perfectionné le réacteur, notamment pour pouvoir déterminer le CO₂ dans les dégagements gazeux.

5. Le réacteur tubulaire rotatif a été adopté par le Standing Committee of Analysts (Royaume-Uni) comme méthode de référence pour évaluer la biodégradabilité des substances chimiques (7) ainsi que les possibilités de traitement des eaux usées et leur toxicité (8). La méthode décrite ici est simple, concise et reproductible et, de surcroît, ne nécessite que des volumes relativement petits de milieu organique.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Des eaux usées synthétiques ou domestiques et la substance d'essai sont appliquées, séparément ou incorporées, sur la surface interne d'un tube incliné en rotation lente. Une couche de micro-organismes, semblables à ceux présents dans le milieu du biofiltre, se développe sur la surface interne. Le fonctionnement du réacteur est régulé de telle sorte qu'il entraîne une élimination adéquate de la matière organique et, si nécessaire, l'oxydation de l'ammonium.
7. Les effluents du tube sont collectés et décantés et/ou filtrés avant l'analyse du carbone organique dissous (COD) et/ou de la substance d'essai par une méthode spécifique. Les unités témoins, qui ne reçoivent pas la substance d'essai, tournent en parallèle dans les mêmes conditions, à des fins de comparaison. La différence entre les concentrations de COD dans les effluents de l'unité d'essai et de l'unité témoin est imputée par hypothèse à la substance d'essai et à ses métabolites organiques. On compare cette différence à la concentration de la substance d'essai ajoutée (en termes de COD) pour calculer l'élimination de la substance d'essai.
8. Il est normalement possible de distinguer la biodégradation de la bioadsorption par un examen attentif de la courbe d'élimination en fonction du temps. L'observation peut généralement être confirmée par un essai de biodégradabilité immédiate (consommation d'oxygène ou production de dioxyde de carbone) réalisé à l'aide d'un inoculum acclimaté prélevé à la fin de l'essai dans les réacteurs qui reçoivent la substance d'essai.

INFORMATION SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

9. La pureté, la solubilité dans l'eau, la volatilité et les caractéristiques d'adsorption de la substance d'essai doivent être connues pour que l'interprétation des résultats soit correcte.
10. Normalement, les substances chimiques volatiles et peu solubles ne peuvent être mises à l'essai sans précautions particulières (voir appendice 5 du chapitre C.10-A). Il faudrait connaître également la formule chimique développée ou, au moins, empirique, pour calculer les valeurs théoriques et/ou vérifier les valeurs mesurées de paramètres tels que la demande théorique en oxygène (DthO) et le carbone organique dissous (COD).
11. Des données sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes (voir appendice 4 du chapitre C.10-A) peuvent aussi être utiles à la sélection des concentrations d'essai appropriées et essentielles pour l'interprétation correcte de faibles valeurs de biodégradation.

NIVEAUX DE SEUIL

12. À l'origine, la mise sur le marché des tensioactifs était subordonnée à un taux de biodégradation primaire supérieur ou égal à 80 pour cent. Faute d'atteindre un taux de 80 pour cent, on peut mener cet essai de simulation (de confirmation) à l'issue duquel le tensioactif ne sera mis sur le marché que s'il est éliminé à plus de 90 pour cent. En général, avec les produits chimiques, la question d'un résultat d'essai positif ou négatif n'entre pas en jeu, et le pourcentage d'élimination obtenu peut servir à calculer en gros la concentration probable dans l'environnement à introduire dans l'évaluation des risques dus aux substances chimiques. Le pourcentage d'élimination du COD atteint dans plusieurs études sur des substances chimiques pures était supérieur à 90 pour cent pour plus des trois quarts des produits chimiques présentant un degré de biodégradabilité significatif et supérieur à 80 pour cent pour plus de 90 pour cent d'entre eux.

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

13. Pour s'assurer que le mode opératoire est correctement suivi, il est quelquefois utile de tester des substances chimiques dont le comportement est connu. Il s'agit notamment de l'acide adipique, du 2-phénylphénol, du 1-naphthol, de l'acide diphénique, de l'acide 1-naphthoïque.

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS D'ESSAI

14. L'écart-type obtenu par un laboratoire britannique s'élevait à 3,5 % au moment des essais et à 5 % entre les essais (7).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareils

Réacteurs tubulaires rotatifs

15. L'appareil (voir figures 1 et 2 de l'appendice 8) consiste en une batterie de tubes en acrylique de 30,5 cm de long et 5 cm de diamètre interne, supportés par des roulettes entourées de caoutchouc, fixées sur un cadre métallique. Chaque tube s'accroche aux roulettes par un bouchon extérieur de 0,5 cm d'épaisseur environ, et

possède un bourrelet interne de la même épaisseur à l'extrémité supérieure (d'alimentation) pour retenir le liquide; la surface interne a été rendue rugueuse par un tampon de laine à poils épais. Les tubes sont inclinés à un angle d'environ un degré par rapport à l'horizontale pour que le milieu d'essai appliqué sur un tube propre reste en contact avec celui-ci le temps nécessaire. Les roulettes revêtues de caoutchouc sont actionnées par un moteur lent à vitesse variable. La température des tubes est régie par leur installation dans un local à température constante.

16. En enfermant chaque réacteur tubulaire dans un tube légèrement plus grand et fermé par un capuchon en veillant à ce que les connexions soient étanches aux gaz, on peut collecter les dégagements de CO₂ dans une solution alcaline en vue de mesures ultérieures (6).
17. Chaque tube est alimenté en milieu organique et en substance d'essai, le cas échéant, par un réservoir de 20 litres (A) (voir figure 2) pour une période de 24 heures. Si nécessaire, la solution de la substance d'essai peut être dosée séparément. Il existe un orifice de sortie situé près du fond de chaque réservoir connecté par un tuyau fait d'une matière appropriée, par exemple du caoutchouc de silicone, via une pompe péristaltique (B) à un tube en verre ou en acrylique qui s'enfonce sur 2 à 4 cm à l'intérieur de l'extrémité supérieure (d'alimentation) du tube incliné (C). L'effluent s'égoutte ainsi de l'extrémité inférieure du tube incliné dans un autre récipient de stockage (D). L'effluent est décanté ou filtré avant analyse.

Appareil de filtration – centrifugeuse

18. Les échantillons seront filtrés à travers une membrane possédant une porosité adéquate (diamètre d'ouverture nominale de 0,45 µm) qui adsorbe les composés organiques solubles et libère le moins possible de carbone organique. Si les lits utilisés libèrent du carbone organique, il faut les laver soigneusement à l'eau chaude afin d'évacuer le carbone organique lixiviable. Une centrifugeuse tournant à 40 000 m/s² peut remplacer l'appareil de filtration.
19. Matériel d'analyse permettant de déterminer:
 - le rapport carbone organique dissous (COD)/carbone organique total (COT), ou la demande chimique en oxygène (DCO),
 - la substance chimique donnée (CLHP, CG, etc.) s'il y a lieu,
 - le pH, la température, l'acidité, l'alcalinité,
 - l'ammonium, les nitrites et les nitrates, si les essais sont réalisés dans des conditions nitrifiantes.

Eau

20. Eau du robinet renfermant moins de 3 mg/l de COD.
21. Eau distillée ou désionisée contenant moins de 2 mg/l de COD.

Milieu organique

22. Les eaux usées synthétiques, les eaux usées domestiques ou un mélange des deux sont acceptés comme milieu organique. Comme il a été démontré que les eaux usées domestiques employées seules augmentaient souvent le pourcentage d'élimination du COD (dans les unités à boues activées) et entraînaient même la biodégradation de certaines substances chimiques non biodégradées par les eaux usées synthétiques formulées selon l'OCDE, on préconise l'utilisation d'eaux usées domestiques. On mesure la concentration du COD ou de la DCO dans chaque nouveau lot de milieu organique. L'acidité ou l'alcalinité du milieu organique doivent être connues. Il peut être nécessaire de tamponner le milieu organique par un composé approprié (hydrogénocarbonate de sodium ou hydrogénophosphate de potassium) s'il est faiblement acide ou alcalin, pour maintenir le pH à environ 7,5 ± 0,5 dans le réacteur durant l'essai. La quantité de tampon à ajouter et le moment de cette addition seront décidés au cas par cas.

Eaux usées synthétiques

23. Dans chaque litre d'eau du robinet, dissoudre 160 mg de peptone, 110 mg d'extrait de viande, 30 mg d'urée, 28 mg d'hydrogénophosphate de potassium anhydre (K₂HPO₄), 7 mg de chlorure de sodium (NaCl), 4 mg de chlorure de calcium dihydraté (CaCl₂·2H₂O) et 2 mg de sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO₄·7H₂O). Cette eau usée synthétique formulée selon l'OCDE offre un exemple où la concentration moyenne de COD dans les eaux à traiter atteint quelque 100 mg/l. On utilisera en alternance d'autres compositions donnant à peu près la même concentration de COD, plus proches des eaux usées domestiques. Ces eaux usées synthétiques peuvent être confectionnées à base d'eau distillée, sous une forme concentrée, et stockées à environ 1 °C pendant une semaine au maximum. Selon les besoins, diluer avec de l'eau du robinet (ce milieu n'est pas satisfaisant, notamment parce qu'il présente une concentration en azote très élevée et une teneur en carbone relativement faible, mais rien de mieux n'a été suggéré, en dehors d'un supplément de tampon phosphate et de peptone).

Eaux usées domestiques

24. Utiliser des eaux usées qui viennent d'être décantées, recueillies quotidiennement dans une station d'épuration qui reçoit principalement des eaux usées domestiques. Elles doivent être prélevées au niveau du déversoir de la cuve de sédimentation primaire ou dans les eaux à traiter de la station de traitement par boues activées et renfermer très peu de grosses particules. Les eaux usées peuvent être utilisées après plusieurs jours de stockage à environ 4 °C, s'il est prouvé que le COD (ou la DCO) n'a pas diminué de manière significative (c'est-à-dire de moins de 20 pour cent) durant le stockage. Afin de limiter la perturbation du système, il conviendrait d'ajuster le COD (ou la DCO) de chaque nouveau lot avant son utilisation à une valeur constante adéquate, par exemple en le diluant avec de l'eau du robinet.

Lubrifiant

25. Les roulettes de la pompe péristaltique peuvent être lubrifiées avec du glycérol ou de l'huile d'olive: les deux conviennent aux tubes en caoutchouc de silicone.

Solutions mères de la substance d'essai

26. Pour les substances chimiques présentant une solubilité convenable, préparer des solutions mères aux concentrations appropriées (par exemple, 1 à 5 g/l) dans de l'eau désionisée, ou dans la fraction minérale de l'eau usée synthétique. En ce qui concerne les substances chimiques insolubles, se reporter à l'appendice 5 du chapitre C.10-A. La présente méthode n'est pas applicable aux substances chimiques volatiles sans modification préalable des réacteurs tubulaires (paragraphe 16). Déterminer le COD et le carbone organique total (COT) de la solution mère et répéter les mesures à chaque nouveau lot. Si la différence entre le COD et le COT excède 20 pour cent, il faut vérifier l'hydrosolubilité de la substance d'essai. Comparer le COD ou la concentration de la substance d'essai mesurée par une analyse spécifique dans la solution mère à la valeur nominale, pour s'assurer que la récupération est suffisante (elle dépasse normalement 90 pour cent). Vérifier, en particulier pour les dispersions, si le COD peut être utilisé comme paramètre d'analyse ou si seule une technique d'analyse spécifique de la substance d'essai est praticable. Les dispersions imposent la centrifugation des échantillons. Pour chaque nouveau lot, mesurer le COD, la DCO, ou la substance d'essai par une analyse spécifique.
27. Déterminer le pH de la solution mère. Les valeurs extrêmes indiquent que l'addition de la substance est susceptible d'influencer le pH des boues activées dans le système d'essai. Dans ce cas, il faut neutraliser la solution mère à $\text{pH } 7 \pm 0,5$ avec de faibles quantités d'un acide ou d'une base inorganiques, tout en évitant la précipitation de la substance d'essai.

MODE OPÉRATOIRE*Préparation du milieu organique à doser*

28. Nettoyer à fond les récipients destinés à recevoir les eaux à traiter et les effluents ainsi que les tuyaux reliant ces deux récipients, afin de prévenir toute prolifération de micro-organismes, au début de l'essai et tout au long de celui-ci.
29. Utiliser des eaux usées synthétiques (paragraphe 23) préparées le jour même, en diluant dans les proportions requises les solides ou la solution mère concentrée avec de l'eau du robinet. La quantité nécessaire est mesurée dans un cylindre et versée dans un récipient propre destiné à recevoir les eaux à traiter. S'il y a lieu, ajouter la quantité voulue de solution mère de la substance d'essai ou de substance de référence aux eaux usées synthétiques avant la dilution. Si cela est plus approprié, ou nécessaire afin d'éviter des pertes de substance d'essai, préparer à part une solution diluée de la substance d'essai dans un autre récipient et répartir cette dernière dans les tubes inclinés au moyen d'une autre pompe doseuse.
30. En alternance (et de préférence), utiliser des eaux usées domestiques décantées (paragraphe 24) récoltées le jour même si possible.

Fonctionnement des réacteurs tubulaires rotatifs

31. L'évaluation de la substance d'essai demande deux réacteurs tubulaires identiques assemblés dans un local à température constante, normalement à 22 ± 2 °C.
32. Ajuster les pompes péristaltiques de façon à répartir 250 ± 25 ml/h de milieu organique (sans substance d'essai) dans les tubes inclinés, qui tournent à 18 ± 2 tr/min. Lubrifier (paragraphe 25) les tuyaux de la pompe au début de l'essai et régulièrement au cours de celui-ci afin de lui assurer un bon fonctionnement et de prolonger la vie des tuyaux.
33. Régler l'angle d'inclinaison des tubes par rapport à l'horizontale de façon à produire un temps de séjour de l'eau d'alimentation de $125 \pm 12,5$ secondes dans un tube propre. Estimer le temps de rétention en ajoutant un marqueur non biologique (par exemple: NaCl, un colorant inerte) à l'eau d'alimentation: le temps requis pour atteindre la concentration maximale dans l'effluent est censé être le temps de rétention moyen (quand le développement du film est à son maximum, le temps de rétention peut s'accroître jusqu'à environ 30 minutes).
34. On a constaté que ces débits, vitesses et temps donnaient des pourcentages d'élimination adéquats (supérieurs à 80 pour cent) de COD (ou DCO) et engendraient des effluents nitrifiés. Le débit doit être modifié si l'élimination est insuffisante ou s'il y a lieu de simuler le fonctionnement d'une station d'épuration donnée. Dans ce cas, ajuster le débit de dose du milieu organique jusqu'à ce que le fonctionnement du réacteur s'aligne sur celui de la station d'épuration.

Inoculation

35. L'inoculation par exposition à l'air peut suffire à déclencher la croissance des micro-organismes lorsqu'on utilise des eaux usées synthétiques, sinon on ajoutera 1 ml/l d'eaux usées décantées à l'alimentation pendant trois jours.

Mesures

36. Vérifier à intervalles réguliers que les débits de dose et les vitesses de rotation restent dans les limites requises. Mesurer aussi le pH de l'effluent, en particulier s'il devrait y avoir une nitrification.

Échantillonnage et analyse

37. La méthode, la répartition et la fréquence de l'échantillonnage sont choisies en fonction de la finalité de l'essai. Prélever au hasard des échantillons d'eaux à traiter et d'effluents, par exemple, ou récolter des échantillons sur une période plus longue, comprise entre trois et six heures, par exemple. Durant la première période, à savoir en l'absence de substance d'essai, prélever des échantillons deux fois par semaine. Les échantillons sont filtrés à travers des membranes ou centrifugés à quelque 40 000 m/s² pendant environ 15 minutes (paragraphe 18). Il peut être nécessaire de décanter et/ou de filtrer grossièrement les échantillons avant leur filtration à travers la membrane. Déterminer le COD (ou la DCO) au moins deux fois et, selon les besoins, la DBO, l'ammonium, les nitrites et les nitrates.
38. Toutes les analyses doivent être exécutées le plus vite possible après la collecte et la préparation des échantillons. Au cas où les analyses doivent être différées, conserver les échantillons à environ 4 °C à l'obscurité dans des bouteilles pleines et bouchées hermétiquement. S'il y a lieu de stocker les échantillons pendant plus de 48 heures, les conserver par congélation, acidification ou adjonction d'une substance toxique appropriée [par exemple 20 ml/l d'une solution de chlorure de mercure (II) à 10 g/l]. S'assurer que la technique de conservation n'influence pas les résultats de l'analyse.

Période de mise en route

39. Durant cette période, le biofilm superficiel se développe jusqu'à atteindre une épaisseur optimale, ce qui prend normalement environ deux semaines et ne doit pas en dépasser six. L'élimination (paragraphe 44) du COD (ou de la DCO) s'accroît et atteint un plateau. Lorsque le plateau présente la même valeur dans les deux tubes, sélectionner le tube qui servira de témoin pour le restant de l'essai, au cours duquel leur fonctionnement devra conserver les mêmes caractéristiques..

Introduction de la substance d'essai

40. À ce stade, ajouter la substance d'essai dans l'autre réacteur à la concentration requise, ordinairement 10 à 20 mg C/l. Le témoin continue de ne recevoir que le milieu organique.

Période d'acclimatation

41. Poursuivre les analyses bihebdomadaires du COD (ou de la DCO) et, s'il faut évaluer la biodégradabilité primaire, mesurer aussi la concentration de la substance d'essai par une analyse spécifique. Appliquer une période d'acclimatation d'une à six semaines (ou davantage dans des conditions spéciales) après la première adjonction de la substance d'essai. Lorsque le pourcentage d'élimination (paragraphe 43-45) atteint son maximum, déterminer 12 à 15 valeurs valables au cours de la phase plateau sur environ trois semaines, afin d'évaluer le pourcentage d'élimination moyen. L'essai est considéré comme terminé si un degré d'élimination suffisamment élevé a été obtenu. L'essai ne doit normalement pas se prolonger au-delà de 12 semaines après la première introduction de la substance d'essai.

Détachement du film

42. Le brusque détachement de grandes quantités de film excédentaire des tubes ("sloughing") se produit assez régulièrement. On veillera à ce que ce processus n'altère pas la comparabilité des résultats, en laissant les essais couvrir au moins deux cycles complets de croissance et de détachement.

RÉSULTATS ET RAPPORT**Traitement des résultats**

43. Calculer le pourcentage d'élimination de la substance d'essai en termes de COD (ou de DCO) pour chaque évaluation programmée dans le temps à l'aide de la formule suivante:

$$D_t = 100 [C_s - (E - E_0)]/C_s \%$$

où:

D_t = pourcentage d'élimination du COD (ou de la DCO) à l'instant t ;

C_s = concentration de COD (ou DCO) dans les eaux à traiter due à la substance d'essai, estimée de préférence d'après la concentration dans la solution mère et le volume de cette solution ajouté (mg/l);

E = COD (ou DCO) mesurés dans les effluents d'essai à l'instant t (mg/l);

E_o = COD (ou DCO) mesurés dans les effluents témoins à l'instant t (mg/l).

Répéter le calcul pour la substance de référence, le cas échéant.

Résultats du réacteur témoin

44. Le degré d'élimination du COD ou de la DCO (D_B) du milieu organique dans les réacteurs témoins est utile pour évaluer l'activité de biodégradation du biofilm durant l'essai. Calculer le pourcentage d'élimination selon l'équation suivante:

$$D_B = 100 (1 - E_o/C_m) \%$$

où:

C_m = COD (ou DCO) du milieu organique dans les eaux à traiter témoins (mg/l).

45. Calculer l'élimination (D_{ST}) de la substance d'essai, si elle a été mesurée par une méthode d'analyse spécifique, à chaque instant d'évaluation à partir de l'équation suivante:

$$D_{ST} = 100 (1 - S_e/S_i) \%$$

où:

S_i = concentration mesurée ou, de préférence, estimée de la substance d'essai dans les eaux brutes d'essai (mg/l)

S_e = concentration mesurée de la substance d'essai dans les effluents d'essai à l'instant t (mg/l)

Si la méthode d'analyse donne une valeur positive dans les eaux usées non améliorées équivalente à S_c mg/l, calculer le pourcentage d'élimination (D_{SC}) selon la formule suivante:

$$D_{SC} = 100 (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c) \%$$

Expression des résultats de l'essai

46. Porter sur un graphique les pourcentages d'élimination D_t et D_{ST} (ou D_{SC}), s'ils sont disponibles, en fonction du temps (voir appendice 2 du chapitre C.10-A). Prendre la moyenne (arrondie au nombre entier le plus proche) et l'écart-type des 12 à 15 valeurs de D_T (et de D_{ST} , le cas échéant) obtenue au cours de la phase plateau comme pourcentage d'élimination de la substance d'essai. L'allure de la courbe d'élimination permet de tirer certaines conclusions sur les processus d'élimination.

Adsorption

47. Si on observe une élimination substantielle de la substance d'essai en termes de COD au début de l'essai, c'est probablement à cause de l'adsorption de cette substance sur le biofilm. Il devrait être possible de prouver ce phénomène en mesurant la substance d'essai adsorbée sur les solides qui se détachent du film. Il est rare que l'élimination du COD de substances adsorbées demeure élevée tout au long de l'essai; le degré d'élimination est normalement élevé au début, puis décline progressivement jusqu'à une valeur d'équilibre. Si, toutefois, la substance d'essai adsorbée est de nature à acclimater la population de micro-organismes, l'élimination de la substance d'essai en termes de COD augmenterait pour atteindre une valeur de plateau élevée.

Phase de latence

48. Beaucoup de substances d'essai, comme cela se produit dans les essais de sélection statiques, traversent une phase de latence avant que la biodégradation n'opère à plein régime. Durant la phase de latence, les bactéries responsables de la dégradation s'accliment ou s'adaptent et n'éliminent presque pas la substance d'essai; ensuite elles commencent à croître. Après l'achèvement de cette phase, on considère de manière arbitraire que la phase de dégradation débute lorsque 10 pour cent environ de la quantité initiale de la substance d'essai est éliminée (après avoir laissé l'adsorption se produire, le cas échéant). La phase de latence est souvent très variable et peu reproductible.

Phase plateau

49. Le plateau de la courbe d'élimination d'un essai conduit en continu est défini comme la phase au cours de laquelle la dégradation est maximale. La phase plateau doit durer au moins trois semaines et être déterminée grosso modo par 12 à 15 valeurs mesurées valables.

Degré d'élimination moyen de la substance d'essai

50. Calculer la moyenne des valeurs d'élimination D_t (et D_{ST} le cas échéant) de la substance d'essai durant la phase plateau. Arrondie au nombre entier le plus proche (1 pour cent), elle représente le degré d'élimination de la substance d'essai. On recommande également de calculer l'intervalle de confiance à 95 pour cent de la valeur moyenne. Calculer de la même manière le degré moyen (D_B) d'élimination du milieu organique dans le récipient témoin.

Indication de la biodégradation

51. Si la substance d'essai n'est pas adsorbée de façon significative sur le biofilm et que la courbe d'élimination présente le profil typique d'une courbe de biodégradation avec phase de latence, dégradation et plateau (paragraphes 48, 49), l'élimination mesurée est avec certitude attribuable à la biodégradation. Si l'élimination est élevée au début, l'essai de simulation ne permet pas de faire la distinction entre les processus d'élimination biologiques et non biologiques. Dans ces cas-là, comme dans d'autres où la biodégradation suscite des doutes (par exemple si on observe une séparation), analyser les substances d'essai adsorbées sur des échantillons du film ou effectuer des essais de biodégradation statiques (de sélection) supplémentaires fondés sur des paramètres qui attestent clairement des processus biologiques. Il s'agit d'essais reposant sur la consommation d'oxygène (chapitre C.4 de la présente annexe, D, E et F) (9) ou sur la mesure de la production de dioxyde de carbone (chapitre C.4-C de la présente annexe ou méthode de l'espace de tête – ou de l'espace tête) (10); il convient d'utiliser comme inoculum un biofilm préexposé issu du bioréacteur approprié.
52. Si l'élimination du COD et de la substance proprement dite ont été mesurées, des différences significatives entre les pourcentages observés (le premier étant inférieur au second) indiquent que les effluents renferment des produits organiques intermédiaires susceptibles d'être plus difficiles à dégrader; ceux-ci doivent être examinés.

Validité des résultats de l'essai

53. Considérer l'essai comme valable si le degré d'élimination (D_B) du COD ou de la DCO dans les unités témoins est supérieur à 80 pour cent après deux semaines de fonctionnement et qu'aucun phénomène inhabituel n'a été observé.
54. Si une substance de référence facilement biodégradable a été mise à l'essai, le degré de biodégradation doit être supérieur à 90 pour cent et la différence entre des valeurs mesurées en parallèle ne doit pas excéder 5 pour cent. Faute de satisfaire à ces deux critères, réexaminer les méthodes expérimentales et/ou prélever des eaux usées domestiques à une autre source.
55. De même, les différences de valeurs de biodégradation entre deux unités identiques (le cas échéant) traitant une substance d'essai ne doivent pas s'écarter de plus de cinq pour cent. Si ce critère n'est pas rempli, mais que l'élimination est élevée, poursuivre l'analyse pendant trois semaines supplémentaires. Si l'élimination est faible, étudier les effets inhibiteurs de la substance d'essai, s'ils ne sont pas connus, et recommencer l'essai à une concentration plus basse de la substance d'essai, si c'est possible.

Rapport d'essai

56. Le rapport d'essai doit livrer les informations suivantes:

Substance d'essai:

- nature chimique,
- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques.

Conditions d'essai:

- toute modification du système d'essai, notamment si des substances volatiles ou insolubles ont été testées,
- type de milieu organique,
- proportion et nature des déchets industriels dans les eaux usées, si cette information est pertinente et connue,
- méthode d'inoculation,
- solution mère de la substance d'essai – teneurs en COD (carbone organique dissous) et COT (carbone organique total); mode de préparation, dans le cas d'une suspension; concentration(s) d'essai utilisée(s), justification des concentrations de COD qui sortiraient de l'intervalle 10-20 mg/l; méthode d'addition; date de la première adjonction; toute variation de concentration,

- temps de rétention hydraulique moyen (sans croissance); vitesse de rotation du tube, angle d'inclinaison approximatif, si possible,
- détails du détachement du biofilm; moment et intensité,
- température d'essai et gamme de températures,
- techniques d'analyse employées.

Résultats de l'essai:

- toutes les valeurs mesurées: COD, DCO, analyses spécifiques, pH, température, composés azotés, le cas échéant,
- toutes les valeurs calculées de D_t (ou D_{t0}), D_B , D_s présentées sous forme de tableaux et de courbes d'élimination,
- informations sur les phases de latence et de plateau, durée de l'essai, degré d'élimination de la substance d'essai, de la substance de référence (si testée) et du milieu organique (dans l'unité témoin), données statistiques, conclusions sur la biodégradabilité et validité de l'essai,
- examen des résultats.

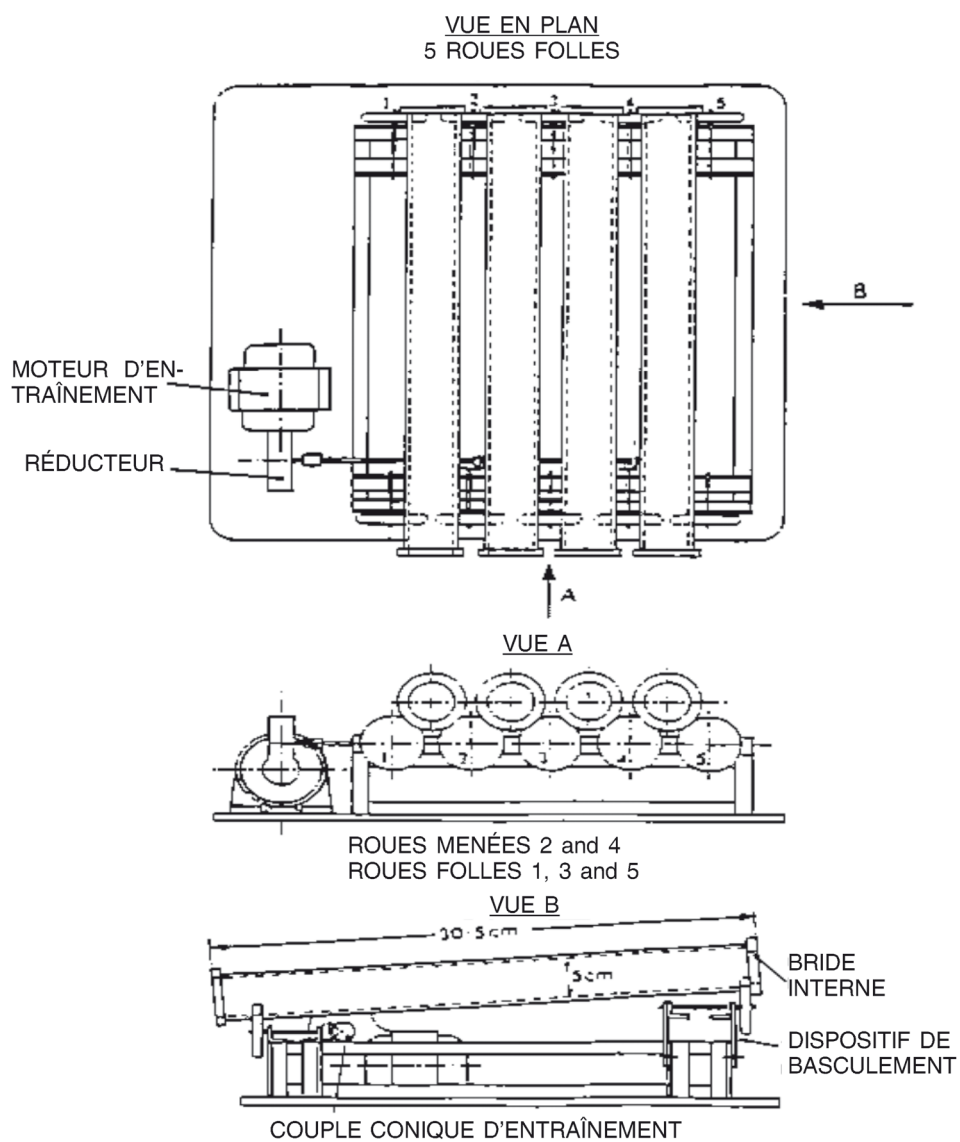
BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Gerike P., Fischer W., Holtmann W. (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. *Wat. Res.* 14: 753-758.
 - (2) Truesdale G.A., Jones K., Vandyke K.G. (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material. *Wat. Waste Tr. J.* 7: 441-444.
 - (3) Baumann U., Kuhn G. and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.
 - (4) Gloyna E.F., Comstock R.F., Renn C.E. (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. *Sewage ind. Waste* 24: 1355-1357.
 - (5) Kumke G.W., Renn C.E. (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. *JAOCS* 43: 92-94.
 - (6) Tomlinson T.G., Snaddon D.H.M. (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. *Int.J. Air Wat. Pollut.* 10: 865-881.
 - (7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.
 - (8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.
 - (9) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité "facile", A-F.
 - (10) ISO 14593 (1998). Qualité de l'eau – Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques. Méthode par analyse du carbone inorganique dans des récipients hermétiquement clos (Essai au CO_2 dans l'espace de tête).
-

Appendice 8

Figure 1

Tubes rotatifs



Glossaire

vue en plan.

vue A/B.

roues menées.

roues folles.

moteur d'entraînement.

réducteur.

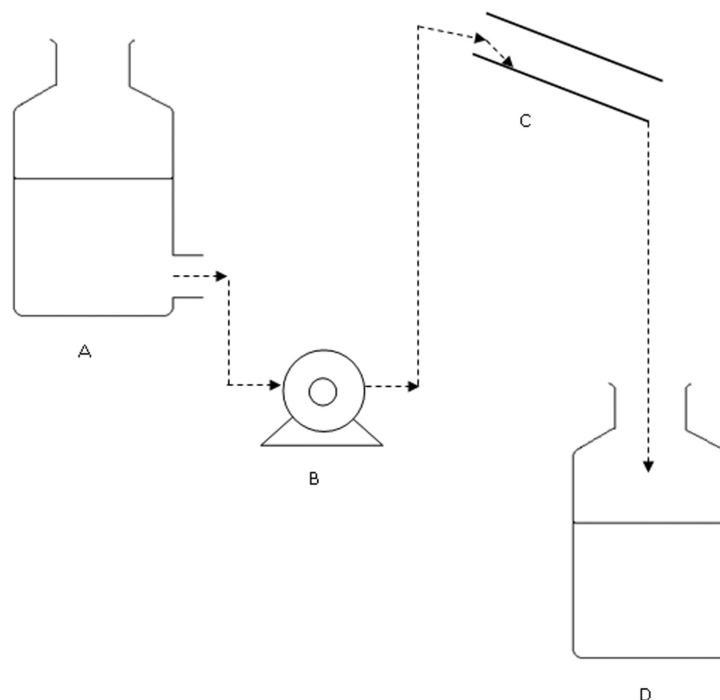
bride interne.

dispositif de basculement.

couple conique d'entraînement.

Figure 2

Schéma de déroulement



A: réservoir.

B: pompe péristaltique.

C: tube rotatif.

D: récipient recueillant les effluents.

DÉFINITIONS:

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Substances chimiques: "il est à noter que le terme 'produit chimique' utilisé dans les accords de la CNUED et dans les documents ultérieurs comprend les substances, les produits, les mélanges, les préparations et tout autre terme utilisé dans les systèmes actuels pour décrire les produits chimiques visés".

10) les chapitres C.27, C.28, C.29 et C.30 sont ajoutés:

«C.27 ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES CHIRONOMES DANS UN SYSTÈME EAU-SÉDIMENT DOPÉ

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 218 (2004) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Cette méthode d'essai est conçue pour évaluer les effets d'une exposition prolongée à des substances chimiques sur des larves de *Chironomus* sp., un diptère vivant dans les sédiments d'eau douce. Elle s'appuie sur des protocoles d'essais de toxicité sur *Chironomus riparius* et *Chironomus tentans*, mis au point en Europe (1) (2) (3) et en Amérique du Nord (4) (5) (6) (7) (8), et soumis à des essais circulaires (1) (6) (9). D'autres espèces de chironomes bien documentées peuvent aussi être employées, par exemple *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).
2. Le scénario d'exposition appliqué dans cette méthode d'essai consiste à introduire la substance d'essai dans le sédiment. La sélection du mode d'exposition dépend de la finalité de l'essai. Le dopage du sédiment vise à simuler l'accumulation de produits chimiques persistants dans le sédiment. Ce chargement s'effectue dans un système expérimental eau-sédiment.
3. En général, les substances à tester sur des organismes vivant dans les sédiments subsistent longtemps dans ce compartiment. Ces organismes peuvent être exposés par diverses voies. L'importance relative de chaque voie d'exposition et le temps pris par chacune d'entre elles pour contribuer à l'effet toxique global dépendent des propriétés physico-chimiques de chaque substance chimique. Dans le cas des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un $\log K_{oe} > 5$) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, l'ingestion d'aliments

contaminés peut constituer une voie d'exposition non négligeable. Afin de ne pas sous-estimer la toxicité des substances fortement lipophiles, on envisagera d'ajouter de la nourriture au sédiment avant l'application de la substance d'essai. La présente méthode d'essai est axée sur l'exposition à long terme, de façon à couvrir toutes les voies d'exposition potentielles. L'essai dure de 20 à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et de 28 à 65 jours pour *C. tentans*. Si l'on a besoin de données à court terme pour un motif précis, par exemple pour étudier les effets d'une substance chimique instable, des récipients supplémentaires, ajoutés au dispositif expérimental, peuvent être retirés après 10 jours d'essai.

4. Les effets observés sont le nombre total d'adultes émergés et temps écoulé jusqu'à l'émergence. Si l'on a besoin de données à court terme, il est recommandé de ne mesurer la survie et la croissance des larves qu'après 10 jours, en ajoutant le nombre nécessaire de récipients supplémentaires.
5. L'utilisation d'un sédiment reconstitué est recommandée en raison de ses avantages par rapport aux sédiments naturels:
 - la variabilité expérimentale est réduite parce que le sédiment reconstitué forme une "matrice normalisée" reproductible; en outre, il n'est plus nécessaire de trouver des sources de sédiments non contaminés et non pollués,
 - les essais peuvent être effectués à n'importe quel moment de l'année, la variabilité saisonnière n'intervenant plus, et il n'est pas nécessaire de traiter préalablement le sédiment afin d'éliminer la faune indigène; l'utilisation de sédiments reconstitués diminue aussi le coût associé à la collecte sur le terrain d'une quantité suffisante de sédiments pour les essais systématiques,
 - les sédiments reconstitués permettent de comparer la toxicité des substances et de les classer en conséquence.
6. L'appendice 1 contient les définitions employées dans la présente méthode d'essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des chironomes au premier stade larvaire sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dans un système sédiment-eau. Une fois la substance d'essai incorporée au sédiment, des larves au premier stade sont introduites dans des béciers où les concentrations d'eau et de sédiment ont été stabilisées. L'émergence des chironomes et leur vitesse de développement sont mesurées à la fin de l'essai. La survie des larves et leur poids peuvent aussi être mesurés après 10 jours si nécessaire (en ajoutant le nombre d'expériences identiques requis). Ces données sont analysées, soit à l'aide d'un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x % de l'émergence ou de la survie des larves ou de leur croissance (par exemple CE_{15} , CE_{50} , etc.), soit par la vérification d'une hypothèse statistique afin de déterminer une CSEO/CMEQ. Cette dernière nécessite une comparaison entre les valeurs efficaces et les valeurs des témoins à l'aide de tests statistiques.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

8. Il faudrait connaître l'hydrosolubilité de la substance d'essai, sa pression de vapeur, son coefficient de partage mesuré ou calculé dans le sédiment et sa stabilité dans l'eau et le sédiment. Il convient de disposer d'une méthode d'analyse fiable pour quantifier la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, dans l'eau des pores et dans le sédiment, et pour laquelle la précision et le seuil de détection sont connus. Il est également utile de connaître la formule structurale et la pureté de la substance d'essai ainsi que son devenir chimique (par exemple sa dissipation, sa dégradation abiotique et biotique, etc.). Des indications complémentaires pour tester les substances se prêtant difficilement à l'essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont fournies à la référence (12).

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

9. Des substances de référence pourront être testées régulièrement afin de démontrer la fiabilité du protocole et des conditions de l'essai. Voici quelques exemples de toxiques de référence ayant fait leurs preuves dans des essais circulaires et des études de validation: lindane, trifluraline, pentachlorophénol, chlorure de cadmium et chlorure de potassium (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. Pour que l'essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies:
 - l'émergence chez les témoins doit atteindre au moins 70 % à la fin de l'essai (1) (6),
 - s'agissant de *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, l'émergence au stade adulte dans les récipients témoins doit avoir lieu entre 12 et 23 jours après leur introduction dans les récipients expérimentaux; *C. tentans* nécessite une période de 20 à 65 jours,

- à la fin de l'essai, le pH et la concentration d'oxygène dissous seront mesurés dans chaque récipient. La concentration d'oxygène devrait atteindre au moins 60 % de la valeur de saturation en air (VSA) à la température appliquée et le pH de l'eau sus-jacente devrait être compris entre 6 et 9 dans tous les récipients expérimentaux,
- la température de l'eau ne devrait pas varier de plus de $\pm 1,0$ °C et pourrait être contrôlée grâce à une chambre isotherme, auquel cas la température de la chambre devra être confirmée à intervalles appropriés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Récipients expérimentaux

11. L'essai se déroule dans des béchers en verre de 600 ml, mesurant 8 cm de diamètre. D'autres récipients peuvent être utilisés à condition qu'ils permettent de garantir une profondeur adéquate d'eau et de sédiment. Le sédiment doit offrir une superficie de 2 à 3 cm² par larve. Le quotient de la profondeur de la couche de sédiment par la profondeur de la couche d'eau sus-jacente doit être égal à 1/4. Les récipients et les autres appareils qui entreront en contact avec le système d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte (par exemple du Téflon).

Sélection des espèces

12. *Chironomus riparius* est l'espèce qui convient le mieux. *Chironomus tentans* peut aussi être utilisé, mais il est plus difficile à manipuler et nécessite une période d'essai plus longue. *Chironomus yoshimatsui* convient également. La méthode de culture de *Chironomus riparius* est détaillée à l'appendice 2. D'autres documents décrivent les conditions de culture des autres espèces: *Chironomus tentans* (4) et *Chironomus yoshimatsui* (11). L'identification de l'espèce est à confirmer avant l'essai, mais n'est pas requise avant chaque essai si les organismes proviennent d'un élevage interne.

Sédiment

13. Il est préférable d'employer un sédiment reconstitué (également dénommé sédiment artificiel ou synthétique). Néanmoins, si l'on opte pour un sédiment naturel, il faudrait le caractériser, au moins quant au pH et à la teneur en carbone organique, (la détermination d'autres paramètres, tels que le rapport C/N et la granulométrie est aussi recommandée) et s'assurer qu'il n'est pas contaminé et n'abrite pas d'autres organismes qui pourraient entrer en compétition avec les chironomes ou les consommer. Avant d'utiliser un sédiment naturel dans un essai de toxicité sur les chironomes, il est également recommandé de le maintenir durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui seront appliquées durant l'essai (conditionnement). Le sédiment reconstitué décrit ci-dessous, basé sur le sol artificiel utilisé dans la méthode d'essai C.8, est recommandé (14) (1) (15) (16):
 - a) 4-5 % (poids sec) de tourbe, avec un pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0; il est important d'utiliser une tourbe sous forme de poudre, finement broyée (dimension des particules ≤ 1 mm) et séchée uniquement à l'air;
 - b) 20 % (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %);
 - c) 75-76 % (poids sec) de sable quartzique (composé en majorité de sable fin, plus de 50 % des particules mesurant entre 50 et 200 μ m);
 - d) ajouter de l'eau désionisée jusqu'à ce que la teneur en humidité du mélange final atteigne 30 à 50 %;
 - e) ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure (CaCO₃) pour ajuster le pH du mélange final composant le sédiment à $7,0 \pm 0,5$. Il convient d'obtenir 2 % ($\pm 0,5$ %) de carbone organique dans le mélange final en y ajoutant les quantités appropriées de tourbe et de sable, comme indiqué en a) et en c).
14. Les sources de tourbe, de kaolin et de sable doivent être connues. On vérifiera que les composants du sédiment ne sont pas contaminés par des substances chimiques (par exemple des métaux lourds, des composés organochlorés, des composés organophosphorés, etc.). Un exemple de préparation de sédiment reconstitué est décrit à l'appendice 3. Les composants peuvent aussi être mélangés à l'état sec, à condition de démontrer qu'après l'ajout de l'eau sus-jacente, les composants du sédiment ne se séparent pas (flottement de particules de tourbe, par exemple) et que la tourbe ou le sédiment sont suffisamment conditionnés.

Eau

15. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable selon les critères spécifiés aux appendices 2 et 4 peut servir à l'essai. Toute eau appropriée, naturelle (eau superficielle ou souterraine), reconstituée (voir appendice 2) ou eau du robinet déchlorée, est acceptable comme eau pour l'élevage et les essais si les chironomes y survivent sur toute la durée de l'élevage et de l'essai sans manifester de signes de stress. Au début de l'essai, le pH de l'eau d'essai se situera entre 6 et 9 et sa dureté totale ne dépassera pas 400 mg/l en

CaCO_3 . Néanmoins, si l'on suspecte une interaction entre les ions qui provoquent la dureté et la substance d'essai, il faudra utiliser une eau moins dure (et ne pas employer le milieu Elendt M4 dans ce cas). Le même type d'eau doit être utilisé tout au long de l'étude. Les caractéristiques de la qualité de l'eau énumérées à l'appendice 4 sont à mesurer au moins deux fois par an ou chaque fois que ses caractéristiques sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées.

Solutions mères – sédiments dopés

16. Les sédiments dopés sont généralement préparés à la concentration souhaitée en ajoutant directement une solution de la substance d'essai au sédiment. Une solution mère de la substance d'essai dissoute dans de l'eau désionisée est mélangée au sédiment reconstitué à l'aide d'un agitateur à rouleaux, d'un mélangeur pour aliments ou mélangée à la main. Si la substance d'essai est peu soluble dans l'eau, elle peut être dissoute dans un volume aussi petit que possible d'un solvant organique adéquat (hexane, acétone ou chloroforme, par exemple). Cette solution est ensuite mélangée à 10 g de sable quartzique fin par récipient d'essai. Il faut attendre que le solvant s'évapore jusqu'à ce qu'il soit totalement éliminé du sable; le sable est ensuite mélangé avec la quantité appropriée de sédiment par béccher. Seuls des agents très volatils peuvent être utilisés pour solubiliser, disperser ou émulsifier la substance d'essai. On n'oubliera pas de tenir compte de la quantité de sable apportée avec le mélange de la substance d'essai et du sable lors de la préparation du sédiment (ce dernier sera préparé avec moins de sable). Il faudra veiller à mélanger complètement la substance d'essai au sédiment et à l'y répartir uniformément. Si nécessaire, on analysera des sous-échantillons afin de déterminer le degré d'homogénéité.

CONCEPTION DE L'ESSAI

17. La conception de l'essai définit le nombre et l'espacement des concentrations expérimentales, le nombre de récipients à chaque concentration et le nombre de larves par récipient. La marche à suivre pour estimer une valeur de CE, la CSEO et mener un essai limite est décrite.

Conduite d'une analyse de régression

18. La concentration efficace (par exemple, CE_{15} , CE_{50}) et la gamme de concentrations dans laquelle l'effet produit par la substance d'essai est d'intérêt doivent être couvertes par les concentrations incluses dans l'essai. Généralement, l'exactitude, et plus particulièrement la validité, de l'estimation des concentrations efficaces (CE_x) s'accroissent lorsque la concentration efficace se situe dans la gamme des concentrations testées. Il faut éviter d'extrapoler des résultats très en dessous de la concentration efficace la plus faible ou au-dessus de la concentration maximale. Il est utile de conduire un essai préliminaire pour déterminer la gamme des concentrations à utiliser (voir paragraphe 27).
19. S'il faut estimer la CE_x , au moins cinq concentrations et trois répétitions par concentration doivent être mises à l'essai. En tout état de cause, il est recommandé de tester suffisamment de concentrations pour obtenir une bonne estimation du modèle. Le facteur séparant les concentrations ne doit pas excéder deux (sauf dans les cas où la courbe dose-effet présente une pente faible). Le nombre de répétitions par traitement peut être diminué si le nombre de concentrations expérimentales entraînant différents effets est augmenté. L'augmentation du nombre de répétitions ou la contraction des intervalles entre les concentrations expérimentales tend à réduire les intervalles de confiance pour l'essai. Le nombre de répétitions sera augmenté s'il y a lieu d'estimer le taux de survie et la croissance des larves après dix jours.

Procédure d'estimation d'une CSEO/CMEO

20. S'il faut estimer la CMEO ou la CSEO, il convient de tester cinq concentrations expérimentales et au moins quatre répétitions par concentration, le facteur séparant les concentrations n'excédant pas deux. Le nombre d'expériences identiques doit être tel qu'il fournit une puissance statistique permettant de détecter une différence de 20 % avec le témoin, au seuil de signification statistique de 5 % ($p = 0,05$). S'agissant de la vitesse de développement, une analyse de la variance (ANOVA) convient généralement, telle que le test de Dunnett ou le test de Williams (17) (18) (19) (20). S'agissant du taux d'émergence, le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haenszel peuvent être utilisés.

Essai limite

21. Si l'essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations n'a engendré aucun effet, un essai limite peut être conduit (une concentration expérimentale et un témoin). L'essai limite se pratique avec une concentration suffisamment élevée pour permettre aux décideurs d'exclure tout effet toxique possible de la substance d'essai et la limite est fixée à une concentration censée ne jamais être atteinte dans les conditions réelles. Une concentration de 1 000 mg/kg (poids sec) est recommandée. Il est généralement nécessaire de mener au moins six répétitions pour les organismes traités et les témoins. Il y a lieu de démontrer que la puissance statistique est suffisante pour détecter une différence de 20 % avec les témoins, au seuil de signification statistique de 5 % ($p = 0,05$). En ce qui concerne l'effet sur la vitesse de développement et sur le poids, le test t constitue une méthode statistique appropriée, si les données respectent les conditions exigées par ce test (normalité, variances homogènes). On pourra recourir au test t à variance inégale ou à un test non paramétrique, tel que le test de Wilcoxon-Mann-Whitney si ces conditions ne sont pas remplies. S'agissant du taux d'émergence, le test exact de Fisher convient.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition*Préparation du système sédiment dopé – eau*

22. La procédure de mélange de la substance d'essai au sédiment décrite dans la méthode d'essai C.8, Toxicité pour les vers de terre, est recommandée pour cet essai (14). Les sédiments dopés sont placés au fond des récipients avant d'y verser l'eau, de façon à obtenir un ratio volumique sédiment-eau de 1/4 (voir paragraphes 11 et 15). La profondeur de la couche de sédiment doit être comprise entre 1,5 et 3 cm. Afin d'éviter la séparation des constituants du sédiment et la resuspension des particules fines pendant le remplissage de la colonne d'eau, on peut recouvrir le sédiment d'un disque en plastique durant cette opération et retirer le disque juste après. D'autres dispositifs conviennent également.
23. Les récipients expérimentaux doivent être couverts (par des plaques de verre, par exemple). On prendra soin de remplacer les volumes d'eau évaporée durant l'étude, le cas échéant, et ce avec de l'eau distillée ou désionisée afin d'empêcher l'accumulation de sels.

Stabilisation

24. Une fois que le sédiment dopé surmonté d'une couche d'eau a été préparé, il est souhaitable de laisser la substance d'essai se répartir entre la phase aqueuse et le sédiment (3) (4) (6) (13), et ce, de préférence, dans les mêmes conditions de température et d'aération que durant l'essai. L'équilibre met de quelques heures à quelques jours à s'établir, voire 4-5 semaines dans de rares cas, selon le sédiment et la substance chimique. Il ne faut pas attendre que l'équilibre soit atteint, car beaucoup de substances risquent de se dégrader durant cette période, mais un temps d'attente de 48 heures est recommandé. Au terme de cette période d'équilibrage, on mesure la concentration de la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, les pores et le sédiment, au moins pour la concentration la plus élevée et la plus faible (voir paragraphe 38). Ces déterminations analytiques de la substance d'essai permettent de calculer le bilan massique et d'exprimer les résultats en fonction des concentrations mesurées.

Introduction des organismes d'essai

25. Quatre à cinq jours avant d'introduire les organismes d'essai dans les récipients, des amas d'œufs sont prélevés dans les cultures et déposés dans de petits flacons contenant du milieu de culture. Un milieu plus ancien issu de la culture mère tout comme un milieu fraîchement préparé peuvent être utilisés. Si ce dernier est utilisé, on ajoutera une petite quantité de nourriture, par exemple des algues vertes et/ou quelques gouttes du filtrat d'une suspension de paillettes pour poissons finement broyées, au milieu de culture (voir appendice 2). Seuls des amas d'œufs fraîchement pondus peuvent être utilisés. Normalement, les larves commencent à éclore quelques jours après la ponte (2 à 3 jours pour *Chironomus riparius* à 20 °C et 1 à 4 jours pour *Chironomus tentans* à 23 °C et *Chironomus yoshimatsui* à 25 °C) et le développement des larves se déroule en quatre stades, dont chacun dure 4 à 8 jours. Cet essai se pratique au premier stade larvaire (2-3 ou 1-4 jours après l'éclosion). Il est possible de vérifier le stade de développement des moucheron d'après la largeur de la capsule céphalique (6).
26. Vingt larves au premier stade, choisies au hasard, sont déposées dans chaque récipient contenant le sédiment dopé et l'eau, à l'aide d'une pipette émoussée. L'aération de l'eau doit être interrompue dès qu'on introduit les larves dans les récipients expérimentaux, et ce durant 24 heures après l'ajout des larves (voir paragraphes 25 et 32). Selon le protocole expérimental suivi (voir paragraphes 19 et 20), le nombre de larves utilisées par concentration s'élève au moins à 60 pour l'estimation d'une valeur de concentration efficace (CE) et à 80 pour la détermination de la CSEO.

Concentrations d'essai

27. Il peut être utile de conduire un essai de détermination de l'ordre de grandeur pour délimiter la gamme de concentrations à appliquer dans l'essai proprement dit. À cet effet, on utilise une série de concentrations largement espacées de la substance d'essai. Afin de reproduire la même densité de surface par chironome que dans l'essai proprement dit, les chironomes sont exposés à chaque concentration de la substance d'essai durant une période permettant d'estimer les concentrations expérimentales appropriées et aucune expérience identique n'est nécessaire.
28. Les concentrations pour l'essai définitif sont choisies en fonction des résultats de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur. Au moins cinq concentrations doivent être appliquées et sélectionnées comme décrit aux paragraphes 18 à 20.

Témoins

29. L'essai inclura le nombre nécessaire de récipients témoins pourvus du sédiment mais exempts de toute substance d'essai (voir paragraphes 19-20). Si la substance d'essai a été appliquée à l'aide d'un solvant (voir paragraphe 16), il convient d'ajouter un témoin dont le sédiment contient également le solvant.

Système expérimental

30. Des systèmes statiques sont utilisés. Des systèmes semi-statiques ou à écoulement continu avec renouvellement intermittent ou continu de l'eau sus-jacente peuvent être utilisés dans des cas exceptionnels, par exemple si les spécifications de la qualité de l'eau deviennent inappropriées pour l'organisme d'expérience ou affectent l'équilibre chimique (si, par exemple, la concentration d'oxygène dissous devient trop basse, la concentration des excréta augmente de façon trop importante ou si des minéraux lessivés à partir du sédiment affectent le pH et/ou la dureté de l'eau). Néanmoins, d'autres méthodes d'amélioration de la qualité de l'eau sus-jacente, telles que l'aération, seront normalement suffisantes et préférables.

Alimentation

31. Les larves ont besoin d'être nourries, de préférence quotidiennement TetraPhyll; ou au moins trois fois par semaine. Durant les dix premiers jours, chaque jeune larve recevra quotidiennement 0,25 à 0,5 mg (0,35-0,5 mg pour *C. yoshimatsui*) de nourriture pour poissons (suspendue dans l'eau ou finement moulu, par exemple TetraMin ou TetraPhyll; voir les détails à l'appendice 2). Il peut être nécessaire d'augmenter légèrement cette quantité pour les larves plus âgées: 0,5-1 mg par larve et par jour devrait suffire pour le reste de l'essai. On diminuera la ration alimentaire de tous les organismes traités et témoins si des champignons se développent ou si des organismes témoins meurent. Si la croissance fongique s'avère impossible à enrayer, l'essai doit être renouvelé. Si l'essai porte sur des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un $\log K_{oc} > 5$) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, la quantité de nourriture nécessaire à la survie et à la croissance naturelle des organismes peut être ajoutée au sédiment reconstitué avant la période de stabilisation. Dans ce cas, la nourriture pour poissons est remplacée par une ration végétale, par exemple 0,5 % (poids sec) de feuilles finement broyées d'ortie (*Urtica dioica*), de mûrier (*Morus alba*), de trèfle blanc ou rampant (*Trifolium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*), par exemple, ou d'un autre matériau végétal (*Cerophyl* ou alpha-cellulose).

Conditions d'incubation

32. L'eau sus-jacente est soumise à une légère aération, mise en route de préférence 24 heures après l'introduction des larves et maintenue jusqu'à la fin de l'essai (il faut veiller à ce que la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 60 % de la valeur de saturation en air). L'air est insufflé à travers une pipette Pasteur en verre fixée 2 à 3 cm au-dessus de la couche de sédiment (une ou quelques bulles par seconde). Si la substance d'essai est volatile, il faudra éventuellement supprimer l'aération.
33. L'essai est mené à température constante ($20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$). Pour *C. tentans* et *C. yoshimatsui*, les températures recommandées s'élèvent respectivement à 23 °C et $25\text{ °C} (\pm 2\text{ °C})$. La photopériode est de 16 heures et l'éclairement compris entre 500 et 1 000 lux.

Durée de l'exposition

34. L'exposition débute avec l'introduction des larves dans les récipients traités et témoins. La durée maximale de l'exposition s'élève à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et à 65 jours pour *C. tentans*. Si les moucheron émergent plus tôt, l'essai peut s'achever au moins cinq jours après l'émergence du dernier adulte témoin.

Observations*Émergence*

35. La durée du développement et le nombre total de moucheron mâles et femelles adultes totalement émergés sont à déterminer. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses.
36. Au moins trois fois par semaine, on vérifiera que les organismes des récipients expérimentaux ne manifestent aucun comportement anormal (sortie du sédiment, nage inhabituelle par exemple) par rapport aux témoins. Chaque jour, durant la période supposée de l'émergence, on comptera le nombre de moucheron émergés et on consignera le sexe et le nombre de moucheron complètement émergés. Après identification, les moucheron sont retirés des récipients. Tout amas d'œufs déposé avant la fin de l'essai doit être recensé puis enlevé afin d'empêcher la réintroduction de larves dans le sédiment. Le nombre de pupes visibles n'ayant pas réussi à émerger est aussi enregistré. Des indications sur la façon de mesurer l'émergence sont données à l'appendice 5.

Croissance et survie

37. S'il faut fournir des données sur la survie et la croissance des larves après 10 jours, des récipients d'essai supplémentaires seront ajoutés dès le début de l'essai, pour pouvoir être utilisés ultérieurement. Le sédiment de ces récipients supplémentaires sera tamisé à travers des mailles de 250 µm pour retenir les larves. La mort est déterminée par deux critères: l'immobilité et l'absence de réaction à un stimulus mécanique. Les larves non récupérées doivent aussi être comptabilisées parmi les mortes (les larves qui sont mortes au début de l'essai ont pu être dégradées par des microbes). Après avoir déterminé le poids sec (sans cendres) des larves survivantes par récipient expérimental, on calcule le poids sec individuel moyen par récipient. Il est utile d'établir à quel stade se trouvent les larves survivantes, et ce d'après la largeur de la capsule céphalique de chaque individu.

Mesures analytiques

Concentration de la substance d'essai

38. Avant le début de l'essai (c'est-à-dire avant l'introduction des larves), on prélève des échantillons du sédiment d'au moins un récipient par traitement, afin de déterminer analytiquement la concentration de la substance d'essai dans le sédiment. Il est recommandé d'analyser, au minimum, des échantillons de l'eau sus-jacente, de l'eau des pores, et du sédiment, au début (voir paragraphe 24) et à la fin de l'essai, et ce de la concentration la plus élevée et d'une concentration plus basse. Les concentrations de la substance d'essai nous renseignent sur le comportement et la répartition de la substance d'essai dans le système eau-sédiment.
39. Lorsqu'on effectue des mesures intermédiaires (par exemple au septième jour) et si l'analyse requiert des échantillons volumineux qui ne peuvent être prélevés des récipients sans influencer le système expérimental, les analyses seront pratiquées sur des échantillons provenant de récipients expérimentaux supplémentaires traités de la même façon (y compris par la présence des organismes d'essai), mais non utilisés pour des observations biologiques.
40. Pour isoler l'eau interstitielle, on recommande de centrifuger les échantillons à 10 000 g et à 4 °C durant 30 minutes. Cependant, s'il est démontré que la substance d'essai ne s'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Avec des échantillons trop petits, il arrive que les concentrations dans l'eau des pores soient impossibles à analyser.

Paramètres physico-chimiques

41. Le pH de l'eau et la température des récipients d'essai doivent être mesurés de façon appropriée (voir paragraphe 10). La dureté de l'eau et la teneur en ammoniac sont mesurées dans les récipients témoins et dans un récipient traité à la concentration la plus élevée, au début et à la fin de l'essai.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

42. Cet essai vise à déterminer l'effet de la substance d'essai sur la vitesse de développement et le nombre total de moucheron mâles et femelles totalement émergés ou, dans le cas de l'essai de 10 jours, les effets sur la survie et le poids des larves. Si rien n'indique que les deux sexes présentent des différences statistiques de sensibilité, les résultats obtenus sur les mâles et les femelles peuvent être regroupés pour l'analyse statistique. Les différences de sensibilité entre les sexes peuvent être jugées statistiquement par un test (de tableau) $\chi^2 - r \times 2$, par exemple. La survie des larves et le poids sec individuel moyen par récipient doivent être déterminés après dix jours, le cas échéant.
43. Il est préférable de calculer les concentrations efficaces, exprimées en fonction du poids sec, à partir des concentrations mesurées dans le sédiment au début de l'essai (voir paragraphe 38).
44. Pour estimer ponctuellement la CE_{50} ou une quelconque CE_x , les statistiques par récipient peuvent être utilisées comme des expériences identiques proprement dites. Lorsqu'on calcule un intervalle de confiance pour une quelconque CE_x , il faut tenir compte de la variabilité entre les récipients ou montrer que celle-ci est négligeable. Si le modèle est ajusté par la méthode des moindres carrés, il convient d'appliquer une transformation des données pour les statistiques par récipient afin d'accroître l'homogénéité de la variance. Toutefois, les valeurs de la CE_x sont à calculer après que les résultats ont été "retransformés" de façon à recouvrer leur valeur originale.
45. Si l'analyse statistique vise à déterminer la CSEO/CME0 par la vérification d'une hypothèse, la variabilité entre les récipients doit être prise en compte, par exemple à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) "emboîtée". Par contre, des tests plus robustes (21) peuvent être utilisés au cas où les hypothèses habituelles de l'analyse de la variance ne se vérifient pas.

Taux d'émergence

46. Le taux d'émergence donne une réponse par tout ou rien et peut être analysé par le test de Cochran-Armitage appliqué de façon régressive si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Dans le cas contraire, un test exact de Fisher ou un test de Mantel-Haenszel avec des valeurs de p corrigées selon Bonferroni-Holm peuvent être employés. S'il s'avère que la variabilité entre expériences identiques à la même concentration est supérieure à ce qu'une distribution binomiale indiquerait (variation souvent qualifiée d'"extra-binomiale"), on appliquera un test plus robuste (Cochran-Armitage ou test exact de Fisher) comme proposé à la référence (21).

La somme des moucheron émergés par récipient, n_e , est déterminée et divisée par le nombre de larves introduites, n_a :

$$TE = \frac{n_e}{n_a}$$

où:

TE = taux d'émergence

n_e = nombre de moucheron émergés par récipient

n_a = nombre de larves introduites par récipient

47. Une variante plus appropriée aux échantillons de grande taille, lorsque la variance est extra-binomiale, consiste à traiter le taux d'émergence comme une réponse continue et à appliquer une méthode telle que le test de William si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Le test de Dunnett convient dans le cas où la relation ne s'avère pas monotone. Ici, on considère qu'un échantillon est de grande taille lorsque le nombre de moucheron émergés et le nombre de chironomes non émergés dépassent chacun cinq, par récipient expérimental.
48. Pour réaliser l'analyse de la variance (ANOVA), il convient d'appliquer aux valeurs de TE une transformation "arcsinus-racine carrée" ou "Freeman-Tukey" afin d'obtenir une distribution proche de la normale et d'égaliser les variances. Le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction de Bonferroni) ou le test de Mantel-Haenszel peuvent être employés lorsqu'on utilise des fréquences absolues. La transformation arcsinus-racine carrée consiste à calculer l'inverse du sinus ($\sin^{-1}$) de la racine carrée du TE .
49. Pour les taux d'émergence, les valeurs de la CE_x sont calculées par une analyse de régression [ou par probit (22), logit, Weibull, des logiciels commerciaux appropriés, etc.]. Si l'analyse de la régression échoue (par exemple, lorsqu'il y a moins de deux réponses partielles), on fait appel à d'autres méthodes non paramétriques telles que la moyenne mobile ou une simple interpolation.

Vitesse de développement

50. La période de développement moyenne représente le temps moyen écoulé entre l'introduction des larves (jour 0 de l'essai) et l'émergence de la cohorte expérimentale de moucheron (pour calculer la période de développement réelle, il faut tenir compte de l'âge des larves au moment de l'introduction). La vitesse de développement est l'inverse de la période de développement (unité: 1/jour) et représente la partie du développement larvaire qui s'effectue par jour. Pour évaluer la toxicité dans les sédiments, il est préférable de choisir la vitesse de développement, car sa variance est plus faible et ses valeurs sont plus homogènes et plus proches d'une distribution normale, en comparaison avec la période de développement. C'est pourquoi les tests paramétriques puissants conviennent mieux à la vitesse de développement qu'à la période de développement. Si la vitesse de développement est traitée comme une réponse continue, les valeurs de la CE_x peuvent être estimées par l'analyse de la régression, par exemple (23), (24).
51. Pour les tests statistiques suivants, le nombre de moucheron observés le jour x sont considérés comme ayant émergé au milieu de l'intervalle de temps compris entre le jour x et le jour $x - 1$ (1 = longueur de l'intervalle d'observation, habituellement 1 jour). La vitesse de développement moyenne par récipient ($\bar{x}$) est calculée comme suit:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

où:

$\bar{x}$: vitesse de développement moyenne par récipient

i : indice de l'intervalle d'observation

m : nombre maximal d'intervalles d'observation

f_i : nombre de moucheron émergés durant l'intervalle d'observation i

n_e : nombre total de moucheron émergés à la fin de l'expérience ($= \sum f_i$)

x_i : vitesse de développement des moucheron émergés durant l'intervalle i

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{jour}_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

où:

jour_i : jour d'observation (compté depuis l'application)

l_i : durée de l'intervalle d'observation I (exprimé en jours, habituellement 1 jour)

Rapport d'essai

52. Le rapport d'essai doit fournir au moins les informations suivantes:

Substance d'essai:

- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (hydrosolubilité, pression de vapeur, coefficient de partage dans le sol (ou dans le sédiment s'il est connu), stabilité dans l'eau, etc.),
- identification chimique (nom courant, nom chimique, formule structurale, numéro CAS, etc.), pureté et méthode d'analyse pour la quantification de la substance d'essai.

Espèce d'essai:

- animal d'essai utilisé: espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage,
- informations sur la manipulation des amas d'œufs et des larves,
- âge des animaux d'expérience au moment où ils ont été déposés dans les récipients expérimentaux.

Conditions expérimentales:

- sédiment utilisé, c'est-à-dire naturel ou reconstitué,
- pour les sédiments naturels: localisation et description du site de prélèvement et notamment, si possible, son histoire en matière de contamination; caractéristiques: pH, teneur en carbone organique, quotient C/N et granulométrie, le cas échéant,
- préparation du sédiment reconstitué: ingrédients et caractéristiques (teneur en carbone organique, pH, humidité, etc. au début de l'essai),
- préparation de l'eau d'essai (si l'eau est reconstituée) et caractéristiques (concentration d'oxygène, pH, conductivité, dureté, etc. au début de l'essai),
- profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente,
- volume de l'eau sus-jacente et de l'eau des pores; poids du sédiment humide avec et sans eau des pores,
- récipients expérimentaux (matériau et dimension),
- méthode de chargement du sédiment: concentrations expérimentales appliquées, nombre d'expériences identiques et utilisation d'un solvant, le cas échéant,
- phase de stabilisation du système sédiment dopé-eau: durée et conditions,
- conditions d'incubation: température, cycle et intensité de lumière, aération (fréquence et intensité),
- informations détaillées sur la nourriture: type, préparation, quantité et régime d'administration.

Résultats:

- concentrations d'essai nominales, concentrations d'essai mesurées et résultats de toutes les analyses conduites pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans le récipient expérimental,
- qualité de l'eau dans les récipients expérimentaux: pH, température, oxygène dissous, dureté et teneur en ammoniac,
- remplacement de l'eau d'essai évaporée, le cas échéant,
- nombre de moucheron mâles et femelles émergés par récipient et par jour,
- nombre de larves non émergées sous la forme de moucheron par récipient,
- poids sec individuel moyen des larves par récipient, et par stade larvaire, s'il y a lieu,
- pourcentage d'émergence par expérience identique et concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucheron mâles et femelles),

- vitesse de développement moyenne des moucheron totalement émergés par expérience identique et concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucheron mâles et femelles),
- estimation des effets toxiques observés, par exemple CE_x (et intervalles de confiance associés), CSEO et/ou CMEQ, et méthodes statistiques employées pour les déterminer,
- analyse des résultats, y compris les répercussions sur les résultats d'un écart éventuel à la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R. *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.
- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., and Kirby R.S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.
- (10) Sugaya Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.
- (11) Kawai K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.
- (12) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations, n° 23.
- (13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.
- (14) Méthode d'essai C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre.
- (15) Suedel B.C. and J.H. Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.
- (16) Naylor C. and C. Rodrigues (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

-
- (17) Dunnett C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.
- (18) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491.
- (19) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.
- (20) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.
- (21) Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.
- (22) Christensen E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.
- (23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.
- (24) Slob W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.
-

Appendice 1

DÉFINITIONS

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai:

Le **sédiment reconstitué**, ou artificiel ou synthétique, désigne le mélange de matériaux utilisés pour reproduire au mieux les composants physiques d'un sédiment naturel.

L'**eau sus-jacente** est l'eau surmontant le sédiment dans le récipient expérimental.

L'**eau interstitielle**, ou l'eau des pores, se réfère à l'eau qui occupe les vides laissés entre le sédiment et les particules de sol.

Le **sédiment dopé** est un sédiment auquel on a ajouté la substance d'essai.

Une **substance d'essai** est toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Appendice 2

Recommandations pour la culture de *Chironomus riparius*

1. Les larves de *Chironomus* peuvent être élevées dans des cristallisoirs ou de grands récipients. Du sable quartzique fin est déposé en couche mince (environ 5 à 10 mm d'épaisseur) sur le fond du récipient. Le Kieselguhr (par exemple l'art. 8117 de Merck) convient aussi comme substrat (une couche encore plus mince de quelques millimètres à peine suffit). Une eau de qualité appropriée, profonde de plusieurs centimètres, vient ensuite recouvrir le substrat. En cas d'évaporation, le niveau d'eau doit toujours être ramené à sa hauteur initiale, afin de prévenir toute dessiccation. L'eau peut être remplacée, si nécessaire. Une légère aération est fournie. Les récipients d'élevage des larves doivent être placés dans des cages appropriées, afin d'empêcher la fuite des adultes émergeant. La cage sera suffisamment grande pour permettre aux adultes émergés d'essaimer, sans quoi la copulation risque de ne pas avoir lieu (dimensions minimales: 30 × 30 × 30 cm).
2. Les cages doivent être gardées à température ambiante, ou à 20 ± 2 °C si elles sont installées dans une chambre à ambiance constante, avec une photopériode de 16 heures de lumière (intensité: environ 1 000 lux) et 8 heures d'obscurité. Une humidité relative de l'air inférieure à 60 % serait susceptible d'empêcher la reproduction.

Eau de dilution

3. Toute eau naturelle ou reconstituée appropriée peut être utilisée. L'eau d'un puits, de l'eau du robinet déchlorée et un milieu artificiel (Elendt "M4" ou "M7", voir ci-après) sont souvent utilisés. L'eau doit être aérée avant emploi. Si nécessaire, on peut renouveler l'eau de culture en versant ou en siphonnant soigneusement l'eau usée des récipients expérimentaux, sans détruire les tubes des larves.

Alimentation des larves

4. Les larves de *Chironomus* reçoivent des paillettes pour poissons (TetraMin®, TetraPhyll® ou une autre marque déposée équivalente), à raison d'environ 250 mg par récipient et par jour. Cette nourriture peut être administrée sous la forme d'une poudre moulue à sec ou d'une suspension dans l'eau: 1,0 g de paillettes ajoutées à 20 ml d'eau de dilution et agitées de façon à obtenir un mélange homogène. Cette préparation peut être administrée à raison d'environ 5 ml par récipient et par jour (agiter avant emploi). Les larves plus âgées peuvent en recevoir plus.
5. La nourriture est ajustée en fonction de la qualité de l'eau. Si le milieu de culture devient trouble, il convient de réduire la ration. Les quantités de nourriture données sont soigneusement notées. Un manque de nourriture fera émigrer les larves vers la colonne d'eau, tandis qu'un excès de nourriture intensifiera l'activité microbienne et abaissera la concentration d'oxygène. Ces deux conditions sont susceptibles de ralentir la croissance des organismes.
6. Certaines cellules d'algues vertes (*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) peuvent aussi être ajoutées lors de la préparation de nouveaux récipients de culture.

Alimentation des adultes émergents

7. Certains expérimentateurs ont suggéré de nourrir les adultes émergés au moyen d'un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucrose saturée.

Émergence

8. À 20 ± 2 °C, les adultes commencent à émerger des récipients d'élevage des larves après environ 13 à 15 jours. Il est facile de distinguer les mâles d'après leurs antennes plumeuses.

Amas d'œufs

9. Dès que des adultes sont présents dans la cage d'élevage, il faut vérifier trois fois par semaine, dans tous les récipients d'élevage de larves, si des amas d'œufs gélatineux n'ont pas été déposés. Le cas échéant, les amas d'œufs doivent être soigneusement enlevés et transférés dans un petit récipient contenant un échantillon de l'eau d'élevage. Les amas d'œufs servent à préparer un nouveau récipient de culture (2 à 4 amas d'œufs par récipient, par exemple) ou à pratiquer des essais de toxicité.
10. Les larves au premier stade devraient éclore après 2-3 jours.

Préparation de nouveaux récipients de culture

11. Une fois que les cultures ont été lancées, il devrait être possible de préparer un nouveau récipient de culture de larves, une fois par semaine ou moins souvent, suivant les besoins de l'essai, et de retirer les récipients plus anciens après que les moucheron adultes ont émergé. Ce système permet d'obtenir régulièrement un contingent d'adultes, avec une organisation minimale.

Préparation des solutions d'essai "M4" et "M7"

12. Elendt (1990) a décrit le milieu "M4". Le milieu "M7" est préparé comme le milieu "M4", sauf pour les substances reprises au tableau 1, dont les concentrations sont quatre fois plus faibles dans le milieu "M7" que dans le milieu "M4". Une publication sur le milieu "M7" est en préparation (Elendt, communication personnelle). La solution d'essai ne doit pas être préparée selon les instructions d'Elendt et Bias (1990), car les concentrations de $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 et K_2HPO_4 indiquées pour la préparation des solutions mères ne conviennent pas.

Préparation du milieu "M7"

13. Chaque solution mère (I) est préparée séparément et une solution mère combinée (II) est préparée à partir de ces solutions mères (I) (voir tableau 1). Cinquante millilitres de la solution mère combinée (II) additionnés de la quantité de chaque solution mère de macronutriments indiquée au tableau 2 sont amenés à 1 litre avec de l'eau désionisée pour préparer le milieu "M7". On prépare une solution mère de vitamines en ajoutant trois vitamines à de l'eau désionisée, comme indiqué au tableau 3 et on verse 0,1 ml de la solution mère combinée de vitamines au milieu "M7" final, peu avant l'emploi (la solution mère de vitamines est stockée congelée par petites aliquotes). Le milieu est aéré et stabilisé.

BIBLIOGRAPHIE:

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*. Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

Tableau 1

Solutions mères d'éléments en traces pour les milieux M4 et M7

Solutions mères (I)	Quantité (mg) pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée	Pour préparer la solution mère combinée (II): mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions mères (I) et compléter à 1 litre avec de l'eau désionisée		Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 ⁽¹⁾	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl ⁽¹⁾	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl ⁽¹⁾	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ⁽¹⁾	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl_2	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ^{(1) (2)}	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ^{(1) (2)}	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ Ces substances sont dosées différemment en M4 et M7, comme indiqué plus haut.

⁽²⁾ Ces solutions sont préparées séparément, puis mélangées et autoclavées immédiatement après.

Tableau 2

Solutions mères de macronutriments pour les milieux M4 et M7

	Quantité (mg) pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée	Quantités de solutions mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions expérimentales M4 et M7 (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	293 800	1,0	293,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO_3	64 800	1,0	64,8
$\text{NaSiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	50 000	0,2	10,0
NaNO_3	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

Tableau 3

Solution mère de vitamines pour les milieux M4 et M7. Les trois solutions de vitamines seront mélangées de façon à ne former qu'une solution mère de vitamines

	Quantité pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantité de solution mère de vitamines ajoutée pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions d'essai M4 et M7 (mg/l)
Hydrochlorure de thiamine	750	0,1	0,075
Cyanocobalamine (B12)	10	0,1	0,0010
Biotine	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAPHIE:

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

Appendice 3

PRÉPARATION DU SÉDIMENT RECONSTITUÉ

Composition du sédiment

Le sédiment sera reconstitué comme suit:

Ingrédient	Caractéristiques	% du sédiment poids sec
Tourbe	Tourbe de sphaigne, pH aussi proche que possible de 5,5-6,0, pas de résidus de plantes visibles, finement broyée, particules (≤ 1 mm) et séchée à l'air	4 - 5
Sable quartzique	Dimension des particules: > 50 % des particules doivent mesurer entre 50 et 200 μm	75 - 76
Argile kaolinique	Taux de kaolinite ≥ 30 %	20
Carbone organique	Ajusté par l'addition de tourbe et de sable	2 ($\pm 0,5$)
Carbonate de calcium	CaCO_3 , pulvérisé, chimiquement pur	0,05 - 0,1
Eau	Conductivité ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$	30 - 50

Préparation

La tourbe est séchée à l'air et broyée en poudre fine. Une suspension de la quantité requise de poudre de tourbe dans de l'eau désionisée est préparée à l'aide d'un homogénéisateur à haute performance. Le pH de cette suspension est ajusté à $5,5 \pm 0,5$ avec du CaCO_3 . La suspension est conditionnée durant au moins deux jours en l'agitant doucement à 20 ± 2 °C, afin de stabiliser le pH et d'établir une flore microbienne stable. Le pH est vérifié à nouveau; il devrait atteindre $6,0 \pm 0,5$. Ensuite la suspension de tourbe est mélangée avec les autres ingrédients (sable et argile kaolinique) et de l'eau désionisée pour former un sédiment homogène avec une teneur en eau de 30 à 50 % du poids sec du sédiment. Le pH du mélange final est encore mesuré et ajusté à 6,5-7,5 avec du CaCO_3 , si nécessaire. On prélève des échantillons de sédiment afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Ensuite, avant d'utiliser le sédiment reconstitué dans l'essai de toxicité sur les chironomes, il est recommandé de le conditionner durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui seront appliquées durant l'essai subséquent.

Stockage

Les ingrédients secs destinés à la préparation du sédiment artificiel peuvent être entreposés dans un endroit sec et frais, à température ambiante. Le sédiment reconstitué (humide) ne doit pas être stocké avant son utilisation dans l'essai. Il doit être utilisé immédiatement après la période de conditionnement de sept jours qui achève sa préparation.

BIBLIOGRAPHIE:

Chapitre C.8 de la présente annexe: Toxicité pour les vers de terre.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

Appendice 4

Caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable

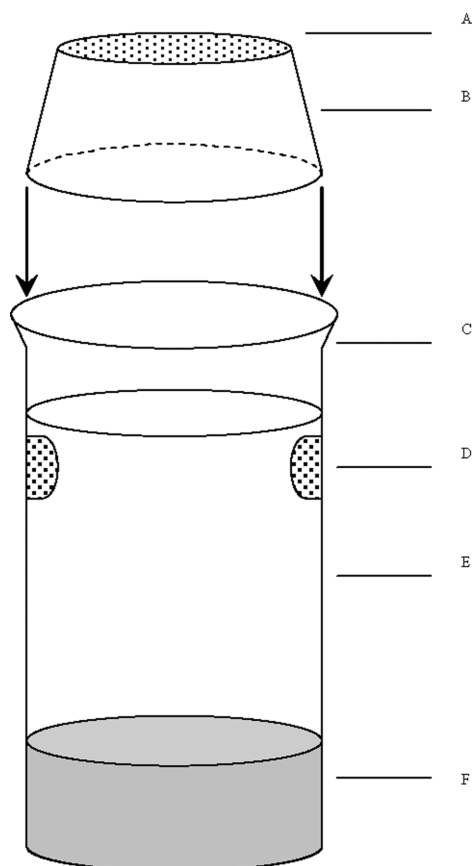
Substance	Concentrations
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Dureté en CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Totalité des pesticides organophosphorés	< 50 ng/l
Totalité des pesticides organochlorés et des biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

(*) S'il risque d'y avoir une interaction entre les ions qui provoquent la dureté de l'eau et la substance d'essai, il convient d'utiliser une eau moins dure (auquel cas, le milieu Elendt M4 ne pourra pas être utilisé).

Appendice 5

Conseils pour suivre l'émergence des larves de chironomes

Les béciers expérimentaux sont coiffés par des pièges à émergence, du 20^e jour jusqu'à la fin de l'essai. Le schéma ci-dessous illustre un exemple de piège:



A: toile de nylon.

B: coupelles en plastique renversées.

C: bécier expérimental sans bec.

D: ouvertures recouvertes de toile par où s'effectuent les échanges.

E: eau.

F: sédiment.

C. 28. ESSAI DE TOXICITÉ SUR LES CHIRONOMES DANS UN SYSTÈME EAU CHARGÉE-SÉDIMENT**INTRODUCTION**

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 219 de l'OCDE (2004) pour les essais de produits chimiques. Elle est conçue pour évaluer les effets d'une exposition prolongée à des substances chimiques sur des larves de *Chironomus* sp., un diptère vivant dans les sédiments d'eau douce. Elle s'inspire principalement de la ligne directrice du BBA, dans laquelle l'exposition s'effectue à l'aide d'un système expérimental sédiment-eau, composé de sol artificiel et d'une colonne d'eau (1). Elle tient compte également des protocoles d'essais de toxicité sur *Chironomus riparius* et *Chironomus tentans*, mis au point en Europe et en Amérique du Nord (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) et soumis à des essais circulaires (1) (6) (9). D'autres espèces de chironomes bien documentées peuvent aussi être employées, par exemple *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).
2. Le scénario d'exposition appliqué dans la présente méthode d'essai consiste à introduire la substance d'essai dans l'eau. La sélection du scénario d'exposition dépend de la finalité de l'essai. Le scénario d'exposition qui consiste à doper la colonne d'eau, vise à simuler des pertes par dispersion lors de l'épandage de pesticides et couvre le pic de concentrations initial dans l'eau interstitielle. Il s'applique également à d'autres types d'exposition (notamment des fuites de produits chimiques), à l'exclusion des processus d'accumulation d'une durée supérieure à celle de l'essai.

3. En général, les substances à tester sur des organismes vivant dans les sédiments subsistent longtemps dans ce compartiment. Ces organismes peuvent être exposés par diverses voies. L'importance relative de chaque voie d'exposition et le temps pris par chacune d'entre elles pour contribuer à l'effet toxique global dépendent des propriétés physico-chimiques de chaque substance chimique. Dans le cas des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un $\log K_{oe} > 5$) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, l'ingestion d'aliments contaminés peut constituer une voie d'exposition non négligeable. Afin de ne pas sous-estimer la toxicité des substances fortement lipophiles, on envisagera d'ajouter de la nourriture au sédiment avant l'application de la substance d'essai. La présente méthode d'essai est axée sur l'exposition à long terme, de façon à couvrir toutes les voies d'exposition potentielles. L'essai dure de 20 à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et de 28 à 65 jours pour *C. tentans*. Si l'on a besoin de données à court terme pour un motif précis, par exemple pour étudier les effets de substances chimiques instables, des récipients supplémentaires, ajoutés au dispositif expérimental, peuvent être retirés après 10 jours d'essai.
4. Les effets mesurés sont le nombre total d'adultes émergés et temps écoulé jusqu'à l'émergence. Si l'on a besoin de données à court terme, il est recommandé de ne mesurer la survie et la croissance des larves qu'après 10 jours, en ajoutant le nombre nécessaire de récipients supplémentaires.
5. L'utilisation d'un sédiment reconstitué est recommandée en raison de ses avantages par rapport aux sédiments naturels:
 - la variabilité expérimentale est réduite parce que le sédiment reconstitué forme une "matrice normalisée" reproductible; en outre, il n'est plus nécessaire de trouver des sources de sédiments non contaminés et non pollués,
 - les essais peuvent être effectués à n'importe quel moment de l'année, la variabilité saisonnière n'intervenant plus et il n'est pas nécessaire de traiter préalablement le sédiment afin d'éliminer la faune indigène; l'utilisation de sédiments reconstitués diminue aussi le coût associé à la collecte sur le terrain d'une quantité suffisante de sédiments pour les essais systématiques,
 - les sédiments reconstitués permettent de comparer la toxicité des substances et de les classer en conséquence; les essais pratiqués sur des sédiments naturels et artificiels ont fourni des données de toxicité comparables pour plusieurs substances chimiques (2).
6. L'appendice 1 contient les définitions applicables à la présente méthode d'essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des chironomes au premier stade larvaire sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dans un système sédiment-eau. L'essai débute par l'introduction de larves au premier stade dans les béciers expérimentaux contenant le système sédiment-eau et l'ajout de la substance d'essai à l'eau. L'émergence des chironomes et leur vitesse de développement sont mesurées à la fin de l'essai. La survie des larves et leur poids peuvent aussi être mesurés après 10 jours si nécessaire (en ajoutant le nombre d'expériences identiques requis). Ces données sont analysées, soit à l'aide d'un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x % de l'émergence ou de la survie des larves ou de leur croissance (par exemple CE_{15} , CE_{50} , etc.), soit par la vérification d'une hypothèse statistique afin de déterminer une CSEO/CMEQ. Cette dernière requiert une comparaison entre les valeurs efficaces et les valeurs des témoins à l'aide de tests statistiques.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

8. Il faudrait connaître l'hydrosolubilité de la substance d'essai, sa pression de vapeur, son coefficient de partage mesuré ou calculé dans le sédiment et sa stabilité dans l'eau et le sédiment. Il convient de disposer d'une méthode d'analyse fiable pour quantifier la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, l'eau interstitielle et le sédiment, et pour laquelle la précision et le seuil de détection sont connus. Il est également utile de connaître la formule structurale et la pureté de la substance d'essai ainsi que son devenir chimique (par exemple dissipation, dégradation abiotique et biotique, etc.). Des indications complémentaires pour tester les substances se prêtant difficilement à l'essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont fournies à la référence (12).

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

9. Des substances de référence pourront être testées régulièrement pour démontrer la fiabilité du protocole et des conditions de l'essai. Voici quelques exemples de toxiques de référence ayant fait leurs preuves dans des essais circulaires et des études de validation: lindane, trifluraline, pentachlorophénol, chlorure de cadmium et chlorure de potassium (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. Pour que l'essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies:
 - l'émergence chez les témoins doit atteindre au moins 70 % à la fin de l'essai (1) (6),

- s'agissant de *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, l'émergence au stade adulte dans les récipients témoins doit avoir lieu entre 12 et 23 jours après leur introduction dans les récipients expérimentaux; *C. tentans* nécessite une période de 20 à 65 jours,
- à la fin de l'essai, le pH et la concentration d'oxygène dissous seront mesurés dans chaque récipient. La concentration d'oxygène devrait atteindre au moins 60 % de la valeur de saturation en air (VSA) à la température appliquée et le pH de l'eau sus-jacente devrait être compris entre 6 et 9 dans tous les récipients expérimentaux,
- la température de l'eau ne devrait pas varier de plus de $\pm 1,0$ °C et pourrait être contrôlée grâce à une chambre isotherme, auquel cas la température de la chambre devra être confirmée à intervalles appropriés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Récipients expérimentaux

11. L'essai se déroule dans des béchers en verre de 600 ml, mesurant 8 cm de diamètre. D'autres récipients peuvent être utilisés à condition qu'ils permettent de garantir une profondeur adéquate d'eau et de sédiment. Le sédiment doit offrir une superficie de 2 à 3 cm² par larve. Le quotient de la profondeur de la couche de sédiment par la profondeur de la couche d'eau sus-jacente doit être égal à 1/4. Les récipients et les autres appareils qui entreront en contact avec le système d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte (par exemple du Téflon).

Sélection des espèces

12. *Chironomus riparius* est l'espèce qui convient le mieux. *Chironomus tentans* peut aussi être utilisé, mais il est plus difficile à manipuler et nécessite une période d'essai plus longue. *Chironomus yoshimatsui* convient également. La méthode de culture de *Chironomus riparius* est détaillée à l'appendice 2. D'autres documents décrivent les conditions de culture des autres espèces: *Chironomus tentans* (4) et *Chironomus yoshimatsui* (11). L'identification des espèces est à confirmer avant l'essai, mais n'est pas requise avant chaque essai si les organismes proviennent d'un élevage interne.

Sédiment

13. Il est préférable d'employer un sédiment reconstitué (également dénommé sédiment artificiel ou synthétique). Néanmoins, si l'on opte pour un sédiment naturel, il faudrait le caractériser, au moins quant au pH et à la teneur en carbone organique (la détermination d'autres paramètres, tels que le rapport C/N et la granulométrie est aussi recommandée), et s'assurer qu'il n'est pas contaminé et n'abrite pas d'autres organismes qui pourraient entrer en compétition avec les chironomes ou les consommer. Avant d'utiliser un sédiment naturel dans un essai de toxicité sur les chironomes, il est également recommandé de le maintenir durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui seront appliquées durant l'essai (conditionnement). Le sédiment reconstitué décrit ci-dessous, basé sur le sol artificiel utilisé dans la méthode d'essai C.8 est recommandé (14) (1) (15) (16):
 - a) 4-5 % (poids sec) de tourbe, avec un pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0; il est important d'utiliser une tourbe sous forme de poudre, finement broyée (dimension des particules ≤ 1 mm) et séchée uniquement à l'air;
 - b) 20 % (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %);
 - c) 75-76 % (poids sec) de sable quartzique (composé en majorité de sable fin, plus de 50 % des particules mesurant entre 50 et 200 μ m);
 - d) ajouter de l'eau désionisée jusqu'à ce que la teneur en humidité du mélange final atteigne 30 à 50 %;
 - e) ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure (CaCO₃) pour ajuster le pH du mélange final de sédiments à $7,0 \pm 0,5$;
 - f) il convient d'obtenir 2 % ($\pm 0,5$ %) de carbone organique dans le mélange final en y ajoutant les quantités appropriées de tourbe et de sable, comme indiqué en a) et en c).
14. Les sources de tourbe, d'argile kaolinique et de sable doivent être connues. On vérifiera que les composants du sédiment ne sont pas contaminés par des substances chimiques (par exemple des métaux lourds, des composés organochlorés, organophosphorés, etc.). Un exemple de préparation de sédiment reconstitué est décrit à l'appendice 3. Les composants peuvent aussi être mélangés à l'état sec, à condition de démontrer qu'après l'ajout de l'eau sus-jacente, les composants du sédiment ne se séparent pas (flottement de particules de tourbe, par exemple) et que la tourbe ou le sédiment sont suffisamment conditionnés.

Eau

15. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable selon les critères spécifiés aux appendices 2 et 4 convient à l'essai. Toute eau appropriée, naturelle (eau superficielle ou souterraine), reconstituée (voir appendice 2) ou eau du robinet déchlorée, est acceptable comme eau pour l'élevage et les essais si les chironomes y survivent sur toute la durée de l'élevage et de l'essai sans manifester de signes de stress. Au début de l'essai, le pH de l'eau d'essai se situera entre 6 et 9 et sa dureté totale ne dépassera pas 400 mg/l en CaCO_3 . Néanmoins, si l'on suspecte une interaction entre les ions qui provoquent la dureté et la substance d'essai, il faudra utiliser une eau moins dure (et ne pas employer le milieu Elendt M4 dans ce cas). Le même type d'eau doit être utilisé tout au long de l'étude. Les caractéristiques de la qualité de l'eau énumérées à l'appendice 4 sont à mesurer au moins deux fois par an ou chaque fois que ses caractéristiques sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées.

Solutions mères – eau chargée

16. Les concentrations expérimentales sont calculées en fonction des concentrations dans la colonne d'eau recouvrant le sédiment. Les solutions d'essai sont généralement préparées aux concentrations choisies par dilution d'une solution mère. Il est préférable de préparer les solutions mères en dissolvant la substance d'essai dans le milieu d'essai. Dans certains cas, il sera nécessaire d'utiliser des solvants ou des dispersants pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Voici quelques exemples de solvants appropriés: acétone, éthanol, méthanol, éthylèneglycol, monoéthyléther, diméthyléther d'éthylèneglycol, diméthylformamide et triéthylèneglycol. Les dispersants qui peuvent être utilisés sont le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 % et l'HCO-40. La concentration de l'agent solubilisant dans le milieu d'essai final doit être minimale ($\leq 0,1$ ml/l) et identique dans tous les traitements. L'agent solubilisant, s'il est utilisé, ne doit pas avoir d'effets significatifs sur la survie, ni d'effet nocif visible sur les larves de chironomes, et ce d'après l'observation des organismes du récipient témoin traité uniquement au solvant. Néanmoins, l'utilisation de ces substances est à éviter dans la mesure du possible.

CONCEPTION DE L'ESSAI

17. La conception de l'essai définit le nombre et l'espacement des concentrations expérimentales, le nombre de récipients à chaque concentration et le nombre de larves par récipient. La marche à suivre pour estimer une valeur de CE, la CSEO et effectuer un essai limite est décrite. L'analyse de régression est préférable à une approche par vérification d'hypothèses.

Conduite d'une analyse de régression

18. La concentration efficace (par exemple, CE_{15} , CE_{50}) et la gamme de concentrations dans laquelle l'effet de la substance d'essai est d'intérêt doivent être couvertes par les concentrations incluses dans l'essai. Généralement, l'exactitude, et plus particulièrement la validité, de l'estimation des concentrations efficaces (CE_x) s'accroissent lorsque la concentration efficace se situe dans la gamme des concentrations testées. Il faut éviter d'extrapoler des résultats très en dessous de la concentration efficace la plus faible ou au-dessus de la concentration maximale. Il est utile de conduire un essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur afin de délimiter la gamme des concentrations à appliquer (voir paragraphe 27).
19. S'il faut estimer la CE_x , au moins cinq concentrations et trois répétitions par concentration doivent être testées. En tout état de cause, il est recommandé de tester suffisamment de concentrations pour obtenir une bonne estimation du modèle. Le facteur séparant les concentrations ne doit pas excéder deux (sauf dans les cas où la courbe dose-effet présente une pente faible). Le nombre de répétitions par traitement peut être diminué si le nombre de concentrations expérimentales entraînant différents effets est augmenté. L'augmentation du nombre de répétitions ou la contraction des intervalles entre les concentrations expérimentales tend à réduire les intervalles de confiance pour l'essai. Le nombre de répétitions sera augmenté s'il y a lieu d'estimer le taux de survie et la croissance des larves après dix jours.

Procédure d'estimation d'une CSEO/CMEO

20. S'il faut estimer la CMEO ou la CSEO, il convient de tester cinq concentrations expérimentales et au moins quatre répétitions par concentration, le facteur séparant les concentrations n'excédant pas deux. Le nombre d'expériences identiques doit être tel qu'il fournit une puissance statistique permettant de détecter une différence de 20 % avec le témoin, au seuil de signification statistique de 5 % ($p = 0,05$). S'agissant de la vitesse de développement, une analyse de la variance (ANOVA) convient généralement, telle que le test de Dunnett ou le test de Williams (17) (18) (19) (20). S'agissant du taux d'émergence, le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haenszel peuvent être utilisés.

Essai limite

21. Si l'essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations n'a engendré aucun effet, un essai limite peut être conduit (une concentration expérimentale et un témoin). L'essai limite vise à montrer que la concentration toxique de la substance d'essai est supérieure à la concentration limite testée. Aucune concentration ne peut être recommandée pour cette méthode d'essai; cela est laissé à l'appréciation des instances réglementaires. Généralement, il est nécessaire de mener au moins six répétitions pour les organismes traités et les témoins. Il y a lieu de démontrer que la puissance statistique est suffisante pour révéler une différence de 20 % avec les témoins, au seuil de signification statistique de 5 % ($p = 0,05$). En ce qui concerne l'effet sur la vitesse de développement et sur le poids, le test t constitue une méthode statistique appropriée, si les données respectent les conditions exigées par ce test (normalité, variances homogènes). On pourra recourir au test t à variance inégale ou à un test non paramétrique, tel que le test de Wilcoxon-Mann-Whitney si ces conditions ne sont pas remplies. S'agissant du taux d'émergence, le test exact de Fisher est approprié.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition*Préparation du système eau chargée-sédiment*

22. Une quantité appropriée de sédiment reconstitué (voir paragraphes 13-14 et appendice 3) est déposée dans les récipients expérimentaux, de façon à former une couche d'au moins 1,5 cm. La profondeur de l'eau versée sur ce sédiment atteindra 6 cm (voir paragraphe 15). Le ratio entre la profondeur du sédiment et la profondeur de l'eau n'excédera pas 1/4 et la couche de sédiment ne dépassera pas 3 cm. Le système sédiment-eau sera laissé sous aération légère pendant 7 jours avant l'ajout des organismes d'essai (voir paragraphe 14 et appendice 3). Afin d'éviter la séparation des constituants du sédiment et la resuspension des particules fines durant le remplissage de la colonne d'eau, on peut recouvrir le sédiment d'un disque en plastique et retirer le disque juste après le remplissage. D'autres dispositifs conviennent également.
23. Les récipients expérimentaux doivent être couverts (par des plaques de verre, par exemple). On prendra soin de remplacer les volumes d'eau évaporée durant l'étude, le cas échéant, et ce avec de l'eau distillée ou désionisée afin d'empêcher l'accumulation de sels.

Introduction des organismes d'essai

24. Quatre à cinq jours avant d'introduire les organismes d'essai dans les récipients, des amas d'œufs sont prélevés dans les cultures et déposés dans de petits flacons contenant du milieu de culture. Un milieu plus ancien issu de la culture mère tout comme un milieu fraîchement préparé peuvent être utilisés. Si ce dernier est utilisé, on ajoutera une petite quantité de nourriture, par exemple des algues vertes et/ou quelques gouttes du filtrat d'une suspension de paillettes pour poissons finement broyées, au milieu de culture (voir appendice 2). Seuls des amas d'œufs fraîchement pondus peuvent être utilisés. Normalement, les larves commencent à éclore quelques jours après la ponte (2 à 3 jours pour *Chironomus riparius* à 20 °C et 1 à 4 jours pour *Chironomus tentans* à 23 °C et *Chironomus yoshimatsui* à 25 °C) et le développement des larves se déroule en quatre stades, dont chacun dure 4 à 8 jours. Cet essai se pratique au premier stade larvaire (2-3 ou 1-4 jours après l'éclosion). Il est possible de vérifier le stade de développement des moucheron d'après la largeur de la capsule céphalique (6).
25. Vingt larves au premier stade, choisies au hasard, sont déposées dans chaque récipient contenant le sédiment chargé et l'eau, à l'aide d'une pipette émoussée. L'aération de l'eau doit être interrompue dès qu'on introduit les larves dans les récipients expérimentaux, et ce durant 24 heures après l'ajout des larves (voir paragraphes 24 et 32). Selon le protocole expérimental suivi (voir paragraphes 19 et 20), le nombre de larves utilisées par concentration s'élève au moins à 60 pour l'estimation d'une valeur de concentration efficace (CE) et à 80 pour la détermination de la CSEO.
26. Vingt-quatre heures après l'introduction des larves dans les récipients expérimentaux, la substance d'essai est ajoutée à la colonne d'eau sus-jacente et une légère aération est à nouveau dispensée. De petits volumes de la solution contenant la substance d'essai sont injectés en dessous de la surface de la colonne d'eau à l'aide d'une pipette. Ensuite, il convient de mélanger l'eau sus-jacente en prenant soin de ne pas remuer le sédiment.

Concentrations d'essai

27. Il peut être utile de conduire un essai de détermination de l'ordre de grandeur pour délimiter la gamme de concentrations à appliquer dans l'essai proprement dit. À cet effet, on utilise une série de concentrations largement espacées de la substance d'essai. Afin de reproduire la même densité de surface par chironome que dans l'essai proprement dit, les chironomes sont exposés à chaque concentration de la substance d'essai durant une période permettant d'estimer les concentrations expérimentales appropriées et aucune expérience identique n'est nécessaire.
28. Les concentrations expérimentales pour l'essai définitif sont choisies en fonction des résultats de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur. Au moins cinq concentrations doivent être appliquées et sélectionnées comme indiqué aux paragraphes 18 à 20.

Témoins

29. L'essai comportera le nombre nécessaire de récipients témoins pourvus du sédiment mais exempts de toute substance d'essai (voir paragraphes 19-20). Si la substance d'essai a été appliquée à l'aide d'un solvant (voir paragraphe 16), il convient d'ajouter un témoin dont le sédiment contient également le solvant.

Système expérimental

30. Des systèmes statiques sont utilisés. Des systèmes semi-statiques ou à écoulement continu avec renouvellement intermittent ou continu de l'eau sus-jacente peuvent être utilisés dans des cas exceptionnels, par exemple si les spécifications de la qualité de l'eau deviennent inappropriées pour l'organisme d'expérience ou affectent l'équilibre chimique (si, par exemple, la concentration d'oxygène dissous devient trop basse, la concentration des excréta augmente de façon trop importante ou si des minéraux lessivés à partir du sédiment affectent le pH et/ou la dureté de l'eau). Néanmoins, d'autres méthodes d'amélioration de la qualité de l'eau sus-jacente, telles que l'aération, seront normalement suffisantes et préférables.

Alimentation

31. Les larves ont besoin d'être nourries, de préférence quotidiennement ou au moins trois fois par semaine. Durant les dix premiers jours, chaque jeune larve recevra quotidiennement 0,25 à 0,5 mg (0,35-0,5 mg pour *C. yoshimatsui*) de nourriture pour poissons (suspendue dans l'eau ou finement broyée, par exemple TetraMin ou TetraPhyll; voir les détails à l'appendice 2). Il peut être nécessaire d'augmenter légèrement cette quantité pour les larves plus âgées: 0,5-1 mg par larve et par jour devrait suffire pour le reste de l'essai. On diminuera la ration alimentaire de tous les organismes traités et témoins si des champignons se développent ou si des organismes témoins meurent. Si la croissance fongique s'avère impossible à enrayer, l'essai doit être renouvelé. Si l'essai porte sur des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un $\log K_{oc} > 5$) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, la quantité de nourriture nécessaire à la survie et à la croissance naturelle des organismes peut être incorporée au sédiment reconstitué avant la période de stabilisation. Dans ce cas, la nourriture pour poissons est remplacée par une ration végétale, par exemple 0,5 % (poids sec) de feuilles finement broyées d'ortie (*Urtica dioica*), de mûrier (*Morus alba*), de trèfle blanc ou rampant (*Trifolium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*) ou d'un autre matériau végétal (*Cerophyl* ou alpha-cellulose).

Conditions d'incubation

32. L'eau sus-jacente est soumise à une légère aération, mise en œuvre de préférence 24 heures après l'introduction des larves et maintenue jusqu'à la fin de l'essai (il faut veiller à ce que la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 60 % de la valeur de saturation en air). L'air est insufflé à travers une pipette Pasteur en verre fixée 2 à 3 cm au-dessus de la couche de sédiment (une ou quelques bulles par seconde). Si la substance d'essai est volatile, il faudra éventuellement supprimer l'aération.
33. L'essai est mené à température constante ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pour *C. tentans* et *C. yoshimatsui*, les températures recommandées s'élèvent respectivement à $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). La photopériode est de 16 heures et l'éclairement compris entre 500 et 1 000 lux.

Durée de l'exposition

34. L'exposition débute avec l'introduction des larves dans les récipients traités et témoins. La durée maximale d'exposition atteint 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et 65 jours pour *C. tentans*. Si les moucheron émergent plus tôt, l'essai peut s'achever au moins cinq jours après l'émergence du dernier adulte témoin.

OBSERVATIONS

Émergence

35. La durée du développement et le nombre total de moucheron mâles et femelles adultes totalement émergés sont à déterminer. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses.
36. Au moins trois fois par semaine, on vérifiera que les organismes des récipients d'essai ne manifestent aucun comportement anormal (sortie du sédiment, nage inhabituelle, par exemple) par rapport aux témoins. Chaque jour, durant la période supposée de l'émergence, il faut compter le nombre de moucheron émergés et consigner le sexe et le nombre de moucheron complètement émergés. Une fois identifiés, les moucheron sont retirés des récipients. Tout amas d'œufs déposé avant la fin de l'essai doit être recensé puis enlevé afin d'empêcher la réintroduction de larves dans le sédiment. Le nombre de pupes visibles n'ayant pas réussi à émerger est aussi enregistré. Des indications sur la façon de mesurer l'émergence sont données à l'appendice 5.

Croissance et survie

37. S'il faut fournir des données sur la survie et la croissance des larves après 10 jours, des récipients expérimentaux supplémentaires seront inclus dès le début de l'essai, pour pouvoir être utilisés ultérieurement. Le sédiment de ces récipients supplémentaires est tamisé à travers des mailles de 250 μm pour retenir les larves. La mort est déterminée par deux critères: l'immobilité et l'absence de réaction à un stimulus mécanique. Les larves non récupérées doivent aussi être comptabilisées parmi les mortes (les larves qui sont mortes au début de l'essai ont pu être dégradées par des microbes). Après avoir déterminé le poids sec (sans cendres) des larves survivantes par récipient expérimental, on calcule le poids sec individuel moyen par récipient. Il est utile d'établir à quel stade se trouvent les larves survivantes, et ce d'après la largeur de la capsule céphalique de chaque individu.

Mesures analytiques

Concentration de la substance d'essai

38. Il est recommandé d'analyser, au minimum, des échantillons de l'eau sus-jacente, de l'eau interstitielle, et du sédiment, au début (de préférence une heure après l'application de la substance d'essai) et à la fin de l'essai, et ce pour la concentration la plus élevée et pour une concentration plus faible. La concentration de la substance d'essai nous renseigne sur le comportement et la répartition de la substance d'essai dans le système eau-sédiment. Le prélèvement d'échantillons de sédiment au début de l'essai risque de perturber le système d'essai (enlèvement

de larves, par exemple), il faut donc inclure des récipients expérimentaux supplémentaires pour effectuer des déterminations analytiques au début de l'essai et, s'il y a lieu, au cours de l'essai (voir paragraphe 39). Il n'est pas forcément nécessaire d'analyser le sédiment si la répartition de la substance d'essai entre l'eau et le sédiment a été clairement déterminée par une étude eau/sédiment menée dans des conditions comparables (par exemple, quotient sédiment/eau, type d'application, teneur en carbone organique du sédiment).

39. Lorsqu'on effectue des mesures intermédiaires (par exemple au septième jour) et si l'analyse requiert des échantillons volumineux qui ne peuvent être prélevés des récipients sans influencer le système expérimental, les analyses seront pratiquées sur des échantillons provenant de récipients expérimentaux supplémentaires traités de la même façon (y compris par la présence des organismes d'essai), mais non utilisés pour les observations biologiques.
40. Pour isoler l'eau interstitielle, on recommande de centrifuger des échantillons à 10 000 g et à 4 °C durant 30 minutes. Cependant, s'il est démontré que la substance d'essai ne s'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Avec des échantillons trop petits, il arrive que les concentrations dans l'eau interstitielle soient impossibles à analyser.

Paramètres physico-chimiques

41. Le pH, l'oxygène dissous dans l'eau d'essai et la température des récipients expérimentaux doivent être mesurés de façon appropriée (voir paragraphe 10). La dureté de l'eau et la teneur en ammoniac sont mesurées dans les récipients témoins et dans un récipient traité à la concentration la plus élevée, au début et à la fin de l'essai.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

42. Cet essai vise à déterminer l'effet de la substance d'essai sur la vitesse de développement et le nombre total de moucheron mâles et femelles totalement émergés ou, dans le cas de l'essai de 10 jours, les effets sur la survie et le poids des larves. Si rien n'indique que les deux sexes présentent des différences statistiques de sensibilité, les résultats obtenus sur les mâles et les femelles peuvent être regroupés pour l'analyse statistique. Les différences de sensibilité entre les sexes peuvent être appréciées statistiquement par un test (de tableau) à χ^2 - r x 2, par exemple. La survie des larves et le poids sec individuel moyen par récipient doivent être déterminés après dix jours, le cas échéant.
43. Il est préférable de calculer les concentrations efficaces, exprimées en concentrations dans l'eau sus-jacente, en fonction des concentrations mesurées au début de l'essai (voir paragraphe 38).
44. Pour estimer ponctuellement la CE_{50} ou une quelconque CE_x , les statistiques par récipient peuvent être utilisées comme des expériences identiques proprement dites. Lorsqu'on calcule un intervalle de confiance pour une quelconque CE_x , il faut tenir compte de la variabilité entre les récipients ou montrer que celle-ci est négligeable. Si le modèle est ajusté par la méthode des moindres carrés, il convient d'appliquer une transformation des données pour les statistiques par récipient afin d'accroître l'homogénéité de la variance. Toutefois, les valeurs de la CE_x sont à calculer après que les résultats ont été "retransformés" de façon à recouvrer leur valeur originale.
45. Si l'analyse statistique vise à déterminer la CSEO/CMEO par la vérification d'hypothèses, la variabilité entre les récipients doit être prise en compte, par exemple à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) "emboîtée". Par contre, des tests plus robustes (21) peuvent être utilisés au cas où les hypothèses habituelles de l'analyse de la variance ne se vérifient pas.

Taux d'émergence

46. Le taux d'émergence donne une réponse par tout ou rien et peut être analysé par le test de Cochran-Armitage appliqué de façon régressive si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Dans le cas contraire, un test exact de Fisher ou un test de Mantel-Haenszel avec des valeurs de p corrigées selon Bonferroni-Holm peuvent être employés. S'il s'avère que la variabilité entre expériences identiques à la même concentration est supérieure à ce qu'une distribution binomiale indiquerait (variation souvent qualifiée d'"extra-binomiale"), on appliquera un test plus robuste (Cochran-Armitage ou test exact de Fisher) comme proposé à la référence (21).
47. La somme des moucheron émergés par récipient, n_e , est déterminée et divisée par le nombre de larves introduites, n_a :

$$TE = \frac{n_e}{n_a}$$

où:

TE = taux d'émergence

n_e = nombre de moucheron émergés par récipient

n_a = nombre de larves introduites par récipient

48. Une variante plus appropriée aux échantillons de grande taille, lorsque la variance est extra-binomiale, consiste à traiter le taux d'émergence comme une réponse continue et à appliquer une méthode telle que le test de Williams, si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les résultats du taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Le test de Dunnett convient dans le cas où la relation ne s'avère pas monotone. Ici, on considère qu'un échantillon est de grande taille lorsque le nombre de moucheron émergés et le nombre de chironomes non émergés dépassent chacun cinq, par récipient d'essai.
49. Pour appliquer l'analyse de la variance (ANOVA), il convient d'appliquer aux valeurs de TE une transformation "arcsinus-racine carrée" ou "Freeman-Tukey" afin d'obtenir une distribution proche de la normale et d'égaliser les variances. Le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction de Bonferroni) ou le test de Mantel-Haenszel peuvent être employés lorsqu'on utilise des fréquences absolues. La transformation arcsinus-racine carrée consiste à calculer l'inverse du sinus ($\sin^{-1}$) de la racine carrée du TE.
50. Pour les taux d'émergence, les valeurs de la CE_x sont calculées par une analyse de régression [ou par probit (22), logit, Weibull, des logiciels commerciaux appropriés, etc.]. Si l'analyse de la régression échoue (par exemple, lorsqu'il y a moins de deux réponses partielles), on fait appel à d'autres méthodes non paramétriques telles que la moyenne mobile ou une simple interpolation.

Vitesse de développement

51. La période moyenne de développement représente le temps moyen écoulé entre l'introduction des larves (jour 0 de l'essai) et l'émergence de la cohorte expérimentale de moucheron (pour calculer la période réelle de développement, il faut tenir compte de l'âge des larves au moment de l'introduction). La vitesse de développement est l'inverse de la période de développement (unité: 1/jour) et représente la partie du développement larvaire qui s'effectue par jour. Pour évaluer la toxicité dans les sédiments, il est préférable de choisir la vitesse de développement car sa variance est plus faible et ses valeurs sont plus homogènes et plus proches d'une distribution normale, en comparaison avec la période de développement. C'est pourquoi les tests paramétriques puissants conviennent mieux à la vitesse de développement qu'à la période de développement. Si la vitesse de développement est traitée comme une réponse continue, les valeurs de la CE_x peuvent être estimées par l'analyse de la régression, par exemple (23), (24).
52. Pour les tests statistiques suivants, le nombre de moucheron observés le jour x sont considérés comme ayant émergé au milieu de l'intervalle de temps compris entre le jour x et le jour $x - 1$ (1 = longueur de l'intervalle d'observation, habituellement 1 jour). La vitesse de développement moyenne par récipient ($\bar{x}$) est calculée comme suit:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

où:

$\bar{x}$: vitesse de développement moyenne par récipient

i : indice de l'intervalle d'observation

m : nombre maximal d'intervalles d'observation

f_i : nombre de moucheron émergés durant l'intervalle d'observation i

n_e : nombre total de moucheron émergés à la fin de l'expérience ($= \sum f_i$)

x_i : vitesse de développement des moucheron émergés durant l'intervalle i

$$x_i = 1 / \left(\text{jour}_i - \frac{l_i}{2} \right)$$

où:

jour_i : jour d'observation (compté à partir de l'application)

l_i : durée de l'intervalle d'observation i (exprimée en jours, habituellement 1 jour)

Rapport d'essai

53. Le rapport d'essai doit fournir au moins les informations suivantes:

Substance d'essai:

- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (hydrosolubilité, pression de vapeur, coefficient de partage dans le sol (ou dans le sédiment s'il est connu), stabilité dans l'eau, etc.),
- identification chimique (nom courant, nom chimique, formule structurale, numéro CAS, etc.), pureté et méthode d'analyse pour la quantification de la substance d'essai.

Espèce d'essai:

- animal d'essai utilisé: espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage,
- informations sur la manipulation des amas d'œufs et des larves,
- âge des animaux d'expérience au moment où ils ont été déposés dans les récipients d'essai.

Conditions expérimentales:

- sédiment utilisé, c'est-à-dire naturel ou reconstitué,
- pour les sédiments naturels: localisation et description du site de prélèvement et notamment, si possible, son histoire en matière de contamination; caractéristiques: pH, teneur en carbone organique, quotient C/N et granulométrie, le cas échéant,
- préparation du sédiment reconstitué: ingrédients et caractéristiques (teneur en carbone organique, pH, humidité, etc. au début de l'essai),
- préparation de l'eau d'essai (si l'eau est reconstituée) et caractéristiques (concentration d'oxygène, pH, conductivité, dureté, etc. au début de l'essai),
- profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente,
- volume de l'eau sus-jacente et de l'eau interstitielle; poids du sédiment humide avec et sans eau interstitielle,
- récipients expérimentaux (matériau et dimension),
- méthode de préparation des solutions mères et des concentrations expérimentales,
- application de la substance d'essai: concentrations expérimentales utilisées, nombre d'expériences identiques et utilisation d'un solvant, le cas échéant,
- conditions d'incubation: température, cycle et intensité de lumière, aération (fréquence et intensité),
- informations détaillées sur la nourriture: type de nourriture, préparation, quantité et régime d'administration.

Résultats:

- concentrations d'essai nominales, concentrations d'essai mesurées et résultats de toutes les analyses conduites pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans le récipient expérimental,
- qualité de l'eau dans les récipients expérimentaux: pH, température, oxygène dissous, dureté et teneur en ammoniac,
- remplacement de l'eau d'essai évaporée, le cas échéant,
- nombre de moucheron mâles et femelles émergés par récipient et par jour,
- nombre de larves non émergées sous la forme de moucheron par récipient,
- poids sec individuel moyen des larves par récipient, et par stade larvaire, s'il y a lieu,
- pourcentage d'émergence par expérience identique et par concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucheron mâles et femelles),
- vitesse de développement moyenne des moucheron totalement émergés par expérience identique et par concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucheron mâles et femelles),
- estimation des effets toxiques observés, par exemple CE_x (et intervalles de confiance associés), CSEO et/ou CMEQ, et méthodes statistiques employées pour les déterminer,
- analyse des résultats, y compris les répercussions sur les résultats d'un écart éventuel à la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R. *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRC, UK.
- (3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environnement Canada (1997). Essai de croissance et de survie de larves de moucheron d'eau douce (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*). Méthode d'essai biologique. Rapport SPE 1/RM/32. Décembre 1997.
- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., Kirby R.S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.
- (10) Sugaya Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.
- (11) Kawai K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.
- (12) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OCDE Publications Hygiène et sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations, n° 23.
- (13) Environnement Canada (1995). Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité au moyen de sédiments de contrôle dopés avec un produit toxique de référence. Rapport SPE 1/RM/30. Septembre 1995.
- (14) Chapitre C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre.
- (15) Suedel B.C. and Rodgers J.H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.
- (16) Naylor C. and Rodrigues C. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.
- (17) Dunnett C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121.

-
- (18) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- (19) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
- (20) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510-531.
- (21) Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48: 577-585.
- (22) Christensen E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213-221.
- (23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 1485-1494.
- (24) Slob W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.
-

Appendice 1

DÉFINITIONS

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai:

Le **sédiment reconstitué**, ou artificiel ou synthétique, désigne le mélange de matériaux utilisés pour reproduire au mieux les composants physiques d'un sédiment naturel.

L'**eau sus-jacente** est l'eau recouvrant le sédiment dans le récipient d'essai.

L'**eau interstitielle**, ou l'eau des pores, se réfère à l'eau qui occupe les vides laissés entre le sédiment et les particules de sol.

L'**eau chargée** est l'eau d'essai à laquelle on a ajouté la substance d'essai.

Une **substance d'essai** est toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Appendice 2

Recommandations pour la culture de *Chironomus riparius*

1. Les larves de *Chironomus* peuvent être élevées dans des cristallisoirs ou de grands récipients. Du sable quartzique fin est déposé en couche mince (environ 5 à 10 mm d'épaisseur) sur le fond du récipient. Le Kieselguhr (par exemple l'art. 8117 de Merck) convient aussi comme substrat (une couche encore plus mince de quelques millimètres à peine suffit). Une eau de qualité appropriée, profonde de plusieurs centimètres, vient ensuite recouvrir le substrat. En cas d'évaporation, le niveau d'eau doit toujours être ramené à sa hauteur initiale, afin de prévenir toute dessiccation. L'eau peut être remplacée, si nécessaire. Une légère aération est fournie. Les récipients d'élevage des larves doivent être placés dans des cages appropriées, afin d'empêcher la fuite des adultes émergeant. La cage sera suffisamment grande pour permettre aux adultes émergés d'essaimer, sans quoi la copulation risque de ne pas avoir lieu (dimensions minimales: 30 × 30 × 30 cm).
2. Les cages doivent être gardées à température ambiante, ou à 20 ± 2 °C si elles sont placées dans une chambre à ambiance constante, avec une photopériode de 16 heures de lumière (intensité: environ 1 000 lux) et 8 heures d'obscurité. Une humidité relative de l'air inférieure à 60 % pourrait empêcher la reproduction.

Eau de dilution

3. Toute eau naturelle ou reconstituée appropriée peut être utilisée. L'eau d'un puits, de l'eau du robinet déchlorée et un milieu artificiel (Elendt "M4" ou "M7", voir ci-après) sont souvent utilisés. L'eau doit être aérée avant l'emploi. Si nécessaire, on peut renouveler l'eau de culture en versant ou en siphonnant soigneusement l'eau usée des récipients expérimentaux, sans détruire les tubes des larves.

Alimentation des larves

4. Les larves de *Chironomus* reçoivent des paillettes pour poissons (Tetra Min®, Tetra Phyll® ou une autre marque déposée équivalente), à raison d'environ 250 mg par récipient et par jour. Cette nourriture peut être administrée sous la forme d'une poudre moulue à sec ou d'une suspension dans l'eau: 1,0 g de paillettes ajoutées à 20 ml d'eau de dilution et agitées de façon à obtenir un mélange homogène. Cette préparation peut être administrée à raison d'environ 5 ml par récipient et par jour (agiter avant emploi). Les larves plus âgées peuvent en recevoir plus.
5. La nourriture est ajustée en fonction de la qualité de l'eau. Si le milieu de culture devient trouble, il convient de réduire la ration. Les quantités de nourriture données sont soigneusement notées. Un manque de nourriture fera émigrer les larves vers la colonne d'eau, tandis qu'un excès de nourriture intensifiera l'activité microbienne et abaissera la concentration d'oxygène. Ces deux conditions sont susceptibles de ralentir la croissance des organismes.
6. Certaines cellules d'algues vertes (*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) peuvent aussi être ajoutées lors de la préparation de nouveaux récipients de culture.

Alimentation des adultes émergeant

7. Certains expérimentateurs ont suggéré de nourrir les adultes émergés au moyen d'un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucrose saturée.

Émergence

8. À 20 ± 2 °C, les adultes commencent à émerger des récipients d'élevage des larves après environ 13 à 15 jours. Il est facile de distinguer les mâles d'après leurs antennes plumeuses.

Amas d'œufs

9. Dès que des adultes sont présents dans la cage d'élevage, il faut vérifier trois fois par semaine, dans tous les récipients d'élevage de larves, si des amas d'œufs gélatineux n'ont pas été déposés. Le cas échéant, les amas d'œufs doivent être soigneusement enlevés et transférés dans un petit récipient contenant un échantillon de l'eau d'élevage. Les amas d'œufs sont utilisés pour préparer un nouveau récipient de culture (2 à 4 amas d'œufs par récipient, par exemple) ou pratiquer des essais de toxicité.
10. Les larves au premier stade devraient éclore après 2-3 jours.

Préparation de nouveaux récipients de culture

11. Une fois que les cultures ont été lancées, il devrait être possible de préparer un nouveau récipient de culture de larves, une fois par semaine ou moins souvent, suivant les besoins de l'essai, et de retirer les récipients plus anciens après que les moucheron adultes ont émergé. Ce système permet d'obtenir régulièrement un contingent d'adultes, avec une organisation minimale.

Préparation des solutions d'essai "M4" et "M7"

12. Elendt (1990) a décrit le milieu "M4". Le milieu "M7" est préparé comme le milieu "M4", sauf pour les substances reprises au tableau 1, dont les concentrations sont quatre fois plus faibles dans le milieu "M7" que dans le milieu "M4". Une publication sur le milieu "M7" est en préparation (Elendt, communication personnelle). La solution d'essai ne doit pas être préparée selon les instructions d'Elendt et Bias (1990), car les concentrations de NaSiO_3 , $5 \text{ H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 et K_2HPO_4 indiquées pour la préparation des solutions mères ne conviennent pas.

Préparation du milieu "M7"

13. Chaque solution mère (I) est préparée séparément et une solution mère combinée (II) est préparée à partir de ces solutions mères (I) (voir tableau 1). 50 ml de la solution mère combinée (II) additionnés de la quantité de chaque solution mère de macronutriments indiquée au tableau 2 sont amenés à 1 l avec de l'eau désionisée pour composer le milieu "M7". On prépare une solution mère de vitamines en ajoutant trois vitamines à de l'eau désionisée, comme indiqué au tableau 3 et on verse 0,1 ml de la solution mère combinée de vitamines au milieu "M7" final, peu avant l'emploi (la solution mère de vitamines est stockée congelée par petites aliquotes). Le milieu est aéré et stabilisé

Tableau 1

Solutions mères d'éléments en traces pour les milieux M4 et M7

Solutions mères (I)	Quantité (mg) pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée	Pour préparer la solution mère combinée (II): mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions mères (I) et compléter à un litre avec de l'eau désionisée		Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 ⁽¹⁾	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl ⁽¹⁾	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl ⁽¹⁾	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ⁽¹⁾	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl_2	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ^{(1) (2)}	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ^{(1) (2)}	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ Ces substances sont dosées différemment dans M4 et M7, comme indiqué plus haut.

⁽²⁾ Ces solutions sont préparées séparément, puis mélangées et autoclavées immédiatement après.

Tableau 2

Solutions mères de macronutriments pour les milieux M4 et M7

	Quantité pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantités de solutions mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions expérimentales M4 et M7 (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	293 800	1,0	293,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	246 600	0,5	123,3

	Quantité pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantités de solutions mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions expérimentales M4 et M7 (mg/l)
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ • 9 H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

Tableau 3

Solution mère de vitamines pour les milieux M4 et M7

Les trois solutions de vitamines sont mélangées de façon à ne former qu'une solution mère de vitamines.

	Quantité pour former une solution d'un litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantités de solutions mères de vitamines ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions d'essai M4 et M7 (mg/l)
Hydrochlorure de thiamine	750	0,1	0,075
Cyanocobalamine (B12)	10	0,1	0,0010
Biotine	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAPHIE:

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P. and Bias W.-R. (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

Appendice 3

PRÉPARATION DU SÉDIMENT RECONSTITUÉ

Composition du sédiment

Le sédiment sera reconstitué comme suit:

Ingrédient	Caractéristiques	% du sédiment poids sec
Tourbe	Tourbe de sphaigne, pH aussi proche que possible de 5,5-6,0, pas de résidus de plantes visibles, finement broyée, particules (≤ 1 mm) et séchée à l'air	4-5
Sable quartzique	Dimension des particules: > 50 % des particules doivent mesurer entre 50 et 200 μm	75-76
Argile kaolinique	Taux de kaolinite ≥ 30 %	20
Carbone organique	Ajusté par l'addition de tourbe et de sable	2 ($\pm 0,5$)
Carbonate de calcium	CaCO_3 , pulvérisé, chimiquement pur	0,05 - 0,1
Eau	Conductivité ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$	30 - 50

Préparation

La tourbe est séchée à l'air et broyée en poudre fine. Une suspension de la quantité requise de poudre de tourbe dans de l'eau désionisée est préparée à l'aide d'un homogénéisateur à haute performance. Le pH de cette suspension est ajusté à $5,5 \pm 0,5$ avec du CaCO_3 . La suspension est conditionnée durant au moins deux jours en l'agitant doucement à 20 ± 2 °C, afin de stabiliser le pH et d'établir une flore microbienne stable. Le pH est vérifié à nouveau; il devrait atteindre $6,0 \pm 0,5$. Ensuite la suspension de tourbe est mélangée avec les autres ingrédients (sable et argile kaolinique) et de l'eau désionisée pour former un sédiment homogène avec une teneur en eau de 30 à 50 % du poids sec du sédiment. Le pH du mélange final est encore mesuré et ajusté à $6,5$ - $7,5$ avec du CaCO_3 , si nécessaire. On prélève des échantillons de sédiment afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Ensuite, avant d'utiliser le sédiment reconstitué dans l'essai de toxicité sur les chironomes, il est recommandé de le conditionner durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui seront appliquées durant l'essai subséquent.

Stockage

Les ingrédients secs destinés à la préparation du sédiment artificiel peuvent être entreposés dans un endroit sec et frais, à température ambiante. Le sédiment reconstitué (humide) ne doit pas être stocké avant son utilisation dans l'essai. Il doit être utilisé immédiatement après la période de conditionnement de sept jours qui achève sa préparation.

BIBLIOGRAPHIE:

Chapitre C.8 de la présente annexe: Toxicité pour les vers de terre.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

Appendice 4

Caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable

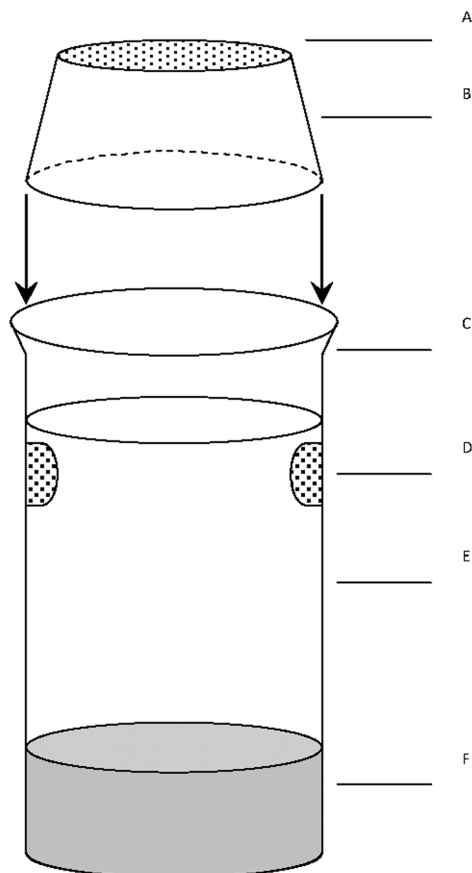
Substance	Concentrations
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Dureté en CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Totalité des pesticides organophosphorés	< 50 ng/l
Totalité des pesticides organochlorés et des biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

(*) S'il risque d'y avoir une interaction entre les ions qui provoquent la dureté de l'eau et la substance d'essai, il convient d'utiliser une eau moins dure (auquel cas, le milieu Elendt M4 ne pourra pas être utilisé).

Appendice 5

Conseils pour suivre l'émergence des larves de chironomes

Les béciers expérimentaux sont coiffés par des pièges à émergence, du 20^e jour jusqu'à la fin de l'essai. Le schéma ci-dessous illustre un exemple de piège:



A: toile de nylon.

B: coupelles en plastique renversées.

C: bécier expérimental sans bec.

D: ouvertures recouvertes de toile par où s'effectuent les échanges d'eau.

E: eau.

F: sédiment.

C.29. BIODÉGRADABILITÉ FACILE – DÉGAGEMENT DE CO₂ DANS DES FLACONS HERMÉTIQUEMENT CLOS (ESSAI DE L'ESPACE DE TÊTE AU-DESSUS DU LIQUIDE)

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 310 (2006) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Cette méthode de criblage permet de classer les substances chimiques en fonction de leur biodégradabilité facile et fournit des informations semblables à celles exposées dans les six méthodes d'essai (A à F) décrites au chapitre C.4 de la présente annexe. Par conséquent, une substance chimique livrant un résultat positif pour cet essai de l'espace de tête peut être considérée comme facilement biodégradable et donc rapidement dégradable dans l'environnement.
2. L'essai, désormais bien mis au point, de dégagement de CO₂ (1), basé sur l'essai original de Sturm (2), qui permet d'évaluer la biodégradabilité des produits chimiques organiques d'après la mesure du dioxyde de carbone produit par l'activité microbologique, est normalement celui qui se prête le mieux à l'essai des substances chimiques peu solubles et celles fortement adsorbantes. Il est également choisi pour les substances solubles (mais non volatiles) puisque beaucoup considèrent que le dégagement de dioxyde de carbone constitue la seule preuve irréfutable de l'activité microbologique. La disparition du carbone organique dissous peut faire intervenir des processus physico-chimiques (adsorption, volatilisation, précipitation, hydrolyse) ainsi que l'action microbologique et de nombreuses réactions non-biologiques consommant de l'oxygène; il est rare que le CO₂ soit produit à partir de produits chimiques organiques par un processus abiotique. Dans les essais original et modifié

de Sturm (1) (2), le CO₂ est extrait de la phase liquide et envoyé dans des récipients absorbants par barbotage (passage bulle à bulle d'air traité à travers le milieu liquide pour éliminer le CO₂), alors que dans la version de Larson (3) (4), lors de son transfert du réacteur vers l'absorbeur, le CO₂ traverse un espace de tête contenant de l'air exempt de CO₂, tandis que le réacteur est agité en continu. Le réacteur n'est agité que dans la version de Larson modifiée; l'agitation n'est prescrite que pour les substances insolubles dans la norme ISO 9439 (5) et dans la version originale des États-Unis (6), qui prescrivent toutes deux le barbotage plutôt que le remplacement de l'espace de tête. Dans une autre méthode officielle (7) de l'Agence des États-Unis pour la protection de l'environnement (US EPA), basée sur la méthode de Gledhill (8), le réacteur agité est fermé à l'atmosphère et le CO₂ produit est directement recueilli de la phase gazeuse dans un piège alcalin interne, comme dans les respiromètres classiques de Warburg/Barcroft.

3. Il a toutefois été démontré que le carbone inorganique s'accumule dans le milieu durant l'application de l'essai standard modifié de Sturm à plusieurs substances chimiques (9). La dégradation de l'aniline à 20 mg C/l a produit une concentration assez élevée de carbone inorganique, à savoir 8 mg/l. Autrement dit, la collecte de CO₂ dans les pièges alcalins n'a pas reflété la quantité réelle de CO₂ produite par des processus microbiologiques à des moments intermédiaires au cours de la dégradation. Par conséquent, la prescription selon laquelle une production de CO₂ supérieure à 60 % de la production maximale théorique (ThCO₂) doit être atteinte dans un intervalle de 10 jours (les dix jours suivant immédiatement le franchissement du seuil de 10 % de biodégradation) pour une substance d'essai à classer comme facilement biodégradable, ne pourra être respectée pour certaines substances qui rentreraient dans cette classification d'après la disparition du carbone organique dissous.
4. Lorsque le pourcentage de dégradation est inférieur au niveau attendu, il est probable que du carbone inorganique se soit accumulé dans la solution expérimentale. À ce moment-là, la dégradabilité peut être évaluée avec les autres essais de biodégradabilité facile.
5. D'autres inconvénients de la méthode de Sturm (laborieuse, longue, davantage sujette à des erreurs expérimentales et non applicable aux substances volatiles) avaient déjà incité les chercheurs à s'orienter vers une technique en flacon hermétiquement clos, autre que celle de Gledhill, plutôt que d'utiliser un écoulement gazeux continu (10) (11). Boatman *et al.* (12) ont réexaminé les méthodes précédentes et adopté un système d'espace de tête fermé dans lequel le CO₂ est libéré dans l'espace de tête à la fin de l'incubation moyennant une acidification du milieu. Le CO₂ était mesuré par chromatographie gazeuse (carbone inorganique) dans des échantillons prélevés automatiquement de l'espace de tête, mais le carbone inorganique dissous dans la phase liquide n'était pas pris en compte. En outre, les récipients utilisés étaient très petits (20 ml) et ne contenaient que 10 ml de milieu, ce qui engendrait des problèmes, par exemple lorsqu'on ajoutait des quantités forcément très petites de substances d'essai insolubles, et/ou du fait que le milieu inoculé risquait de ne pas renfermer (suffisamment) de micro-organismes capables de dégrader les substances d'essai.
6. Ces problèmes ont été résolus par les études indépendantes de Struijs et Stoltenkamp (13) et de Birch et Fletcher (14), ces derniers s'étant inspirés de leur expérience avec les appareils utilisés dans l'essai de biodégradation anaérobie (15). Dans la première méthode (13), le CO₂ est mesuré dans l'espace de tête après acidification et équilibrage, tandis que dans la seconde (14), le carbone inorganique dissous est mesuré dans les phases gazeuse et liquide, sans traitement; plus de 90 % du carbone inorganique formé était présent dans la phase liquide. Ces deux méthodes présentent des avantages sur l'essai de Sturm du fait que le système expérimental est plus compact et maniable, qu'elles s'appliquent aussi aux substances volatiles et que le risque de retard dans la mesure du CO₂ produit est écarté.
7. Ces deux approches ont été combinées dans la norme ISO (essai au CO₂ – espace de tête) (16) qui a fait l'objet d'un essai circulaire (17) et qui forme la base de la présente méthode d'essai. Ces deux approches ont également été appliquées dans la méthode de l'US EPA (18). Deux méthodes de mesure du CO₂ ont été recommandées, à savoir le CO₂ dans l'espace de tête après acidification (13) et le carbone inorganique dans la phase liquide après l'ajout d'un excès de base. Cette dernière méthode a été introduite par Peterson au cours de l'essai circulaire, conduit par le CONCAWE (19), de cette méthode de l'espace de tête modifiée pour mesurer la biodégradabilité intrinsèque. Les changements apportés par la révision effectuée en 1992 (20) des méthodes contenues dans le chapitre C.4 de la présente annexe pour les essais de biodégradabilité facile ont été incorporés dans la présente méthode d'essai, si bien que les conditions (milieu, durée, etc.) sont par ailleurs identiques à celles de l'essai modifié de Sturm (20). Birch et Fletcher (14) ont montré que, sur les mêmes substances, l'essai de l'espace de tête livrait des résultats très proches de ceux de l'essai circulaire organisé par l'OCDE des méthodes d'essai révisées (21).

PRINCIPE DE L'ESSAI

8. Une population mixte de micro-organismes estensemencée dans un milieu tampon composé de sels minéraux, où la substance d'essai, généralement à une concentration de 20 mg C/l, représente la seule source de carbone et d'énergie. L'essai est conduit dans des flacons hermétiquement clos comportant un espace de tête d'air, qui sert de réserve d'oxygène pour la biodégradation aérobie. On détermine le CO₂ dégagé par la biodégradation aérobie finale de la substance d'essai en mesurant l'excédent de carbone inorganique produit dans les flacons d'essai par rapport au carbone inorganique produit dans les flacons témoins à blanc ne renfermant que le milieu ensemencé. Le degré de biodégradation est exprimé en pourcentage de la production maximale théorique de carbone inorganique (ThCI), d'après la quantité de substance d'essai (en carbone organique) ajoutée au départ.
9. La disparition de carbone organique dissous et/ou le niveau de la biodégradation primaire de la substance d'essai peuvent aussi être mesurés (20).

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

10. Il faut connaître la teneur (% poids) en carbone organique de la substance d'essai, d'après sa structure chimique ou par une mesure, de façon à pouvoir calculer le pourcentage de dégradation. Dans le cas des substances d'essai volatiles, il est utile de mesurer ou de calculer la constante de Henry afin de déterminer un rapport volumique espace de tête/liquide approprié. Les informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes permettent de choisir une concentration d'essai appropriée et facilitent l'interprétation des résultats lorsque la biodégradabilité est faible: on recommande d'inclure un témoin d'inhibition, sauf si l'on sait que la substance d'essai n'inhibe pas l'activité des micro-organismes (voir paragraphe 24).

CHAMP D'APPLICATION DE LA MÉTHODE

11. Cet essai convient aux substances insolubles et solubles dans l'eau, cependant la substance d'essai doit être bien dispersée. Si l'on applique le rapport volumique espace de tête/liquide recommandé de 1/2, les substances volatiles dont la constante de Henry ne dépasse pas $50 \text{ Pa.m}^3.\text{mol}^{-1}$ peuvent être testées puisque la proportion de la substance d'essai dans l'espace de tête n'excèdera pas 1 % (13). Un volume plus petit d'espace de tête peut être utilisé pour tester des substances plus volatiles, mais dont la biodisponibilité risque d'être limitante, surtout si elles sont peu solubles dans l'eau. Toutefois, les expérimentateurs doivent s'assurer que le rapport volumique espace de tête/liquide et la concentration de la substance d'essai laissent suffisamment d'oxygène disponible pour permettre à la biodégradation aérobie d'être complète (en évitant, par exemple, d'utiliser un substrat très concentré et un petit espace de tête). Des orientations sur ce point figurent dans les références (13) et (23).

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

12. Il faut vérifier le procédé expérimental en testant en parallèle une substance de référence de biodégradabilité connue. À cet effet, l'aniline, le benzoate de sodium ou l'éthylèneglycol peuvent être utilisés pour les substances d'essai solubles dans l'eau et le 1-octanol pour les substances d'essai peu solubles (13). La biodégradation de ces substances doit être supérieure à 60 % de la ThCI au bout de 14 jours.

REPRODUCTIBILITÉ

13. L'essai circulaire réalisé par l'ISO de la méthode (17) a produit les résultats suivants, pour les conditions recommandées, notamment une concentration de la substance d'essai de 20 mg C/l:

Substance d'essai	Pourcentage moyen de biodégradation (28 jours)	Coefficient de variation (%)	Nombre de laboratoires
Aniline	90	16	17
1-octanol	85	12	14

Avec l'aniline, la variabilité interne de l'essai était faible, les coefficients de variabilité ne dépassant pas 5 % dans presque tous les essais. Dans les deux cas où la répétabilité a été moins bonne, la plus grande variabilité a probablement été due à une production élevée de carbone inorganique dans les témoins à blanc. Le 1-octanol a donné lieu à une moins bonne répétabilité, mais avec une variabilité néanmoins inférieure à 10 % dans 79 % des essais. Cette plus grande variabilité interne de l'essai pourrait résulter d'erreurs de dosage, le volume de 1-octanol à injecter dans les flacons expérimentaux hermétiquement clos étant faible (3 à 4 µl). Des concentrations plus faibles de la substance d'essai engendreraient des coefficients de variation plus élevés, en particulier aux concentrations inférieures à 10 mg C/l. Ce problème pourrait être en partie résolu par la diminution de la concentration du carbone inorganique total dans l'inoculum.

14. Un essai circulaire de cinq agents tensioactifs à 10 mg C/L, organisé par l'Union européenne (24), a livré les résultats suivants:

Substance d'essai	Pourcentage moyen de biodégradation (28 jours)	Coefficient de variation (%)	Nombre de laboratoires
Benzènesulfonate de tétra-propylène	17	45	10
Diisooctylsulfosuccinate (anionique)	72	22	9
Chlorure d'ammonium hexadécyl-triméthylque (*) (cationique)	75	13	10

Substance d'essai	Pourcentage moyen de biodégradation (28 jours)	Coefficient de variation (%)	Nombre de laboratoires
(éthoxylate d') ₉ isononyl-phénol (non ionique)	41	32	10
Cocoamidepropyl- diméthylhydroxy- sulfobétaïne (amphotère)	60	23	11

(*) Le SiO₂ a été ajouté pour neutraliser la toxicité.

Les résultats montrent qu'en général, les agents tensioactifs les moins bien dégradés présentent une plus grande variabilité. La variabilité interne de l'essai, qui était inférieure à 15 % dans plus de 90 % des cas, n'a pas dépassé 30-40 %.

Note: la plupart des agents tensioactifs ne se composent pas d'une seule espèce moléculaire, mais sont des mélanges d'isomères, d'homologues, etc. qui se dégradent à l'issue de différentes périodes de latence et à différentes vitesses, et qui génèrent des courbes "brouillées", atténuées, de sorte que le seuil de 60 % risque de n'être pas atteint dans la fenêtre de dix jours, même si chaque espèce moléculaire atteindrait plus de 60 % en l'espace de dix jours si elle avait été testée isolément. Ce phénomène peut aussi s'observer avec d'autres mélanges complexes.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

15. Appareils courants de laboratoire et:

- a) flacons à serum en verre fermés avec des bouchons en caoutchouc butylique serti de surcapsules en aluminium. La capacité recommandée est de 125 ml, soit un volume total d'environ 160 ml (dans ce cas, le volume de chaque flacon doit atteindre 160 ml avec une précision de 1 ml). Des flacons plus petits peuvent être utilisés si les résultats remplissent les conditions décrites aux paragraphes 66 et 67;
- b) analyseur de carbone ou autre instrument (chromatographe en phase gazeuse, par exemple) pour mesurer le carbone inorganique;
- c) seringues à haute précision pour les échantillons gazeux et liquides;
- d) agitateur orbital dans un environnement thermostaté;
- e) source d'air exempt de CO₂ – on peut la préparer en faisant passer l'air à travers des granules de chaux sodée ou en utilisant un mélange gazeux à 80 % de N₂ et 20 % d'O₂ (facultatif) (voir paragraphe 28);
- f) appareil à membrane filtrante à pores de 0,20 à 0,45 µm (facultatif);
- g) analyseur de carbone organique (facultatif).

Réactifs

16. Tous les réactifs doivent être de qualité pour analyse.

Eau

- 17. On utilise de l'eau distillée ou désionisée dont la teneur en carbone organique total est ≤ 1 mg/l. Cela représente une quantité ≤ 5 % de la teneur initiale en carbone organique introduite par la dose recommandée de substance d'essai.

Solutions mères pour le milieu composé de sels minéraux

- 18. Les solutions mères et le milieu minéral sont similaires à ceux de la norme ISO 14593 (16) et des essais de "biodégradabilité facile" du chapitre C.4 (20). L'utilisation d'une concentration plus élevée de chlorure d'ammonium (2,0 g/l au lieu de 0,5 g/l) ne devrait être nécessaire que dans des cas très exceptionnels, par exemple lorsque la concentration de la substance d'essai est > 40 mg C/l. Les solutions mères doivent être gardées au froid et éliminées après six mois, ou avant si l'on remarque une précipitation ou une prolifération bactérienne. Préparer les solutions mères suivantes:

a) Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) 8,50 g

Hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4) 21,75 g

Hydrogénophosphate de sodium dihydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 33,40 g

Chlorure d'ammonium (NH_4Cl) 0,50 g

Dissoudre dans l'eau et porter le volume à 1 litre. Le pH de la solution doit être égal à 7,4 ($\pm 0,2$). Si ce n'est pas le cas, préparer une autre solution;

b) Chlorure de calcium dihydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 36,40 g

Dissoudre dans l'eau et porter le volume à 1 litre;

c) Sulfate de magnésium heptahydraté ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22,50 g

Dissoudre dans l'eau et porter le volume à 1 litre;

d) Chlorure de fer (III) hexahydraté ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,25 g

Dissoudre dans l'eau, porter le volume à 1 litre et ajouter une goutte de HCl concentré.

Préparation du milieu minéral

19. Mélanger 10 ml de la solution a) avec environ 800 ml d'eau (paragraphe 17), puis ajouter 1 ml des solutions b), c) et d) et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau (paragraphe 17).

Autres réactifs

20. Acide phosphorique concentré (H_3PO_4) (> 85 % masse par volume).

Solution d'hydroxyde de sodium 7M

21. Dissoudre 280 g d'hydroxyde de sodium (NaOH) dans 1 litre d'eau (paragraphe 17). Déterminer la teneur en carbone inorganique dissous de cette solution et tenir compte de cette valeur dans le calcul du résultat de l'essai (voir paragraphes 55 et 61), notamment en fonction du critère de validité mentionné au paragraphe 66 b). Préparer une nouvelle solution si la concentration en carbone inorganique dissous est trop élevée.

Substance d'essai

22. Préparer une solution mère d'une substance d'essai suffisamment hydrosoluble, dans l'eau (paragraphe 17) ou dans le milieu d'essai (paragraphe 19), à une concentration de préférence 100 fois supérieure à la concentration finale à utiliser dans l'essai; il peut être nécessaire d'ajuster le pH de la solution mère. La solution mère doit être ajoutée au milieu minéral de telle sorte que la concentration finale de carbone organique atteigne entre 2 et 40 mg C/l, de préférence 20 mg C/l. Des concentrations plus faibles que celles mentionnées ci-dessus risquent de diminuer la précision. Les substances liquides solubles et insolubles peuvent être introduites directement dans les récipients à l'aide de seringues à haute précision. Les substances d'essai peu solubles et insolubles peuvent requérir un traitement spécial (25), à choisir parmi les suivants:

a) ajout direct de quantités de poids connu;

b) dispersion aux ultrasons avant l'ajout;

c) dispersion à l'aide d'agents émulsifiants dont il y a lieu d'établir, avant d'ajouter la substance d'essai, s'ils exercent une action inhibitrice ou stimulante sur l'activité microbologique;

d) adsorption des substances d'essai liquides, ou d'une solution de la substance d'essai dans un solvant volatil approprié, sur un milieu ou un support inerte (par exemple un filtre en fibres de verre), suivie par l'évaporation du solvant, le cas échéant, et ajout direct de quantités connues;

e) ajout d'un volume connu d'une solution de la substance d'essai dans un solvant suffisamment volatil pour qu'il s'évapore complètement du récipient, suivi par l'évaporation du solvant.

Il faut vérifier par un essai si les agents ou les solvants utilisés aux points c), d) et e) ont un effet stimulant ou inhibiteur sur l'activité microbiologique [voir paragraphe 42 b)].

Substance de référence

23. Préparer une solution mère de la substance de référence (soluble) dans l'eau (paragraphe 17) à une concentration de référence 100 fois supérieure à la concentration finale (20 mg C/l) à utiliser dans l'essai.

Vérification de l'inhibition

24. Il arrive souvent que les substances d'essai ne se dégradent pas de façon significative dans les conditions appliquées aux évaluations de la biodégradation immédiate. Cela peut résulter du fait que la substance d'essai exerce un effet inhibiteur sur l'inoculum à la concentration à laquelle elle est testée. Une vérification de l'effet inhibiteur peut être incluse dans la conception de l'essai pour faciliter l'identification (rétrospective) de l'inhibition comme l'une des causes possibles ou l'un des facteurs contributifs, soit, au contraire, pour éliminer cette possibilité d'interférences, ce qui démontrerait que la dégradation faible ou nulle n'est imputable qu'au fait que les micro-organismes n'attaquent pas la substance dans les conditions de l'essai. Afin d'obtenir des informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes (aérobies), on prépare une solution contenant la substance d'essai et la substance de référence dans le milieu d'essai (paragraphe 19), chacune à la même concentration que celle à laquelle elles ont été ajoutées dans le milieu d'essai lors de l'essai (voir paragraphes 22 et 23).

Inoculum

25. L'inoculum peut provenir de différentes sources: boues activées, effluents d'eaux usées (non chlorés); eaux de surface et sols; ou d'un mélange de ces milieux (20). Il convient de vérifier l'activité biodégradable de la source à l'aide d'une substance de référence. Quelle que soit la source, il ne faut pas utiliser de micro-organismes ayant déjà été exposés à la substance d'essai pour l'essai de biodégradabilité facile.

Attention: les boues activées, les eaux usées et les effluents d'eaux usées renferment des organismes pathogènes et doivent être manipulés avec précaution.

26. On sait empiriquement que le volume optimal de l'inoculum est celui qui:

- suffit pour fournir une activité biodégradable adéquate,
- dégrade la substance de référence dans le pourcentage stipulé (voir paragraphe 66),
- fournit 10^2 à 10^5 unités formant colonie par millilitre dans le mélange final,
- donne normalement une concentration de 4 mg/l de solides en suspension dans le mélange final lorsqu'on utilise de la boue activée; des concentrations allant jusqu'à 30 mg/l peuvent être utilisées, mais elles risquent d'augmenter sensiblement la production de CO_2 dans les témoins à blanc (26),
- représente moins de 10 % de la concentration initiale de carbone organique introduite par la substance d'essai,
- équivaut généralement à 1 à 10 ml d'inoculum par litre de solution expérimentale.

Boues activées

27. Prélever un échantillon de boue activée dans le bassin d'aération d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire traitant principalement des eaux usées domestiques. Éliminer, si nécessaire, les grosses particules à l'aide d'un tamis (possédant des orifices de 1 mm², par exemple) et conserver ensuite la boue en aérobiose jusqu'à son utilisation.
28. Une autre possibilité consiste, après avoir éliminé toutes les grosses particules, à laisser décanter la boue ou à la centrifuger (par exemple à 1 100 g pendant 10 minutes). Éliminer le surnageant. La boue peut être lavée dans la solution minérale. Suspendre la boue concentrée dans le milieu minéral de façon à obtenir une concentration de 3 à 5 g/l de matières en suspension. Aérer ensuite la suspension jusqu'à son utilisation.
29. La boue doit provenir d'une station d'épuration ordinaire en bon état de fonctionnement. Les boues issues d'une station d'épuration dont le débit est important, ainsi que les boues susceptibles de contenir des inhibiteurs, doivent être lavées. Décanter ou centrifuger la boue remise en suspension après agitation vigoureuse, éliminer le liquide surnageant et resuspendre la boue lavée dans un volume de milieu minéral frais. Répéter cette opération jusqu'à ce que la boue puisse être considérée comme exempte de substrat en excès ou d'inhibiteur.
30. Prélever un échantillon de boue remise en suspension (lorsque la resuspension est complète) ou de boue non traitée juste avant le moment de son utilisation afin de déterminer le poids sec des matières en suspension.

31. Une autre possibilité consiste à homogénéiser la boue activée (entre 3 et 5 g/l de solides en suspension). Passer la boue dans un mélangeur mécanique réglé sur une vitesse moyenne pendant 2 minutes. Laisser reposer la boue homogénéisée pendant 30 minutes, ou plus longtemps si nécessaire, et prélever la phase liquide, qui sera utilisée comme inoculum à raison d'environ 10 ml par litre de milieu minéral.
32. Il est possible d'obtenir une réduction plus importante du dégagement de CO₂ dans le témoin à blanc en aérant la boue toute une nuit avec de l'air exempt de CO₂. Dans cet essai, la concentration de l'inoculum doit s'élever à 4 mg/l de solides de boue activée (13).

Effluent secondaire d'eaux usées

33. L'inoculum peut également provenir de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire recevant principalement des eaux usées domestiques. Conservé en aérobiose, l'échantillon sera utilisé le jour de son prélèvement ou préconditionné si nécessaire. L'effluent doit être filtré à travers un filtre grossier et son pH est mesuré.
34. Pour réduire la teneur en carbone inorganique du filtrat, on fait barboter dans celui-ci de l'air exempt de CO₂ [paragraphe 15 e)] durant 1 heure tout en maintenant le pH à 6,5 avec de l'acide phosphorique (paragraphe 20). La valeur du pH est ramenée à sa valeur de départ avec de l'hydroxyde de sodium (paragraphe 21) et on laisse reposer le filtrat pendant environ 1 heure, avant d'y prélever un volume approprié de surnageant pour l'inoculation. Ce processus de barbotage diminue la teneur de l'inoculum en carbone inorganique. Par exemple, si on utilise le volume maximal recommandé d'effluent filtré et barboté (100 ml) par litre comme inoculum, la quantité de carbone inorganique présente dans les flacons témoins à blanc est comprise entre 0,4 et 1,3 mg/l (14), ce qui représente 2 à 6,5 % du carbone de la substance d'essai à 20 mg C/l et 4 à 13 % à 10 mg C/l.

Eaux de surface

35. Dans une eau de surface adéquate, on prélève un échantillon qui sera conservé en aérobiose et utilisé le jour même. Si nécessaire, l'échantillon est concentré par filtration ou centrifugation. Le volume d'inoculum à utiliser dans chaque récipient expérimental doit satisfaire aux critères énoncés au paragraphe 26.

Sols

36. Prélever un échantillon dans un sol approprié à une profondeur allant jusqu'à 20 cm en dessous de la surface du sol. Il convient d'enlever les pierres, les débris végétaux et les invertébrés de l'échantillon de sol avant de le passer au travers d'un tamis pourvu d'orifices de 2 mm (si l'échantillon est trop mouillé pour pouvoir être tamisé immédiatement, on le sèche partiellement à l'air). Il faut le garder en aérobiose et l'utiliser le jour même (si l'échantillon est transporté dans un sac noir de polythène fermé de manière non hermétique, il peut être conservé à 2 à 4 °C dans ce sac jusqu'à un mois).

Préconditionnement de l'inoculum

37. L'inoculum peut être préconditionné aux conditions expérimentales, mais non préadapté à la substance d'essai. Le préconditionnement peut diminuer le dégagement de CO₂ dans le témoin à blanc. Le préconditionnement consiste à aérer la boue activée, après l'avoir diluée dans le milieu expérimental à 30 mg/l, avec de l'air humide exempt de CO₂ durant 5 à 7 jours à la température de l'essai.

MODE OPÉRATOIRE

Nombre de flacons

38. Le nombre de flacons [paragraphe 15 a)] requis pour un essai dépendra de la fréquence des analyses et de la durée de l'essai.
39. On recommande d'analyser les flacons en trois exemplaires, après un nombre suffisant d'intervalles de temps pour pouvoir identifier la fenêtre des dix jours. On analyse également au moins cinq flacons expérimentaux [paragraphe 15 a)] des séries a), b) et c) (voir paragraphe 42) à la fin de l'essai, afin de pouvoir calculer les intervalles de confiance à 95 % pour le pourcentage moyen de biodégradation.

Milieuensemencé

40. L'inoculum est utilisé à une concentration de 4 mg/l en solides secs de boue activée. Juste avant l'utilisation, préparer une quantité suffisante de milieuensemencé en ajoutant, par exemple, 2 ml de boue activée traitée comme il convient (paragraphe 27 à 32) à une concentration de 2 000 mg/l à 1 litre de milieu minéral (paragraphe 19). Si l'on utilise un effluent secondaire d'eaux usées, ajouter jusqu'à 100 ml d'effluent (paragraphe 33) à 900 ml de milieu minéral (paragraphe 19) et porter à 1 litre avec du milieu.

Préparation des flacons

41. Verser des aliquotes de milieuensemencé dans des flacons identiques en plusieurs exemplaires, de telle sorte que le rapport espace de tête/liquide soit de 1/2 (introduire, par exemple 107 ml dans des flacons de 160 ml de capacité). D'autres rapports peuvent être appliqués, mais il faut tenir compte de l'avertissement donné au paragraphe 11. Quel que soit le type d'inoculum utilisé, on veillera à mélanger correctement le milieuensemencé pour qu'il se répartisse uniformément dans les flacons d'essai.
42. Préparer des séries de flacons [paragraphe 15 a)] destinés aux usages suivants:
 - a) flacons d'essai (F_T) contenant la substance d'essai;
 - b) flacons témoins à blanc (F_B) ne contenant que le milieu expérimental et l'inoculum; tous les produits chimiques, solvants, agents ou filtres en fibres de verre utilisés pour introduire la substance d'essai dans les récipients expérimentaux doivent aussi y être ajoutés;
 - c) flacons contenant la substance de référence (F_C) pour vérifier le procédé;
 - d) si nécessaire, flacons (F_I) pour vérifier un éventuel effet inhibiteur de la substance d'essai contenant à la fois la substance d'essai et la substance de référence aux mêmes concentrations (paragraphe 24) que dans les flacons F_T et F_C respectivement;
 - e) flacons (F_S) pour vérifier une éventuelle dégradation abiotique; il s'agit des flacons (F_T) auxquels on a ajouté 50 mg/l de $HgCl_2$ ou qu'on a stérilisés d'une autre manière (à l'autoclave, par exemple).
43. Les substances d'essai et de référence solubles dans l'eau sont ajoutées aux flacons sous la forme de leurs solutions mères aqueuses (paragraphe 22, 23 et 24), de manière à fournir une concentration de 10 à 20 mg C/l.
44. Les substances d'essai et de référence insolubles sont ajoutées aux flacons de différentes façons [voir paragraphe 22 a) à e)] en fonction de la nature de la substance, avant ou après l'ajout du milieuensemencé, selon la méthode de traitement de la substance. Si l'on utilise l'une des procédures exposées au paragraphe 22 a) à e), les flacons témoins à blanc (F_B) [paragraphe 42 b)] doivent être traités de manière identique, si ce n'est qu'ils ne contiendront ni la substance d'essai ni la substance de référence.
45. Les substances d'essai volatiles doivent être introduites dans des flacons hermétiquement clos (paragraphe 47) au moyen d'une microseringue. La dose est calculée en fonction du volume injecté et de la densité de la substance.
46. Si nécessaire, on ajoutera de l'eau aux flacons, afin que le volume de liquide soit identique dans tous les flacons. On s'assurera que le rapport espace de tête/liquide (généralement de 1/2) et la concentration de la substance d'essai sont tels que l'espace de tête renferme suffisamment d'oxygène pour permettre une biodégradation totale.
47. Tous les flacons sont ensuite fermés hermétiquement, par exemple au moyen de bouchons en caoutchouc butylique et de surcapsules en aluminium. Les substances d'essai volatiles doivent être ajoutées à ce stade (paragraphe 45). S'il y a lieu de mesurer la baisse de concentration du carbone organique dissous dans la solution expérimentale et d'analyser au temps zéro la concentration initiale de carbone inorganique ou d'autres paramètres [témoins stériles, paragraphe 42 e)], on prélève un échantillon approprié du flacon d'essai. Le flacon d'essai et son contenu sont ensuite éliminés.
48. Les flacons hermétiquement clos sont placés sur un agitateur rotatif [paragraphe 15 d)], réglé sur une vitesse d'agitation suffisante pour que le contenu du flacon reste bien mélangé et en suspension (par exemple 150 à 200 tpm), et mis à incuber dans l'obscurité à température constante ($20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$).

Prélèvement

49. Le programme de prélèvement dépendra de la période de latence et de la vitesse de biodégradation de la substance d'essai. Des flacons sont retirés définitivement du dispositif expérimental afin d'être analysés le jour du prélèvement, lequel intervient au moins une fois par semaine ou plus fréquemment (par exemple deux fois par semaine), si une courbe de dégradation complète est requise. On retire le nombre nécessaire de flacons identiques de l'agitateur dans chaque catégorie: F_T , F_B et F_C et, le cas échéant F_I et F_S (voir paragraphe 42). L'essai dure normalement 28 jours. Si la courbe de biodégradation atteint un plateau avant 28 jours, l'essai peut s'arrêter avant 28 jours. Prélever des échantillons dans les cinq flacons réservés aux analyses à effectuer le 28^e jour et utiliser les résultats pour calculer les limites de confiance ou le coefficient de variation du pourcentage de biodégradation. Les flacons destinés à vérifier l'inhibition et la dégradation abiotique ne doivent pas faire l'objet de prélèvements aussi fréquents que les autres flacons; il suffira de deux prélèvements effectués respectivement le 1^{er} jour et le 28^e jour.

Analyse du carbone inorganique

50. On détermine la production de CO_2 dans les flacons en mesurant l'augmentation de la concentration de carbone inorganique durant l'incubation. Deux méthodes, décrites ci-après, sont recommandées pour mesurer la quantité de carbone inorganique produite durant l'essai. Au cours d'un même essai, il ne faudra utiliser qu'une seule méthode, car ces méthodes risquent de donner des résultats légèrement différents.
51. On recommande la méthode (a) si le milieu est susceptible de contenir des résidus, par exemple de papier filtre en verre et/ou d'une substance d'essai insoluble. Cette analyse peut être pratiquée au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse, à défaut d'un analyseur de carbone. Il est important de maintenir les flacons à une température assez proche de la température de l'essai durant l'analyse du gaz de l'espace de tête. La méthode (b) peut s'avérer plus facile à appliquer par les laboratoires qui mesurent le carbone inorganique à l'aide d'un analyseur de carbone. Il importe que la solution d'hydroxyde de sodium (paragraphe 21) utilisée pour convertir le CO_2 en carbonate soit fraîchement préparée ou que sa teneur en carbone inorganique soit connue, de telle sorte que ce paramètre puisse être pris en compte lors du calcul des résultats de l'essai [voir paragraphe 66 b)].

Méthode (a): acidification à $\text{pH} < 3$

52. Avant chaque lot d'analyses, l'analyseur de carbone inorganique est étalonné au moyen d'un étalon de carbone inorganique approprié (par exemple une dilution 1 % poids/poids de CO_2 dans du N_2). Injecter de l'acide phosphorique concentré (paragraphe 20) à travers le bouchon de chaque flacon destiné à un prélèvement, afin d'abaisser le pH du milieu à une valeur < 3 (ajouter, par exemple, 1 ml à 107 ml de milieu expérimental). Remettre les flacons sur l'agitateur. Après avoir subi une agitation d'une heure à la température expérimentale, les flacons sont retirés de l'agitateur. On prélève des aliquotes de gaz (1 ml, par exemple) dans l'espace de tête de chaque flacon et on les injecte dans l'analyseur de carbone inorganique. Les concentrations de carbone inorganique mesurées sont notées en mg C/l.
53. Cette méthode repose sur le principe suivant lequel après l'acidification à $\text{pH} < 3$ et l'équilibrage à 20°C , la constante d'équilibre de la répartition du CO_2 entre les phases liquide et gazeuse des flacons d'essai est égale à 1,0 lorsqu'elle est mesurée sous forme de concentration (13). Cette relation doit être démontrée au moins une fois pour le système expérimental, de la façon suivante:

Préparer des flacons contenant 5 et 10 mg/l de carbone inorganique à l'aide d'une solution de carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3) dans de l'eau exempte de CO_2 [préparer cette eau en l'acidifiant à pH 6,5 avec de l'acide phosphorique concentré (paragraphe 20), en y faisant barboter de l'air exempt de CO_2 toute une nuit et en ramenant le pH à une valeur neutre avec un produit alcalin]. S'assurer que le rapport volumique espace de tête/liquide est le même que dans les essais (1/2, par exemple). Acidifier et équilibrer comme indiqué au paragraphe 52 et mesurer les concentrations de carbone inorganique dans l'espace de tête et dans la phase liquide. Vérifier que les deux concentrations sont identiques, à l'erreur expérimentale près. Si elles ne le sont pas, l'expérimentateur devra réexaminer les procédures. Il n'est pas nécessaire de vérifier la répartition du carbone inorganique entre les phases liquide et gazeuse à chaque essai; cette vérification pourrait être effectuée au cours de l'étalonnage.

54. S'il y a lieu de mesurer la disparition de carbone organique dissous (substances d'essai hydrosolubles uniquement), des échantillons sont prélevés dans la phase liquide de flacons séparés (non acidifiés), filtrés sur une membrane et injectés dans l'analyseur de carbone organique dissous. Ces flacons peuvent servir à d'autres analyses, si nécessaire, permettant de mesurer la biodégradation primaire.

Méthode (b): conversion du CO_2 en carbonate

55. Avant chaque lot d'analyses, l'analyseur de carbone inorganique est étalonné au moyen d'un étalon adéquat, par exemple une solution de bicarbonate de sodium (NaHCO_3) dans de l'eau exempte de CO_2 (voir paragraphe 53), à une concentration de 0 à 20 mg de carbone inorganique/litre. Injecter une solution d'hydroxyde de sodium (7M, paragraphe 21) (par exemple à raison d'1 ml pour 107 ml de milieu) à travers le bouchon de chaque flacon destiné à un prélèvement et agiter les flacons durant une heure à la température de l'essai. On utilise la même solution de NaOH dans tous les flacons retirés définitivement un jour donné, mais pas nécessairement pour tous les prélèvements effectués tout au long de l'essai. Si les valeurs absolues de la teneur en carbone inorganique des témoins à blanc sont requises à chaque prélèvement, il faudra déterminer la teneur en carbone inorganique de la solution de NaOH chaque fois qu'elle est utilisée. Enlever les flacons de l'agitateur et laisser reposer. Extraire un volume approprié (50 à 1 000 μl , par exemple) de la phase liquide de chaque flacon à l'aide d'une seringue. Injecter les échantillons dans l'analyseur de carbone inorganique et enregistrer les concentrations de carbone inorganique. On s'assurera que l'analyseur employé se prête au traitement des échantillons alcalins obtenus par cette méthode.
56. Cette méthode repose sur le principe selon lequel après l'ajout d'une solution alcaline et agitation, la concentration de carbone inorganique dans l'espace de tête est négligeable. Cela doit être vérifié au moins une fois pour le système expérimental. Il faut, pour ce faire, utiliser des étalons de carbone inorganique, ajouter une solution basique et équilibrer, et mesurer la concentration de carbone inorganique dans l'espace de tête et dans la phase liquide (voir paragraphe 53). La concentration dans l'espace de tête devrait avoisiner zéro. Il n'est pas nécessaire de vérifier cette absorption pratiquement complète de CO_2 à chaque essai.
57. Si la disparition de carbone organique dissous (substances d'essai hydrosolubles uniquement) est à mesurer, des échantillons sont prélevés dans la phase liquide de flacons séparés (ne contenant pas de produit alcalin ajouté), filtrés sur une membrane et injectés dans l'analyseur de carbone organique dissous. Ces flacons peuvent servir à d'autres analyses, si nécessaire, pour mesurer la biodégradation primaire.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Calcul des résultats

58. En supposant que la substance d'essai a été minéralisée à 100 % en CO₂, la production maximale théorique de carbone inorganique (ThCI) des flacons d'essai excédant celle des témoins à blanc est égale au carbone organique total (COT) ajouté dans chaque flacon d'essai au début de l'essai, autrement dit:

$$\text{ThCI} = \text{COT}$$

La masse totale (mg) de carbone inorganique (CIT) dans chaque flacon est:

$$\text{CIT} = (\text{mg de C dans le liquide} + \text{mg de C dans l'espace de tête}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{Équation [1]}$$

où:

V_L = volume de liquide dans le flacon (litre);

C_L = concentration de carbone inorganique dans le liquide (carbone en mg/l);

V_H = volume de l'espace de tête (litre);

C_H = concentration de carbone inorganique dans l'espace de tête (carbone en mg/l).

Les calculs du CIT pour les deux méthodes analytiques utilisées pour mesurer le carbone inorganique dans cet essai sont décrits ci-dessous aux paragraphes 60 et 61. Le pourcentage de biodégradation (% D) dans chaque cas est donné par l'équation suivante:

$$\%D = \frac{(\text{CIT}_t - \text{CIT}_b)}{\text{COT}} \times 100 \quad \text{Équation [2]}$$

où:

CIT_t = mg de CIT dans le flacon d'essai au temps t;

CIT_b = la moyenne des mg de CIT dans les flacons témoins à blanc au temps t;

COT = mg de COT ajoutés initialement au flacon d'essai.

Le pourcentage de biodégradation (% D) est calculé pour les flacons d'essai (F_T) et de référence (F_C) et, le cas échéant, les flacons (F_I) destinés à la vérification d'un éventuel effet inhibiteur, à partir des quantités respectives de carbone inorganique total produites jusqu'à chaque temps de prélèvement.

59. Une augmentation significative de la teneur en CIT dans les témoins stériles (F_S) durant l'essai permet de conclure à une dégradation abiotique de la substance d'essai et il faut en tenir compte dans le calcul de D dans l'équation [2].

Acidification à pH < 3

60. L'acidification à pH < 3 et l'équilibre entraînant l'égalesation de la concentration de CIT entre les phases liquide et gazeuse, seule la concentration de carbone inorganique dans la phase gazeuse doit être mesurée. Aussi, d'après l'équation [1], $\text{CIT} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, où V_B = est le volume du flacon de sérum.

Conversion du CO₂ en carbonate

61. Dans cette méthode, les calculs sont effectués conformément à l'équation [1], mais la quantité négligeable de carbone inorganique dans la phase gazeuse est ignorée, de sorte que $V_H \times C_H = 0$, et $CIT = V_L \times C_L$.

Expression des résultats

62. On trace une courbe de biodégradation en reportant le pourcentage de biodégradation, D, en fonction du temps d'incubation, courbe qui indiquera, si possible, la phase de latence, la phase de biodégradation, la fenêtre des dix jours et la phase plateau, c'est-à-dire la phase durant laquelle la dégradation a atteint son maximum et où la courbe de biodégradation marque un palier. Si des résultats comparables sont obtenus pour les flacons d'essai (F_T) testés en parallèle (< 20 % de différence), on trace une courbe moyenne (voir appendice 2, figure 1); dans le cas contraire, on trace une courbe pour chaque flacon d'essai. On détermine la valeur moyenne du pourcentage de biodégradation dans la phase plateau ou on évalue sa valeur maximale (par exemple si la courbe fléchit dans la phase plateau), mais il est important d'estimer si, dans ce dernier cas, la valeur n'est pas nettement divergente. Ce niveau maximal de biodégradation doit être mentionné en tant que "degré de biodégradation de la substance d'essai" dans le rapport d'essai. Si le nombre de flacons d'essai s'est avéré insuffisant pour préciser une phase plateau, on utilise les données mesurées du dernier jour de l'essai pour calculer une valeur moyenne. Cette dernière valeur, la moyenne de cinq essais identiques, sert à indiquer la précision avec laquelle le pourcentage de biodégradation a été déterminé. La valeur obtenue au terme de la fenêtre des dix jours doit également figurer dans le rapport.
63. Tracer, de la même manière, une courbe pour la substance de référence, F_C , et, le cas échéant, pour la vérification de la dégradation abiotique F_S et pour le contrôle de l'inhibition, F_I .
64. Les quantités de CIT présentes dans les témoins à blanc (F_B) sont consignées, de même que celles présentes dans les flacons F_S , si ces flacons sont inclus dans le système expérimental.
65. Calculer D pour les flacons F_T , d'après le rendement théorique escompté en carbone inorganique provenant uniquement de la substance de référence du mélange. Si, au 28^e jour, $([D_{FC} (^{(1)}) - DF_I (^{(2)})]/D_{FC}) \times 100 > 25 \%$, il est permis de supposer que la substance d'essai a inhibé l'activité de l'inoculum, ce qui peut expliquer les faibles valeurs de D_{FT} obtenues dans les conditions de l'essai. Dans ce cas, l'essai pourrait être répété avec une concentration d'essai plus faible, et en réduisant de préférence le carbone inorganique dissous (CID) dans l'inoculum et le CIT formé dans les témoins à blanc, car une diminution de la concentration de la substance d'essai amoindrirait la précision de la méthode. Un autre inoculum peut également être utilisé. Si la quantité de CIT dans le flacon F_S (dégradation abiotique) montre une augmentation significative (> 10 %), il se peut qu'une dégradation abiotique ait eu lieu.

Validité des résultats

66. Un essai est considéré comme valable si:
- a) le pourcentage moyen de dégradation dans les flacons F_C contenant la substance de référence est > 60 % au 14^e jour de l'incubation; et
 - b) la quantité moyenne de CIT présente dans les témoins à blancs F_B à la fin de l'essai est > 3 mg C/l.

Si ces limites ne sont pas atteintes, on répétera l'essai avec un inoculum provenant d'une autre source et/ou on révisera les procédures appliquées. Par exemple, si une production élevée de carbone inorganique dans le témoin à blanc pose un problème, il convient de suivre la procédure exposée aux paragraphes 27 à 32.

67. Si la substance d'essai ne fournit pas 60 % de la production maximale théorique de carbone inorganique (ThCI) et qu'il a été démontré qu'elle n'exerce aucun effet inhibiteur (paragraphe 65), l'essai peut être répété avec une concentration accrue d'inoculum (jusqu'à 30 mg/l de boue activée et 100 ml d'effluent/l) ou avec un inoculum provenant d'autres sources, en particulier si la dégradation a atteint une valeur comprise entre 20 et 60 %.

Interprétation des résultats

68. Si une substance d'essai atteint une biodégradation > 60 % de la ThCI dans la fenêtre des dix jours au cours de cet essai, cela démontre qu'elle est facilement biodégradable en aérobiose.
69. Si la valeur de seuil de 60 % de la ThCI n'a pas été atteinte, on mesure le pH du milieu des flacons qui n'ont pas été acidifiés ou alcalinisés; une valeur inférieure à 6,5 pourrait indiquer qu'une nitrification a eu lieu. Dans ce cas, on répète l'essai avec une solution tampon plus concentrée.

⁽¹⁾ Le pourcentage de dégradation dans les flacons F_C contenant la substance de référence.

⁽²⁾ Le pourcentage de dégradation dans les flacons F_I .

Rapport d'essai

70. Dresser un tableau du pourcentage de dégradation (% D) relevé dans chaque flacon d'essai (F_T), de référence (F_C) et, le cas échéant, de vérification de l'inhibition (F_I) pour chaque jour de prélèvement. Si les flacons identiques livrent des résultats comparables, tracer une courbe du % D moyen en fonction du temps. Noter la quantité de carbone inorganique total dans les témoins à blanc (F_B) et dans les témoins stériles (F_S), de même que le carbone organique dissous et/ou d'autres paramètres, ainsi que leur pourcentage de disparition.
71. Déterminer la valeur moyenne du % D dans la phase plateau ou utiliser la valeur maximale si la courbe de biodégradation fléchit dans la phase plateau et rapporter cette valeur en tant que "degré de biodégradation de la substance d'essai". Il importe de vérifier que dans ce dernier cas, la valeur la plus élevée n'est pas nettement divergente.
72. Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes:

Substance d'essai:

- nom courant, nom chimique, numéro CAS, formule structurale et propriétés physico-chimiques pertinentes,
- pureté (impuretés) de la substance d'essai.

Conditions expérimentales:

- référence à la présente méthode d'essai,
- description du système expérimental utilisé (par exemple, volume du flacon, rapport espace de tête/liquide, méthode d'agitation, etc.),
- ajout de la substance d'essai et de la substance de référence dans le système expérimental: concentration appliquée et quantité de carbone mesurée dans chaque flacon d'essai, et, le cas échéant, solvants utilisés,
- détails sur l'inoculum utilisé, traitement préalable et préconditionnement éventuels,
- température d'incubation,
- validation du principe de l'analyse du carbone inorganique,
- principales caractéristiques de l'analyseur de carbone inorganique employé (et de toute autre méthode d'analyse utilisée),
- nombre de répétitions.

Résultats:

- données brutes et valeurs calculées de la biodégradabilité présentées dans un tableau,
- graphique du pourcentage de dégradation en fonction du temps pour les substances d'essai et de référence, phase de latence, phase de dégradation, fenêtre des dix jours et pente,
- pourcentage de disparition au niveau du plateau, à la fin de cet essai et après la fenêtre des dix jours,
- justification en cas de rejet des résultats expérimentaux,
- tout autre fait se rapportant à la procédure utilisée,
- analyse des résultats.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Chapitre C.4 de la présente annexe Détermination de la biodégradabilité "facile" - Essai de dégagement de CO₂ (Méthode C.4-C).
- (2) Sturm R.N. (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A., Oil Chem Soc. 50: 159-167.
- (3) Larson R.J. (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.
- (4) Larson R.J., Hansmann M.A. and Bookland E.A. (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.
- (5) ISO 9439 (1990; révisée en 1999). Qualité de l'eau – Évaluation de la biodégradabilité aérobie ultime en milieu aqueux des composés organiques – Essai de dégagement de dioxyde de carbone (Sturm).
- (6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (8) Gledhill W.E. (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.
- (9) Weytjens D., Van Ginneken I. and Painter H.A. (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.
- (10) Ennis D.M. and Kramer A. (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.
- (11) Ennis D.M., Kramer A., Jameson C.W., Mazzocchi P.H. and Bailey P.H. (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.
- (12) Boatman R.J., Cunningham S.L. and Ziegler D.A. (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.
- (13) Struijs J. and Stoltenkamp J. (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.
- (14) Birch R.R. and Fletcher R.J. (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.
- (15) Birch R.R., Biver C., Campagna R., Gledhill W.E., Pagga U., Steber J., Reust H., and Bontinck W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.
- (16) ISO 14593, (1999) Qualité de l'eau – Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques – Méthode par analyse du carbone inorganique dans des récipients hermétiquement clos (essai au CO₂ – espace de tête).
- (17) Battersby N.S. (1997). The ISO headspace CO₂ biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.
- (18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.
- (19) Battersby N.S., Ciccognani D., Evans M.R., King D., Painter H.A., Peterson D.R. and Starkey M. (1999). An "inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

- (20) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité "facile".
 - (21) OCDE (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.
 - (22) Chapitre C.11 de la présente annexe, Boues activées: essai d'inhibition de la respiration.
 - (23) Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M.J. and Dekkers A.L.M. (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.
 - (24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO₂ method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.
 - (25) ISO 10634 (1996) Qualité de l'eau – Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.
-

Appendice 1

ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS

CI: carbone inorganique.

ThCO₂: production théorique de CO₂ (mg); correspond à la quantité de dioxyde de carbone calculée à partir de la teneur en carbone connue ou mesurée de la substance d'essai, qui doit se dégager lors de la minéralisation complète de celle-ci; également exprimée en mg de dioxyde de carbone dégagé par mg de substance d'essai.

COD: le carbone organique dissous est le carbone organique présent en solution ou qui traverse un filtre à pores de 0,45 micron ou encore qui reste dans le surnageant après une centrifugation de 15 minutes à environ 4 000 g (40 000 m sec⁻²).

CID: carbone inorganique dissous.

ThCI: production théorique de carbone inorganique.

CIT: carbone inorganique total.

Facilement biodégradable: classification arbitraire des produits chimiques qui ont répondu positivement à certains essais de dépistage spécifiques portant sur la biodégradabilité ultime; du fait de la rigueur de ces essais, on admet que de tels composés se dégraderont rapidement et complètement en milieu aquatique dans des conditions aérobies.

Fenêtre des dix jours: les dix jours qui suivent immédiatement le moment où le taux de biodégradation atteint 10 %.

Biodégradabilité intrinsèque: classification des produits chimiques pour lesquels une biodégradation (primaire ou finale) se manifeste sans ambiguïté au cours d'un quelconque essai de biodégradabilité.

Biodégradation ultime en aérobiose: niveau de dégradation atteint lorsque la totalité de la substance d'essai a été utilisée par des micro-organismes pour produire du dioxyde de carbone, de l'eau, des sels minéraux et de nouveaux constituants cellulaires microbiologiques (biomasse).

Minéralisation: dégradation complète d'un composé organique en CO₂ et en H₂O dans des conditions aérobies, et en CH₄, CO₂ et H₂O dans des conditions anaérobies.

Phase de latence: correspond à la période qui commence au début de l'essai et s'achève au moment où les micro-organismes dégradants se sont acclimatés et/ou adaptés et où le degré de biodégradation d'une substance chimique ou d'une matière organique a atteint un niveau détectable (par exemple 10 % de la biodégradation maximale théorique, ou moins, suivant la précision de la technique de mesure).

Phase de dégradation: correspond à la période qui commence à la fin de la phase de latence et se termine au moment où on atteint 90 % du taux maximal de dégradation.

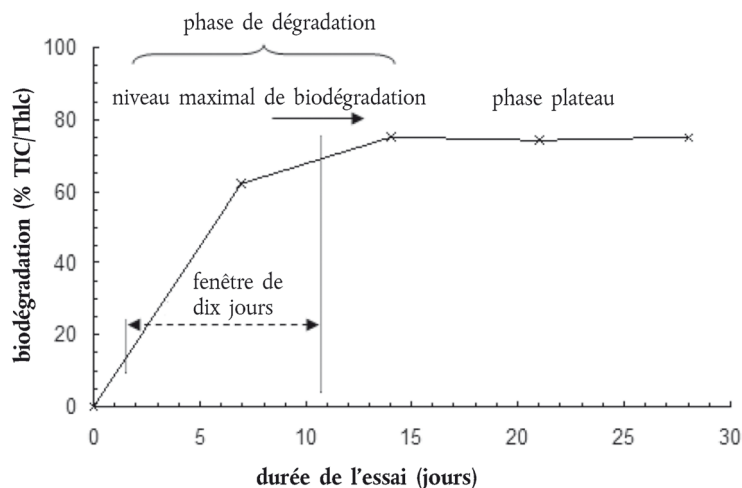
Phase plateau: phase au cours de laquelle la dégradation atteint sa valeur maximale et où la courbe de biodégradation marque un palier.

Substance d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Appendice 2

Exemple de courbe de biodégradation

Figure 1

Biodégradation du 1-octanol au cours de l'essai de l'espace de tête (dégagement de CO₂)

Glossaire

biodégradation.

phase de dégradation.

niveau maximal de biodégradation.

phase plateau.

fenêtre de dix jours.

durée de l'essai (jours).

C. 30. BIOACCUMULATION CHEZ LES OLIGOCHÈTES TERRESTRES

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 317 (2010) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Parmi les méthodes d'essai relatives au devenir environnemental, celles intitulées "Bioconcentration: essai avec renouvellement continu sur les poissons" [chapitre C.13 de la présente annexe (49)] et "Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fouisseurs" (53) ont été publiées, respectivement, en 1996 et en 2008. Il est difficile voire impossible d'extrapoler aux organismes terrestres comme les vers de terre les données sur la bioaccumulation en milieu aquatique. Des calculs de modèles fondés sur la lipophilie d'une substance d'essai, voir par exemple (14) ou (37), sont actuellement utilisés pour évaluer la bioaccumulation des substances chimiques dans le sol, notamment dans le document d'orientation technique de l'Union européenne (19). La nécessité d'appliquer une méthode d'essai comportant des compartiments spécifiques a déjà été exposée (55). Une telle méthode est particulièrement importante pour évaluer l'empoisonnement secondaire dans les chaînes alimentaires terrestres (4). Plusieurs méthodes d'essai nationales portent sur la bioaccumulation chez les organismes autres que les poissons, par exemple (2) et (72). Une méthode d'évaluation de la bioaccumulation chez les vers de terre (*Eisenia fetida*, Savigny) et les enchytrées dans des sols contaminés a été élaborée par l'American Society for Testing and Materials (ASTM) (3). Une méthode internationalement reconnue visant à déterminer la bioaccumulation dans un sol chargé permettra de mieux évaluer les risques des produits chimiques pour les écosystèmes terrestres, notamment (25) et (29).
2. Les invertébrés géophages sont exposés aux substances chimiques présentes dans le sol. Au nombre de ces animaux, les oligochètes terrestres jouent un rôle important dans la structure et la fonction des sols (15) (20). Les oligochètes terrestres vivent dans le sol et, partiellement, à sa surface (notamment sur la litière); ils représentent fréquemment l'espèce la plus abondante en termes de biomasse (54). Leur rôle dans la bioturbation du sol et leur fonction de proies confèrent à ces animaux une influence considérable sur la biodisponibilité des substances chimiques pour d'autres organismes comme les prédateurs invertébrés [dont les acariens et les coléoptères; voir notamment (64)] ou vertébrés [dont les renards et les mouettes (18) (62)]. Certaines espèces d'oligochètes terrestres actuellement utilisées dans les essais écotoxicologiques sont décrites à l'appendice 5.

3. Le guide de l'ASTM sur les essais en laboratoire consacrés à la toxicité du sol ou à la bioaccumulation chez les vers de terre *Eisenia fetida* et les enchytrées *Enchytraeus albidus* (3) fournit nombre d'informations essentielles qui ont servi à mettre en œuvre la méthode d'essai exposée ici sur la bioaccumulation dans le sol. Parmi les autres références citées dans la présente méthode d'essai figurent le chapitre C.13 de la présente annexe, intitulé "Bioconcentration: essai avec renouvellement continu sur les poissons" (49) et la ligne directrice 315 de l'OCDE intitulée "Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fouisseurs" (53). Des expériences pratiques tirées d'études et de diverses publications sur la bioaccumulation dans le sol, dont (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79), ont également largement inspiré la présente méthode d'essai.
4. Cette méthode d'essai s'applique essentiellement aux substances chimiques organiques neutres, stables, qui ont tendance à être adsorbées dans le sol. Elle permet également d'évaluer la bioaccumulation de composés organométalliques stables, associés au sol. Cette méthode s'applique aussi aux métaux et autres éléments présents à l'état de traces.

PRÉREQUIS

5. Les essais visant à mesurer la bioaccumulation d'une substance dans les oligochètes terrestres ont été réalisés avec des métaux lourds [voir notamment (63)] et des substances organiques persistantes dont le $\log K_{ow}$ (K_{oe}) se situe entre 3,0 et 6,0 (40). Ces essais s'appliquent également aux:
 - substances dont le $\log K_{ow}$ est supérieur à 6,0 (substances super-hydrophobes),
 - substances appartenant à la classe des substances organiques connues pour leur potentiel de bioaccumulation dans les organismes vivants, par exemple les substances fortement adsorbantes ou tensio-actives,
 - substances qui présentent un potentiel de bioaccumulation de par leurs caractéristiques structurales (analogues des substances dont le potentiel de bioaccumulation est connu),
 - métaux.
6. Avant de débiter toute étude, il convient de disposer de certaines informations sur la substance d'essai, comme le nom courant, le nom chimique (de préférence le nom IUPAC), la formule structurale, le numéro CAS, la pureté, les mesures de sécurité, les conditions de stockage appropriées et les méthodes d'analyse. Il faut aussi connaître les propriétés suivantes de la substance:
 - a) solubilité dans l'eau;
 - b) coefficient de partage octanol-eau, K_{ow} ;
 - c) coefficient de partage sol-eau, exprimé par K_{oc} ;
 - d) pression de vapeur;
 - e) dégradabilité (dans le sol ou l'eau notamment);
 - f) métabolites connus.
7. Il est possible d'utiliser des substances d'essai radiomarquées ou non. Cependant, l'utilisation de substances radiomarquées est recommandée car elle facilite l'analyse. La décision d'y recourir dépendra des limites de détection ou de la nécessité de mesurer le composé parent et les métabolites. Dans le cas où une substance radiomarquée est utilisée et où le total des résidus radioactifs est mesuré, il est important que les résidus radiomarqués tant dans le sol que dans les organismes d'essai soient définis en pourcentages de la substance d'essai parente et de la substance marquée non-parente, par exemple dans des échantillons prélevés à un état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption, pour permettre de calculer le facteur de bioaccumulation (FBA) pour la substance d'essai parente et les métabolites du sol pertinents (voir paragraphe 50). Il peut s'avérer nécessaire de modifier la méthode décrite ici, en particulier en vue de disposer d'une biomasse suffisante pour mesurer les substances d'essai organiques non-radiomarquées ou les métaux. Lorsque le total des résidus radioactifs est mesuré (par comptage en scintillation liquide après extraction, combustion ou solubilisation des tissus), le facteur de bioaccumulation est basé sur la substance d'essai parente et sur les métabolites. Il est préférable que le FBA soit calculé sur la base de la concentration de la substance d'essai parente dans les organismes et du total des résidus radioactifs. Ensuite, le facteur d'accumulation biota-sol (BSAF) (*biota-soil accumulation factor*), normalisé par rapport à la teneur en lipides des vers et à la teneur en carbone organique (CO) du sol, est calculé à partir du FBA pour garantir la comparabilité des résultats de différents essais de bioaccumulation.

8. Il convient que la toxicité de la substance d'essai envers les espèces utilisées dans l'essai soit connue, notamment la concentration d'effet (CE_x) ou la concentration létale (CL_x) pour la durée de la phase d'absorption [(19) par exemple]. La concentration de la substance d'essai représente de préférence environ 1 % de sa CL_{50} aiguë asymptotique, et elle est au moins dix fois supérieure à sa limite de détection dans le sol par la méthode d'analyse utilisée. La préférence est donnée, lorsqu'elles sont disponibles, aux valeurs de toxicité issues d'études à long terme sur les effets sublétaux observés (51) et (52). Si ces données ne sont pas disponibles, un essai de toxicité aiguë apportera des informations utiles [voir notamment (23)].
9. Il est nécessaire de disposer d'une méthode d'analyse appropriée, dont on connaît l'exactitude, la précision et la sensibilité pour quantifier la substance dans les solutions d'essai, dans le sol et dans le matériel biologique; il est aussi nécessaire de disposer des détails de la préparation et du stockage des échantillons, et des fiches de données de sécurité des substances. Il convient également de connaître les limites de détection analytiques de la substance d'essai dans le sol et les tissus du ver. Si une substance d'essai marquée au ^{14}C est utilisée, il est nécessaire de connaître aussi la radioactivité spécifique (c'est-à-dire en Bq.mol⁻¹) et le pourcentage de radioactivité associé aux impuretés. La radioactivité spécifique de la substance d'essai sera suffisamment élevée pour faciliter l'analyse et les concentrations d'essai utilisées ne provoqueront pas d'effets toxiques.
10. L'essai peut être réalisé sur sol naturel ou artificiel. Avant le début de l'essai, il convient de connaître les caractéristiques du sol naturel utilisé, par exemple son origine ou ses constituants, son pH, sa teneur en carbone organique, sa distribution granulométrique (pourcentages de sable, de limon et d'argile), et sa capacité de rétention d'eau (CRE) (3) (48).

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. Les paramètres qui caractérisent la bioaccumulation d'une substance d'essai se composent du facteur de bioaccumulation (FBA), de la constante de vitesse d'absorption (k_a) et de la constante de vitesse d'élimination (k_e). L'appendice 1 donne des définitions détaillées de ces paramètres.
12. L'essai consiste en deux phases, la phase d'absorption (exposition) et la phase d'élimination (postexposition). Durant la phase d'absorption, des groupes répliqués de vers sont exposés au sol chargé avec la substance d'essai. En plus des animaux d'essai, des groupes témoins de vers sont conservés dans des conditions identiques, sans la substance d'essai. Le poids sec et la teneur en lipides des organismes d'essai sont mesurés. Pour ce faire, on peut utiliser des vers du groupe témoin. Les valeurs de fond analytiques (essai à blanc) peuvent être obtenues en analysant des échantillons des vers et du sol témoins. Pour la phase d'élimination, les vers sont transférés dans un sol dépourvu de la substance d'essai. Une phase d'élimination est toujours nécessaire sauf si l'absorption de la substance d'essai au cours de la phase d'exposition s'avère être non significative. Elle permet de recueillir des informations sur la vitesse à laquelle la substance d'essai est excrétée par l'organisme d'essai (27). Si un état stationnaire n'a pas été atteint durant la phase d'absorption, il est préférable de déterminer les paramètres cinétiques – constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, facteur de bioaccumulation cinétique FBAK – en s'appuyant sur l'ajustement simultané des résultats des phases d'absorption et d'élimination. La concentration de la substance d'essai dans ou sur les vers est contrôlée pendant toute la durée des deux phases de l'essai.
13. Durant la phase d'absorption, des mesures sont effectuées pendant des temps de prélèvement pouvant durer jusqu'à 14 jours (enchytrées) ou 21 jours (vers de terre) jusqu'à ce que l'état stationnaire soit atteint (11) (12) (67). On identifie un état stationnaire lorsque le tracé de la concentration dans les vers en fonction du temps est parallèle à l'axe du temps, et lorsque trois analyses successives de la concentration réalisées sur des échantillons prélevés à des intervalles d'au moins deux jours ne diffèrent pas de plus de $\pm 20\%$ l'une par rapport à l'autre sur la base de comparaisons statistiques (par exemple, analyse de la variance, analyse de la régression).
14. La phase d'élimination consiste à transférer les organismes d'essai dans des récipients qui contiennent un substrat identique, mais sans la substance d'essai. Durant la phase d'élimination, les mesures sont réalisées pendant des durées pouvant aller jusqu'à 14 jours (enchytrées) ou 21 jours (vers de terre), à moins qu'une détermination analytique antérieure n'ait mis en évidence une diminution de 90 % des résidus de substance d'essai dans les vers. La concentration de la substance d'essai dans les vers à la fin de la phase d'élimination est consignée comme résidu non éliminé. Le facteur de bioaccumulation à l'état stationnaire (*steady state*) (FBAs) est calculé de préférence à la fois comme le rapport de la concentration dans les vers (C_a) à celle dans le sol (C_s) à un état stationnaire apparent, et comme un facteur de bioaccumulation cinétique (FBAK), c'est-à-dire comme le rapport de la constante de vitesse d'absorption à partir du sol (k_a) à la constante de vitesse d'élimination (k_e) (voir l'appendice 1 pour les définitions) en supposant une cinétique du premier ordre (voir l'appendice 2 pour les calculs). Si la cinétique du premier ordre n'est manifestement pas applicable, il convient d'employer d'autres modèles.
15. La constante de vitesse d'absorption, la constante de vitesse d'élimination (ou les constantes, si d'autres modèles ont été utilisés), le facteur de bioaccumulation cinétique (FBAK), et lorsque cela est possible, les limites de confiance de chacun de ces paramètres, sont calculés à partir d'équations de modèles à l'aide de programmes informatiques (voir l'appendice 2). La qualité de l'ajustement d'un modèle peut être déterminée à partir du coefficient de corrélation ou du coefficient de détermination (des coefficients proches de 1 indiquent une bonne qualité d'ajustement) ou de la loi du chi-deux. De plus la grandeur de l'écart-type ou de l'intervalle de confiance autour des paramètres estimés peut donner une bonne indication de la qualité de l'ajustement du modèle.
16. Pour réduire la variabilité des résultats pour les substances de lipophilie élevée, les facteurs de bioaccumulation sont exprimés par rapport à la teneur en lipides et à la teneur en carbone organique [teneur en kg de carbone organique (CO) du sol par teneur en kg de lipides des vers]. Cette approche s'appuie sur le fait que, pour certaines classes chimiques, il existe une relation claire entre le potentiel de bioaccumulation et la lipophilie;

cette relation a été clairement établie pour le poisson (47). Il existe une relation entre la teneur en lipides du poisson et la bioaccumulation de ces substances. Pour les organismes benthiques, des corrélations similaires ont été trouvées [voir notamment (30) (44)]. Cette corrélation a également été démontrée pour les oligochètes terrestres (5) (6) (7) (14). Si on dispose de suffisamment de tissu de vers, il est possible de déterminer la teneur en lipides des animaux d'essai sur le même matériel biologique que celui utilisé pour déterminer la concentration de la substance d'essai. Il est également possible de mesurer la teneur en lipides en utilisant des animaux témoins.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

17. Pour qu'un essai soit valable, les critères suivants seront remplis tant concernant les animaux témoins que les animaux traités:

- à l'issue de l'essai, la mortalité totale au cours des phases d'absorption et d'élimination ne dépasse pas 10 % (vers de terre) ou 20 % (enchytrées) du nombre total de vers introduits,
- avec *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*, la perte de poids moyenne mesurée à la fin des phases d'absorption et d'élimination ne dépasse pas 20 % du poids frais initial au début de chaque phase.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Espèces d'essai

18. Différentes espèces d'oligochètes terrestres sont recommandées pour les essais sur la bioaccumulation. Les espèces les plus couramment employées, *Eisenia fetida* ou *Eisenia andrei* (vers de terre) ou encore *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* ou *Enchytraeus luxuriosus* (enchytrées), sont décrites à l'appendice 5.

Appareillage

19. Il convient d'éviter avec soin d'utiliser pour l'appareillage des matériaux susceptibles de dissoudre ou d'adsorber la substance d'essai ou de laisser s'échapper des substances ayant un effet délétère sur les animaux d'essai. Il est possible d'utiliser des récipients rectangulaires ou cylindriques standard, faits dans un matériau chimiquement inerte et d'une capacité adaptée, conforme au taux de charge, c'est-à-dire au nombre de vers d'essai. De l'acier inoxydable, du plastique ou du verre peut être utilisé pour tout équipement entrant en contact avec le milieu d'essai. Les récipients d'essai devront être fermés de manière appropriée, pour éviter que les vers ne s'échappent, tout en assurant un apport d'air suffisant. Du verre silanisé peut s'avérer nécessaire pour des substances de coefficient d'adsorption élevé comme les pyrèthroides synthétiques. Dans ces cas de figure, l'équipement devra être jeté après usage (49). Il conviendra d'éviter l'évaporation des substances radiomarquées et des substances chimiques volatiles. On utilisera des pièges (par exemple des flacons de lavage des gaz) contenant un absorbant permettant de capter d'éventuels résidus susceptibles de s'évaporer des récipients d'essai.

Sol

20. Il convient que le sol d'essai soit être d'une qualité permettant la survie et de préférence la reproduction des organismes d'essai durant les périodes d'acclimatation et d'essai, sans qu'ils ne présentent un aspect ou un comportement anormal. Les vers devront pouvoir s'enfouir dans le sol.
21. Il est recommandé d'utiliser comme substrat lors des essais le sol artificiel décrit au chapitre C.8 de la présente annexe (48). La préparation du sol artificiel en vue d'essais sur la bioaccumulation est décrite à l'appendice 4, où figurent également des recommandations relatives au stockage de ce sol artificiel. Tout sol artificiel séché à l'air peut être stocké à température ambiante jusqu'à son utilisation.
22. Toutefois, il est possible d'utiliser des sols naturels provenant de sites non pollués comme sol d'essai et/ou d'élevage. Les sols naturels sont caractérisés au moins par leur origine (site de prélèvement), leur pH, leur teneur en carbone organique, leur distribution granulométrique (pourcentage de sable, de limon et d'argile), leur capacité maximale de rétention d'eau (CREmax), et leur teneur en eau (3). La recherche de micropolluants dans le sol ou dans ses constituants, préalablement à son utilisation, devrait fournir des informations utiles. En cas d'utilisation d'un sol naturel prélevé sur des terres agricoles, il convient que ce dernier n'ait pas été traité avec des produits phytopharmaceutiques ou n'ait pas fait l'objet d'un épandage de fumier d'animaux traités pendant au moins un an avant l'échantillonnage, ou d'un épandage d'engrais organiques pendant au moins six mois avant l'échantillonnage (50). Les procédures de manipulation des sols naturels avant utilisation dans le cadre d'essais écotoxicologiques sur des oligochètes en laboratoire sont décrites dans le document de l'ASTM (3). La durée de stockage des sols naturels au laboratoire est aussi courte que possible.

Application de la substance d'essai

23. La substance d'essai est incorporée dans le sol. Il convient de prendre en compte les propriétés physico-chimiques de cette substance. Une substance d'essai soluble dans l'eau est entièrement dissoute dans l'eau avant d'être mélangée au sol. La procédure de chargement recommandée pour les substances d'essai peu solubles dans l'eau consiste à enrober un ou plusieurs des constituants du sol (artificiel) avec la substance d'essai. Par exemple, le sable de quartz, ou une portion de celui-ci, peut être trempé dans une solution de la

substance

d'essai dans un solvant organique adapté, lequel est ensuite lentement évaporé jusqu'à dessiccation. La fraction enrobée peut ensuite être mélangée avec le sol mouillé. Cette procédure a pour principal avantage de n'introduire aucun solvant dans le sol. En cas d'utilisation d'un sol naturel, la substance d'essai peut être ajoutée soit par chargement d'une portion du sol séchée à l'air comme décrit précédemment pour le sol artificiel, soit par mélange avec le sol mouillé, puis évaporation si un agent de solubilisation est utilisé. En règle générale, il conviendra d'éviter autant que possible tout contact du sol mouillé avec les solvants. Les éléments suivants sont à prendre en considération (3):

- si un solvant autre que l'eau est utilisé, il convient qu'il soit miscible à l'eau et/ou puisse être éliminé (par évaporation notamment) pour ne laisser que la substance chimique d'essai sur le sol,
 - si un témoin solvant est utilisé, aucun témoin négatif n'est nécessaire. Le témoin solvant présentera la plus forte concentration de solvant ajouté au sol et le solvant en question sera issu du même lot que celui utilisé pour la solution mère. La toxicité et la volatilité du solvant ainsi que la solubilité de la substance d'essai dans le solvant sélectionné constituent les principaux critères de choix pour l'agent de solubilisation.
24. Pour les substances peu solubles dans l'eau et les solvants organiques, 2,0 à 2,5 g de sable quartzique finement broyé par récipient d'essai peuvent être mélangés, au moyen d'un mortier et d'un pilon par exemple, à la quantité nécessaire de la substance d'essai pour obtenir la concentration expérimentale voulue. Ce mélange de sable quartzique et de la substance d'essai est ajouté au sol préhumidifié, auquel il est mélangé complètement après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est réparti entre les récipients d'essai. On répète la procédure pour chaque concentration expérimentale et on prépare un témoin approprié de 2,0 à 2,5 g de sable quartzique finement broyé par récipient d'essai.
25. La concentration de la substance d'essai dans le sol est déterminée après chargement. La répartition homogène de la substance d'essai dans le sol est contrôlée avant l'introduction des organismes d'essai. La méthode de chargement choisie et les raisons de ce choix sont notées (24).
26. Idéalement, il convient d'établir un équilibre entre le sol et l'eau interstitielle avant l'ajout des organismes; une période de quatre jours à 20 °C est recommandée. Pour un grand nombre de substances chimiques organiques faiblement solubles dans l'eau, le laps de temps nécessaire pour qu'un véritable équilibre soit atteint entre les parties adsorbées et dissoutes peut s'étendre sur plusieurs jours ou plusieurs mois. Selon l'objectif de l'étude, par exemple lorsqu'il s'agit de simuler des conditions environnementales, il peut être nécessaire de "vieillir" plus longtemps le sol chargé [trois semaines à 20 °C pour les métaux notamment (22)].

Élevage des animaux d'essai

27. Il est préférable de conserver les vers en élevage de laboratoire permanent. Des conseils sur les méthodes d'élevage en laboratoire concernant *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*, et les espèces enchytrées figurent à l'appendice 5 [voir aussi (48), (51) et (52)].
28. Il convient que les vers utilisés dans les essais ne présentent pas de maladies, anomalies ou parasites observables.

DÉROULEMENT DE L'ESSAI

29. Les organismes d'essai sont exposés à la substance d'essai durant la phase d'absorption. La phase d'absorption dure 14 jours (enchytrées) ou 21 jours (vers de terre) sauf s'il est prouvé que l'état stationnaire a été atteint.
30. Pour la phase d'élimination, les vers sont transférés sur un sol dépourvu de la substance d'essai. Le premier échantillon est prélevé de 4 à 24 h après le début de la phase d'élimination. L'appendice 3 donne des exemples de programme d'échantillonnage pour une phase d'absorption de 21 jours et une phase d'élimination de 21 jours.

Organismes d'essai

31. Chez de nombreuses espèces d'oligochètes terrestres, le poids individuel est très faible (5 à 10 mg de poids humide par individu pour *Enchytraeus albidus* et moins pour *Enchytraeus crypticus* ou *Enchytraeus luxurius*); la pesée et l'analyse chimique peuvent nécessiter de réunir les vers des récipients de réplicats (tous les vers d'un récipient de réplikat sont utilisés afin d'obtenir un seul résultat pour les tissus analysés). Vingt enchytrées sont ajoutés à chaque réplikat, et au moins trois réplicats sont utilisés. Si la limite de détection analytique de la substance d'essai est élevée, il peut être nécessaire d'utiliser un plus grand nombre de vers. Pour les espèces d'essai de poids individuel supérieur (*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*), il est possible de recourir à des récipients de réplicats contenant un seul individu.
32. Il convient que les vers de terre utilisés lors d'un essai soient de poids similaire (*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* ont par exemple un poids individuel de 250 à 600 mg). Les enchytrées (*Enchytraeus albidus* notamment) mesurent environ 1 cm de long. Tous les vers utilisés pour un même essai proviennent de la même source et sont adultes (avec un clitellum) (appendice 5). Le poids et l'âge d'un animal pouvant influencer sur les valeurs de FBA (par

exemple, du fait d'une teneur en lipides variable et/ou de la présence d'œufs), ces paramètres sont consignés avec précision, et pris en compte dans l'interprétation des résultats. De plus, des cocons sont susceptibles d'apparaître pendant la période d'exposition, ce qui a également des répercussions sur les valeurs de FBA. Il est recommandé de peser un sous-échantillon des vers avant l'essai afin d'estimer les poids humides et secs moyens.

33. Un rapport sol/vers élevé est utilisé afin de minimiser la baisse de la concentration de la substance d'essai dans le sol durant la phase d'absorption. Il est recommandé que ce rapport s'élève au minimum, pour *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*, à 50 g de poids sec de sol par ver et, pour les enchytrées, à 10-20 g de poids sec de sol par récipient d'essai. La couche de sol contenu dans les récipients a une épaisseur de 2 à 3 cm (enchytrées) ou de 4 à 5 cm (vers de terre).
34. Les vers utilisés lors d'un essai sont extraits du milieu d'élevage (les enchytrées par exemple à l'aide de pinces de joaillier). Les animaux adultes sont transférés pour acclimatation sur un sol d'essai non traité, puis nourris (voir le paragraphe 36). Si les conditions d'essai diffèrent des conditions d'élevage, une phase d'acclimatation de 24 à 72 h devrait suffire à l'adaptation des vers aux conditions d'essai. Une fois acclimatés, les vers de terre sont transférés dans des récipients en verre (des boîtes de Petri par exemple) contenant une eau propre pour y être rincés, puis ils sont pesés avant d'être déposés sur le sol d'essai. Avant la pesée, tout excès d'eau est enlevé en tapotant délicatement les vers contre le bord du récipient ou en les séchant précautionneusement à l'aide d'une serviette en papier légèrement humidifiée.
35. Le comportement d'enfouissement des organismes d'essai est observé et consigné. Dans les essais menés avec des vers de terre, les animaux (témoins et traités) s'enfouissent dans le sol normalement en quelques heures; ceci est vérifié 24 h maximum après l'ajout des vers dans le récipient d'essai. Si ce n'est pas le cas (par exemple, plus de 10 % ne s'enfouissent pas pendant plus de la moitié de la phase d'absorption), soit les conditions d'essai ne sont pas appropriées, soit les organismes d'essai ne sont pas en bonne santé. Il conviendra alors d'arrêter l'essai et de le répéter. Les enchytrées vivant essentiellement dans les pores interstitiels du sol, il arrive souvent que leur tégument soit seulement partiellement en contact avec le substrat environnant. On suppose que l'exposition des enchytrées enfouies et non enfouies est équivalente, et le non-enfouissement des enchytrées n'exige pas nécessairement de répéter l'essai.

Alimentation

36. L'alimentation des organismes d'essai est envisagée si le sol utilisé présente une faible teneur en carbone organique total. Avec un sol artificiel, il est recommandé d'alimenter les vers suivant une fréquence hebdomadaire (une fois par semaine) à raison de 7 mg de fumier séché par gramme de masse sèche du sol pour les vers de terre, et de 2 à 2,5 mg de flocons d'avoine moulus par gramme de masse sèche du sol pour les enchytrées (11). La première ration est mélangée au sol immédiatement avant l'ajout des organismes d'essai. Il convient d'employer, de préférence, le même type d'alimentation que pour l'élevage (appendice 5).

Régime d'éclairage et température

37. Les essais sont menés suivant un cycle contrôlé de 16/8 heures de lumière/obscurité, avec une intensité lumineuse comprise de préférence entre 400 et 800 lx au niveau des récipients d'essai (3). La température est maintenue à 20 ± 2 °C tout au long de l'essai.

Concentrations d'essai

38. Une seule concentration est utilisée. Les cas où une ou plusieurs concentrations seraient requises font l'objet d'une justification. Si la toxicité (CE_{50}) de la substance d'essai est voisine de la limite de détection analytique, on recommande l'utilisation d'une substance d'essai radiomarquée, de radioactivité spécifique élevée. Pour les métaux, la concentration devra être supérieure à la concentration de fond dans les tissus et le sol.

Réplicats

39. Concernant les mesures de cinétique (phase d'absorption et d'élimination), le nombre minimum de récipients de réplicats traités devra être de trois par point d'échantillonnage. Le nombre total de réplicats préparés suffira à couvrir tous les temps de prélèvement prévus au cours des phases d'absorption et d'élimination.
40. Pour les observations et les mesures biologiques (rapport poids sec/poids humide, teneur en lipides) et pour l'analyse des concentrations de fond dans les vers et le sol, au moins 12 récipients de réplicats d'un témoin négatif (quatre échantillons prélevés au démarrage, quatre à la fin de la phase d'absorption et quatre à la fin de la phase d'élimination) sont fournis, si aucun solvant autre que l'eau n'a été utilisé. Si un agent de solubilisation est utilisé pour l'application de la substance d'essai, il convient de prévoir, en plus des réplicats traités, des témoins solvant (quatre récipients de réplicats devront faire l'objet d'un prélèvement au démarrage, quatre à la fin de la phase d'absorption et quatre à la fin de la phase d'élimination) contenant tous les constituants, à l'exception de la substance d'essai. Dans ce cas, quatre récipients supplémentaires de réplicats d'un témoin négatif (sans solvant) pourront également être fournis pour procéder à un nouvel échantillonnage à la fin de la phase d'absorption. Ces réplicats pourront être comparés biologiquement avec le témoin solvant afin d'obtenir des informations sur une éventuelle influence du solvant sur les organismes d'essai. Il est recommandé de prévoir un nombre suffisant de récipients supplémentaires de réplicats de réserve (huit, par exemple) pour les vers traités et les vers témoins.

Fréquence des mesures de la qualité du sol

41. Le pH et le taux d'humidité du sol sont mesurés au début et à la fin des phases d'absorption et d'élimination. La température de la chambre d'essai est relevée en continu. Il convient de contrôler l'humidité du sol une fois par semaine en pesant les récipients d'essai et en comparant leur poids au moment des contrôles avec leur poids en début d'essai. Les pertes d'humidité sont compensées par l'ajout d'eau désionisée.

Échantillonnage et analyse des vers et du sol

42. L'appendice 3 donne un exemple de programme d'échantillonnage pour les phases d'absorption et d'élimination des essais de bioaccumulation sur les vers de terre et les enchytrées.
43. Un échantillon du sol est prélevé dans les récipients d'essai pour déterminer la concentration de la substance d'essai avant l'introduction des vers, puis durant les phases d'absorption et d'élimination. Pendant l'essai, les concentrations de la substance d'essai sont déterminées dans les vers et dans le sol. En règle générale, on mesure les concentrations totales dans le sol. On peut également mesurer les concentrations dans l'eau interstitielle; dans ce cas, il convient de justifier ce choix et de décrire les méthodes appropriées prévues avant le début de l'étude, puis de consigner ces informations dans le rapport.
44. Les vers et le sol sont échantillonnés au moins à six reprises durant les phases d'absorption et d'élimination. Si la stabilité d'une substance d'essai est démontrée, le nombre d'analyses du sol peut être réduit. Il est recommandé d'analyser au moins trois réplicats au début et à la fin de la phase d'absorption. Si la concentration mesurée dans le sol à la fin de la phase d'absorption s'écarte de la concentration initiale de plus de 30 %, les échantillons de sol prélevés à d'autres dates sont également analysés.
45. Enlever du sol les vers d'un réplicat donné à chaque temps de prélèvement (par exemple, après avoir étalé le sol du réplicat sur un plateau peu profond et prélevé les vers à l'aide d'une pince de joaillier), les rincer rapidement à l'eau dans un récipient peu profond en verre ou en acier. Enlever l'eau en excès (voir le paragraphe 34). Transférer délicatement les vers dans un récipient préalablement taré, et les peser immédiatement, en incluant le contenu de l'intestin.
46. Les vers de terre (*Eisenia* sp.) doivent pouvoir purger leur intestin pendant la nuit, par exemple sur un papier filtre humide dans une boîte de Petri fermée (voir paragraphe 34). Après la purge, il convient de déterminer le poids des vers afin d'évaluer la perte éventuelle de biomasse pendant l'essai (voir les critères de validité au paragraphe 17). La pesée et l'analyse des tissus des enchytrées sont effectuées sans purge, ceci étant techniquement difficile en raison de la petite taille de ces vers. Une fois le poids final déterminé, les vers sont tués immédiatement, en utilisant la méthode la plus appropriée (par exemple avec de l'azote liquide, ou en congelant les vers à une température inférieure à - 18 °C).
47. Durant la phase d'élimination, les vers remplacent le contenu contaminé de leur intestin par des éléments du sol propre. Autrement dit, les mesures réalisées sur un échantillon de vers qui ne se sont pas purgés (les enchytrées en l'occurrence) immédiatement avant la phase d'élimination incluent le sol contaminé présent dans l'intestin. S'agissant des oligochètes aquatiques, on suppose qu'après les 4 à 24 h initiales de la phase d'élimination, l'essentiel du contenu intestinal contaminé a été remplacé par du sédiment propre [voir notamment (46)]. Des observations similaires ont été rapportées pour les vers de terre lors d'études sur l'accumulation de cadmium et de zinc radiomarqués (78). Chez les enchytrées ne s'étant pas purgés, la concentration de ce premier échantillon de la phase d'élimination peut être considérée comme la concentration dans les tissus après la purge de l'intestin. Pour tenir compte de la dilution de la concentration de la substance d'essai par du sol non contaminé durant la phase d'élimination, il est possible d'estimer le poids du contenu de l'intestin à partir des rapports poids des vers humides/poids des cendres de vers ou poids des vers secs/poids des cendres de vers.
48. Il est préférable d'analyser les échantillons de sol et de vers immédiatement après extraction (c'est-à-dire dans les 1 à 2 jours suivants) afin d'éviter des dégradations ou d'autres pertes, et il est recommandé de calculer les vitesses approximatives d'absorption et d'élimination pendant le déroulement de l'essai. Si l'analyse est retardée, les échantillons devront être stockés suivant une méthode appropriée, par exemple, en procédant à leur congélation ($\leq - 18$ °C).
49. Il conviendra de vérifier que la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique, ainsi que la récupération de la substance d'essai dans les échantillons de sol et de vers sont satisfaisantes pour la méthode donnée; l'efficacité d'extraction, la limite de détection et la limite de quantification devront être consignées. De même, il faudra s'assurer que la substance d'essai n'est pas détectable dans les récipients témoins à des concentrations supérieures à la concentration de fond. Si la concentration de la substance d'essai dans l'organisme d'essai C_a est > 0 pour les vers témoins, il faudra l'inclure au calcul des paramètres cinétiques (appendice 2). Pendant toute la durée de l'essai, tous les échantillons sont manipulés de façon à réduire au minimum les contaminations et les pertes (résultant, par exemple, de l'adsorption de la substance d'essai sur le dispositif d'échantillonnage).

50. En cas d'utilisation de substances d'essai radiomarquées, il est possible d'analyser le produit parent et les métabolites. Une quantification de la substance d'essai parente et des métabolites à l'état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption fournit des informations importantes. Les échantillons sont alors nettoyés de façon à pouvoir quantifier séparément la substance d'essai parente. Si des métabolites simples excèdent 10 % de la radioactivité totale du ou des échantillons analysés, l'identification de ces métabolites est recommandée.
51. La récupération globale et la récupération de la substance d'essai dans les vers, le sol, et le cas échéant, dans les pièges contenant des absorbants permettant de retenir la substance d'essai évaporée, sont consignées et rapportées.
52. Le regroupement d'individus échantillonnés à partir d'un récipient d'essai donné est acceptable pour les enchytrées, plus petits que les vers de terre. Si ce regroupement implique de réduire le nombre de réplicats, cela restreint les procédures statistiques pouvant s'appliquer aux données. Si une procédure et une puissance statistiques spécifiques sont requises, alors l'essai comprend un nombre adéquat de récipients de réplicats, adapté aux quantités, à la procédure et à la puissance voulues.
53. Il est recommandé d'exprimer le FBA à la fois comme une fonction du poids sec total et, si nécessaire (à savoir pour des substances fortement hydrophobes), comme une fonction de la teneur en lipides. La teneur en lipides est déterminée par des méthodes appropriées [certaines méthodes existantes, voir par exemple (31) ou (58), ont besoin d'être adaptées à cette fin]. Ces méthodes s'appuient sur une technique d'extraction au chloroforme/méthanol. Toutefois, afin d'éviter l'utilisation de solvants chlorés, il convient d'utiliser une version modifiée de la méthode de Bligh et Dyer (9) qui est décrite dans (17). Comme les diverses méthodes ne conduisent pas forcément à des valeurs identiques, il est important de détailler la méthode employée. Lorsque cela est possible, c'est-à-dire si on dispose de suffisamment de tissu de vers, la teneur en lipides est, idéalement, analysée à partir du même échantillon ou extrait que la substance d'essai, l'extrait devant souvent être débarrassé de ses lipides avant d'être analysé par chromatographie (49). Une autre possibilité consiste à mesurer la teneur en lipides sur des animaux témoins et à utiliser la valeur obtenue pour normaliser les valeurs de FBA. Cette dernière approche réduit la contamination de l'équipement par la substance d'essai.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

54. On obtient la courbe d'absorption de la substance d'essai en portant la concentration de la substance d'essai dans/sur les vers durant la phase d'absorption en fonction du temps, en échelle arithmétique. Lorsque la courbe atteint un plateau ou état stationnaire (voir les définitions à l'appendice 1), le facteur de bioaccumulation à l'état stationnaire (FBA_{ss}) est calculé à l'aide de la formule suivante:

$$\frac{C_a \text{ à l'état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption (moyenne)}}{C_s \text{ à l'état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption (moyenne)}}$$

C_a représente la concentration de la substance d'essai dans l'organisme d'essai, et

C_s la concentration de la substance d'essai dans le sol.

55. Si la courbe n'atteint pas de plateau, le FBA_K, fondé sur les constantes de vitesse, devra être déterminé à la place du FBA_{ss} comme suit:

- déterminer le facteur d'accumulation (FBA_K) comme le rapport k_s/k_e ,
- les vitesses d'absorption et d'élimination sont calculées de préférence simultanément (voir l'équation 11 à l'appendice 2),
- La constante de vitesse d'élimination (k_e) est généralement déterminée à partir de la courbe d'élimination (c'est-à-dire du tracé de la concentration de la substance d'essai dans les vers durant la phase d'élimination). La constante de vitesse d'absorption k_s est ensuite calculée en fonction de k_e et d'une valeur de C_a qui est dérivée de la courbe d'absorption – voir la description de ces méthodes à l'appendice 2. La méthode préférée pour l'obtention du FBA_K et des constantes de vitesse, k_s et k_e , consiste à utiliser des méthodes informatisées non linéaires d'estimation des paramètres. Si la courbe d'élimination n'obéit manifestement pas à une cinétique du premier ordre, des modèles plus complexes devront alors être utilisés.

Rapport d'essai

56. Le rapport d'essai comporte les informations suivantes:

Substance d'essai:

- toute information disponible sur la toxicité aiguë ou à long terme (par exemple CE_x , CL_x , CSEO) de la substance d'essai vis-à-vis des oligochètes fousseurs,
- pureté, état physique et propriétés physico-chimiques, par exemple $\log K_{ow}$, solubilité dans l'eau,
- données d'identification de la substance; provenance de la substance d'essai, identité et concentration des solvants éventuellement utilisés,
- en cas d'utilisation d'une substance d'essai radiomarkée, position précise des atomes marqués, radioactivité spécifique et pureté radiochimique.

Espèces d'essai:

- nom scientifique, souche, source, traitement préalable éventuel, acclimatation, âge, taille, etc.

Conditions d'essai:

- procédure d'essai utilisée,
- type et caractéristiques de l'éclairage utilisé et photopériode(s),
- protocole d'essai (par exemple, nombre et dimension des récipients d'essai, masse du sol et épaisseur de la couche de sol, nombre de réplicats, nombre de vers par réplicat, nombre de concentrations d'essai, durée des phases d'absorption et d'élimination, fréquence d'échantillonnage),
- justification du matériau choisi pour les récipients d'essai,
- méthode de préparation et d'application de la substance d'essai, ainsi que raisons du choix de la méthode,
- concentrations d'essai nominales, moyennes et écarts-types des valeurs mesurées dans les récipients d'essai, et méthode d'obtention de ces valeurs,
- source des constituants du sol artificiel ou – si un milieu naturel est utilisé – origine du sol, description d'un éventuel traitement préalable, résultats des contrôles (survie, augmentation de la biomasse, reproduction), caractéristiques du sol [pH, teneur totale en carbone organique, distribution granulométrique (pourcentage de sable, de limon et d'argile), capacité maximale de rétention d'eau (CRE_{max}), teneur en eau au début et à la fin de l'essai, et toutes autres mesures réalisées],
- informations détaillées sur le traitement des échantillons de sol et de vers, y compris les détails concernant la préparation, le stockage, les procédures de chargement en substance d'essai, l'extraction et les procédures analytiques (et leur précision) pour la substance d'essai dans les vers et le sol, la teneur en lipides (si mesurée), et les méthodes de récupération de la substance d'essai.

Résultats:

- mortalité des vers témoins et des vers dans chaque récipient d'essai et éventuel comportement anormal observé (par exemple, évitement du sol, absence de reproduction lors d'un essai de bioaccumulation chez les enchytrées),
- rapport poids sec/poids humide du sol et des organismes d'essai (utiles pour la normalisation),
- poids humides des vers à chaque temps de prélèvement; pour les vers de terre, poids humides au début de l'essai, et à chaque temps de prélèvement avant et après la purge de l'intestin,
- teneur en lipides des organismes d'essai (si déterminée),

- courbes montrant les constantes cinétiques d'absorption et d'élimination de la substance d'essai chez les vers, et la durée pour atteindre l'état stationnaire,
- C_a et C_s (avec écart-type et fourchette, si nécessaire) pour tous les temps de prélèvement (C_a exprimé en g.kg^{-1} de poids humide et sec du corps entier, C_s exprimé en g.kg^{-1} du poids humide et sec). Si un facteur d'accumulation biote-sol (BSAF) est nécessaire (par exemple, pour une comparaison des résultats entre deux essais ou plus réalisés avec des animaux de teneurs en lipides différentes), C_a est en plus être exprimé en g.kg^{-1} de teneur en lipides de l'organisme et C_s est exprimé en g.kg^{-1} de carbone organique (CO) du sol,
- FBA (exprimé en kg de sol kg^{-1} de ver), constante de vitesse d'absorption du sol k_s (exprimée en g de sol kg^{-1} de vers j^{-1}), et constante de vitesse d'élimination k_e (exprimée en j^{-1}); éventuellement, BSAF (exprimé en $\text{kg de CO du sol kg}^{-1}$ de teneur en lipides des vers),
- le cas échéant: pourcentages de substance parente, de métabolites et de résidus liés (c'est-à-dire le pourcentage de substance d'essai ne pouvant être extraite par les méthodes d'extraction courantes) détectés dans le sol et les animaux d'essai,
- méthodes utilisées pour les analyses statistiques des données.

Évaluation des résultats:

- conformité des résultats avec les critères de validité tels qu'énoncés au paragraphe 17,
- résultats inattendus ou inhabituels, par exemple élimination incomplète de la substance d'essai des animaux d'essai.

BIBLIOGRAPHIE:

- (1) Amorim M. (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ -HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*. Master thesis, University Coimbra.
- (2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.
- (3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 pp.
- (4) Beek B., Boehling S., Bruckmann U., Franke C., Joehncke U., Studinger G. (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (5) Belfroid A., Sikkenk M., Seinen W., Van Gestel C., Hermens J. (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.
- (6) Belfroid A., Van Wezel A., Sikkenk M., Van Gestel C., Seinen W. & Hermens J. (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.
- (7) Belfroid A., Meiling J., Drenth H., Hermens J., Seinen W., Van Gestel C. (1995). Dietary uptake of super-lipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.
- (8) Bell A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.
- (9) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.
- (10) Bouché M. (1972). Lombriciens de France. Écologie et systématique. INRA, Annales de zoologie-écologie animale, Paris, 671 p.

- (11) Bruns E., Egeler Ph., Moser T., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.
- (12) Bruns E., Egeler Ph., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). *Hydrobiologia* 463: 185-196.
- (13) Conder J.M. and Lanno R.P. (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. *J. Soils Sediments* 3: 13-20.
- (14) Connell D.W. and Markwell R.D. (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. *Chemosphere* 20: 91-100.
- (15) Didden W.A.M. (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37: 2-29.
- (16) Didden W. (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, p. 555-576.
- (17) De Boer J., Smedes F., Wells D., Allan A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (18) Dietrich D.R., Schmid P., Zweifel U., Schlatter C., Jenni-Eiermann S., Bachmann H., Bühler U., Zbinden N. (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 140-145.
- (19) Règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission (JO L 396 du 30.12.2006, p. 1).
- (20) Edwards C.A. and Bohlen P.J. (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.
- (21) OCDE (2008). Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fouisseurs, ligne directrice 315 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- (22) Egeler Ph., Gilberg D., Scheffczyk A., Moser Th. and Römbke J. (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No: 204 67 458: 149 pp. Le document peut être téléchargé à l'adresse suivante: <http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf>.
- (23) Elmgaard N. and Jagers op Akkerhuis G.A.J.M. (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.
- (24) Environnement Canada (1995). Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiments de contrôle dopé avec un produit toxique de référence, Série de la protection de l'environnement, Rapport SPE 1/RM/30.
- (25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.
- (26) Franke C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* 32: 1897-1905.

- (27) Franke C., Studinger G., Berger G., Böhling S., Bruckmann U., Cohors-Fresenborg D., Jöhncke U. (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29: 1501-1514.
- (28) Füll C. (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.
- (29) Füll C., Schulte C., Kula C. (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.
- (30) Gabric A.J., Connell D.W., Bell P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24: 1225-1231.
- (31) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A., Parrish C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography* 30: 1099-1105.
- (32) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
- (33) Hund-Rinke K. and Wiechering H. (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. *J. Soils Sediments* 1: 15-20.
- (34) Hund-Rinke K., Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: *Toxikologische Beurteilung von Böden*. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisen-träger, A. (eds), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.
- (35) ISO 11268-2 (1998), Qualité du sol – Effets des polluants vis- à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*), Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction.
- (36) Jaenike J. (1982). "*Eisenia foetida*" is two biological species. *Megadrilogica* 4: 6-8.
- (37) Jager T. (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2080-2090.
- (38) Jager T., Sanchez P.A., Muijs B., van der Welde E., Posthuma L. (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 953-961.
- (39) Jager T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A.C., Hogendoorn E.A., DeJong A., Kruitbosch J.A.W., Peijnenburg W.J.G.M. (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 767-775.
- (40) Jager T., Fleuren R.L.J., Hoogendoorn E., de Korte G. (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Environ. Sci. Technol.* 37: 3399-3404.
- (41) Janssen M.P.M., Bruins A., De Vries T.H., Van Straalen N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (42) Kasprzak K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23: 217-232.
- (43) Khalil A.M. (1990). Aufnahme und Metabolismus von ¹⁴C-Hexachlorbenzol und ¹⁴C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.
- (44) Landrum P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23: 588-595.

- (45) Marinussen M.P.J.C., Van der Zee S.E.A.T.M., De Haan F.A. (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. *Ecotox. Environ. Safety* 36: 17-26.
- (46) Mount D.R., Dawson T.D., Burkhard L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1244-1249.
- (47) Nendza M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow} /log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.
- (48) Chapitre C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre.
- (49) Chapitre C.13 de la présente annexe, Bioconcentration: essai avec renouvellement continu sur les poissons.
- (50) Chapitre C.21 de la présente annexe, Microorganismes du sol: essai de transformation de l'azote.
- (51) OCDE (2004ba) Essai de reproduction chez l'enchytrée. Ligne directrice 220 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques; OCDE, Paris.
- (52) OCDE (2004b) Essai de reproduction chez le lombric (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). Ligne directrice 222 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques; OCDE, Paris.
- (53) OCDE (2008) Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fouisseurs. Ligne directrice 315 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques; OCDE, Paris.
- (54) Petersen H. and Luxton M. (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388.
- (55) Phillips D.J.H. (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.
- (56) Pflugmacher J. (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffizienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.
- (57) Posthuma L., Weltje L., Anton-Sanchez F.A. (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.
- (58) Randall R.C., Lee II H., Ozretich R.J., Lake J.L., Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 1431-1436.
- (59) Römbke J., Egele P., Füll C. (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.
- (60) Römbke J. and Moser Th. (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/1999: 373 pp.
- (61) Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.
- (62) Romijn C.A.F.M., Luttik R., Van De Meent D., Slooff W., Canton J.H. (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. *Ecotox. Envir. Safety* 27: 107-127.

- (63) Sample B.E., Suter D.W., Beauchamp J.J., Efroymson R.A. (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2110-2120.
- (64) Schlosser H.-J. and Riepert F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. *Zool. Beitr. NF* 34: 413-433.
- (65) Schmelz R. and Collado R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. novembre, a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). *Carolinea* 57: 93-100.
- (66) Sims R.W. and Gerard B.M. (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): *Synopses of the British Fauna (New Series)* No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.
- (67) Sousa J.P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M. (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2557-2563.
- (68) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (69) Stephenson G.L., Kaushik A., Kaushik N.K., Solomon K.R., Steele T., Scroggins R.P. (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: *Advances in earthworm ecotoxicology*. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds). Setac Press, Pensacola, 67-81.
- (70) Sterenborg I., Vork N.A., Verkade S.K., Van Gestel C.A.M., Van Straalen N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation – Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.
- (72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (73) Van Brummelen T.C. and Van Straalen N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.
- (74) Van Gestel C.A.M. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: *Ecotoxicology of Earthworms* (Ed. Becker, H., Edwards, P.J., Greig-Smith, P.W. & Heimbach, F.). Intercept Press, Andover (GB).
- (75) Van Gestel C.A. and Ma W.-C. (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. *Chemosphere* 21: 1023-1033.
- (76) Van Straalen N.M., Donker M.H., Vijver M.G., van Gestel C.A.M. (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environmental Pollution* 136: 409-417.
- (77) Venter J.M. and Reinecke A.J. (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African J. Zool.* 23: 161-165.
- (78) Vijver M.G., Vink J.P.M., Jager T., Wolterbeek H.T., van Straalen N.M., van Gestel C.A.M. (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1843-1851.
- (79) Widianarko B. and Van Straalen N.M. (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 402-406.
-

Appendice 1

DÉFINITIONS

La bioaccumulation est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant. La bioaccumulation est le résultat combiné des processus de bioconcentration et de bioamplification (voir ci-dessous).

La bioconcentration est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, résultant de l'absorption de la substance exclusivement depuis le milieu environnant (à savoir via la surface du corps et le sol ingéré), par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant.

La bioamplification est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, résultant principalement de l'absorption d'aliments ou de proies contaminés, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans l'alimentation ou la proie. La bioamplification peut conduire à un transfert ou à une accumulation de la substance d'essai dans les réseaux trophiques.

L'élimination d'une substance est la perte de cette substance par les tissus de l'organisme d'essai selon des processus actifs ou passifs survenant indépendamment de la présence ou de l'absence de la substance d'essai dans le milieu environnant.

Le facteur de bioaccumulation (FBA) à n'importe quel instant de la phase d'absorption de l'essai de bioaccumulation, est la concentration de la substance d'essai dans ou sur l'organisme d'essai (C_a en g.kg^{-1} de poids humide ou sec de ver) divisée par la concentration de la substance dans le milieu environnant (C_s en g.kg^{-1} de poids de sol humide ou sec). Le FBA est exprimé en kg de sol kg^{-1} de ver.

Le facteur de bioaccumulation à l'état stationnaire (FBAss), qui est le FBA à l'état stationnaire, ne varie pas de façon significative pendant une longue période, la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant (C_s en g.kg^{-1} de poids de sol sec) étant constante pendant cette période.

Les facteurs de bioaccumulation calculés directement à partir du rapport de la constante de vitesse d'absorption du sol divisée par la constante de vitesse d'élimination (k_s et k_e , voir ci-dessous), sont appelés facteurs de bioaccumulation cinétiques (FBA_K).

Le facteur d'accumulation biote-sol (BSAF) est la concentration de la substance d'essai normalisée par rapport aux lipides dans/sur l'organisme d'essai, divisée par la concentration de la substance d'essai normalisée par rapport au carbone organique, dans le sol à l'état stationnaire. C_a est alors exprimée en g.kg^{-1} de teneur en lipides de l'organisme, et C_s en g.kg^{-1} de teneur en carbone organique du sol; le BSAF est exprimé en kg de CO.kg^{-1} de lipides.

Un plateau ou état stationnaire est défini comme l'équilibre entre les processus d'absorption et d'élimination survenant simultanément durant la phase d'exposition. L'état stationnaire est atteint, dans le tracé du FBA en fonction du temps, lorsque la courbe devient parallèle à l'axe des temps et que trois analyses successives de FBA réalisées sur des échantillons pris à intervalles d'au moins deux jours ne diffèrent pas de plus de 20 % les uns des autres et qu'il n'y a pas de différence statistique significative entre les trois périodes d'échantillonnage. Pour les substances d'essai absorbées lentement, des intervalles plus appropriés seraient de sept jours (49).

Le coefficient de partage carbone organique-eau (K_{co}) est le rapport de la concentration d'une substance dans/sur la fraction de carbone organique d'un sol et de la concentration de substance dans l'eau à l'équilibre.

Le coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}) est le rapport des solubilités de la substance dans le n-octanol et dans l'eau à l'équilibre; il est parfois exprimé par P_{ow} . Le logarithme de K_{ow} ($\log K_{ow}$) est utilisé comme indicateur du potentiel de bioaccumulation de la substance par les organismes aquatiques.

La phase d'absorption ou d'exposition est la durée pendant laquelle les organismes d'essai sont exposés à la substance d'essai.

La constante de vitesse d'absorption du sol (k_s) est la valeur numérique définissant la vitesse d'augmentation de la concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai résultant de l'absorption de la phase du sol. k_s est exprimé en g de sol kg^{-1} de ver j^{-1} .

La phase d'élimination est la durée, suite au transfert des organismes d'essai depuis un milieu contaminé dans un milieu dépourvu de la substance d'essai, durant laquelle est étudiée l'élimination (ou la perte nette) de la substance par les organismes d'essai.

La constante de vitesse d'élimination (k_e) est la valeur numérique définissant la vitesse de réduction de la concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai, suite au transfert des organismes d'essai depuis un milieu contenant l'élément d'essai vers un milieu dépourvu de cette substance. k_e est exprimé en j^{-1} .

Une substance d'essai est toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Appendice 2

Calcul des paramètres d'absorption et d'élimination

Le principal effet observé d'un essai de bioaccumulation est le facteur de bioaccumulation, FBA. Il est possible de calculer le FBA en divisant la concentration dans l'organisme d'essai, C_a , par la concentration dans le sol, C_s , à l'état stationnaire. Si l'état stationnaire n'est pas atteint durant la phase d'absorption, le FBA_K est calculé à partir des constantes de vitesse et non du FBA_{ss} . Il convient d'indiquer si le FBA est basé, ou non, sur des concentrations à l'état stationnaire.

La procédure habituelle pour obtenir le facteur de bioaccumulation cinétique (FBA_K), la constante de vitesse d'absorption du sol (k_s) et la constante de vitesse d'élimination (k_e) consiste à faire appel à des méthodes informatisées non linéaires d'estimation des paramètres, par exemple à partir des modèles décrits dans (68). D'après un ensemble de valeurs séquentielles de la concentration en fonction du temps et les équations de modèles:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{équation 1}]$$

ou

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{équation 2}]$$

où:

C_a = concentration de la substance dans les vers [g.kg^{-1} de poids humide ou sec]

k_s = constante de vitesse d'absorption dans les tissus [g de sol kg^{-1} de ver $j - 1$]

C_s = concentration de la substance dans le sol [g.kg^{-1} de poids humide ou sec]

k_e = constante de vitesse d'élimination [$j - 1$]

t_c = temps à la fin de la phase d'absorption,

ces programmes informatiques calculent les valeurs de FBA_K , k_s et k_e .

Lorsque la concentration de fond dans les vers non exposés, par exemple au jour 0, diffère sensiblement de zéro (cela peut être le cas pour les métaux notamment), cette concentration ($C_{a,0}$) est incluse dans ces équations comme suit:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{équation 3}]$$

et

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{équation 4}]$$

Dans les cas où l'on observe une forte baisse de la concentration de la substance d'essai dans le sol durant la phase d'absorption, il est possible de recourir aux modèles suivants (par exemple, (67) et (79)):

$$C_s = C_0 (e^{-k_0 t}) \quad [\text{équation 5}]$$

où:

C_s = concentration de la substance dans le sol [g.kg^{-1} de poids humide ou sec]

k_0 = constante de vitesse de dégradation dans le sol [d^{-1}]

C_0 = concentration initiale de la substance dans le sol [g.kg^{-1} de poids humide ou sec]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{équation 6}]$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 t} - e^{-k_e t} \times e^{-k(t-t_c)} \quad t > t_c \quad [\text{équation 7}]$$

où:

C_a = concentration de la substance dans les vers [g.kg^{-1} de poids humide ou sec]

k_s = constante de vitesse d'absorption dans les tissus [g de sol kg^{-1} de vers j^{-1}]

k_0 = constante de vitesse de dégradation dans le sol [j^{-1}]

k_e = constante de vitesse d'élimination [j^{-1}]

t_c = temps à la fin de la phase d'absorption.

Lorsqu'on a atteint un état stationnaire durant la phase d'absorption (c'est-à-dire $t = \infty$), il est possible de réduire l'équation 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{équation 1}]$$

à:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

ou à

$$C_a/C_s = k_s/k_e = \text{BAF}_K \quad [\text{équation 8}]$$

Ensuite $k_s/k_e \times C_s$ donne une valeur approchée de la concentration de la substance d'essai dans le tissu du ver à l'état stationnaire ($C_{a,ss}$).

Le facteur d'accumulation biote-sol (BSAF) peut se calculer comme suit:

$$\text{BSAF} = \text{BAF}_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \quad [\text{équation 9}]$$

où f_{oc} est la fraction de carbone organique dans le sol, et f_{lip} est la fraction de lipides dans le ver, toutes deux étant déterminées, de préférence, sur des échantillons prélevés de l'essai, et basées respectivement soit sur le poids sec, soit sur le poids humide.

Il est possible de modéliser les constantes cinétiques d'élimination en utilisant les données issues de la phase d'élimination et en appliquant l'équation de modèle suivante et une méthode informatisée non linéaire d'estimation des paramètres. Si le tracé des données en fonction du temps indique une décroissance exponentielle constante de la concentration de la substance d'essai dans les animaux, le déroulement temporel de l'élimination peut être décrit par un modèle à un compartiment (équation 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [\text{équation 10}]$$

Les processus d'élimination semblent parfois se dérouler en deux étapes, montrant une décroissance rapide de C_a au cours des premières étapes, qui évolue vers une perte plus lente des éléments d'essai dans les étapes ultérieures de l'élimination [par exemple (27), (68)]. Les deux étapes peuvent être interprétées en faisant l'hypothèse de l'existence de deux compartiments dans l'organisme, compartiments à partir desquels la substance d'essai est éliminée à différentes vitesses. Dans ces cas particuliers, il convient d'étudier la littérature pertinente, par exemple (38), (39), (40), (78).

À l'aide des équations de modèles ci-dessus, on peut également calculer les paramètres cinétiques (k_s et k_e) en une seule fois, en appliquant un modèle de cinétique du premier ordre à toutes les données des phases d'absorption et d'élimination simultanément. Pour une description d'une méthode pouvant permettre un tel calcul combiné des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, consulter (41), (73) et (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s (1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1) \right] + \left[\frac{K_s}{K_e} \times C_s (e^{-k_e(t-t_c)} - e^{-k_e t}) \times (m = 2) \right] \quad [\text{équation 11}]$$

Note: quand les paramètres d'absorption et d'élimination sont estimés simultanément à partir des données combinées d'absorption et d'élimination, "m" tel que mentionné dans l'équation 11 est un descripteur qui permet au programme informatique d'attribuer les sous-termes de l'équation aux ensembles de données de la phase correspondante et de faire une évaluation correcte ($m = 1$ pour la phase d'absorption; $m = 2$ pour la phase d'élimination).

Quoi qu'il en soit, ces équations de modèles seront utilisées avec précaution, en particulier lorsque des modifications de la biodisponibilité de la substance d'essai, ou (bio)dégradation, surviennent durant l'essai [voir notamment (79)].

Appendice 3

EXEMPLES DE PROGRAMMES D'ÉCHANTILLONNAGE POUR DES ESSAIS DE BIOACCUMULATION DANS LE SOL

Essai sur des vers de terre

a) Phase d'absorption avec 8 dates d'échantillonnage pour le calcul des paramètres cinétiques

Jour	Activité
- 6	Conditionnement du sol préparé durant 48 h.
- 4	Chargement d'une fraction du sol avec la solution de la substance d'essai; évaporation de tout solvant; mélange des constituants du sol; répartition du sol dans les récipients d'essai; équilibration dans les conditions d'essai durant 4 jours (3 semaines pour les sols chargés en métaux).
- 3 à - 1	Séparation des organismes d'essai du milieu d'élevage pour acclimatation; préparation et humidification des constituants du sol.
0	Mesure de la température et du pH du sol; retrait d'échantillons de sol des récipients traités et des témoins au solvant pour la détermination de la concentration de la substance d'essai; ajout d'une ration alimentaire; pesée et distribution aléatoire des vers dans les récipients d'essai; conservation d'un nombre suffisant de sous-échantillons de vers pour la détermination des valeurs de fond analytiques, des poids humide et sec, ainsi que de la teneur en lipides; pesée de tous les récipients d'essai pour le contrôle de l'humidité du sol; contrôle de l'alimentation en air, en cas de système en circuit fermé.
1	Contrôle de l'alimentation en air, consignation du comportement des vers et de la température; prélèvement d'échantillons de sol et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai.
2	Comme le 1 ^{er} jour.
3	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température.
4	Comme le 1 ^{er} jour.
5 – 6	Comme le 3 ^e jour.
7	Comme le 1 ^{er} jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée.
8 – 9	Comme le 3 ^e jour.
10	Comme le 1 ^{er} jour.
11 – 13	Comme le 3 ^e jour.
14	Comme le 1 ^{er} jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée.
15 – 16	Comme le 3 ^e jour.
17	Comme le 1 ^{er} jour.
18 – 20	Comme le 3 ^e jour.
21	Comme le 1 ^{er} jour; mesure de la température et du pH du sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai; fin de la phase d'absorption; transfert des vers des réplicats exposés restants vers des récipients contenant du sol propre pour la phase d'élimination (sans purge de l'intestin); échantillonnage du sol et des vers des témoins au solvant.
	Les activités préalables à l'exposition (phase d'équilibration) sont programmées en tenant compte des propriétés de la substance d'essai.
	Les activités décrites pour le 3 ^e jour sont réalisées quotidiennement (au moins les jours ouvrés).

b) Phase d'élimination

Jour	Activité
- 6	Préparation et humidification des constituants du sol; conditionnement du sol préparé durant 48 h.
- 4	Mélange des constituants du sol; répartition du sol dans les récipients d'essai; incubation dans les conditions d'essai durant 4 jours.
0 (fin de la phase d'absorption)	Mesure de la température et du pH du sol; pesée et distribution aléatoire des vers dans les récipients d'essai; ajout d'une ration alimentaire; transfert des vers des réplicats exposés restants vers des récipients contenant du sol propre; prélèvement d'échantillons de sol et de vers après 4 à 6 h pour la détermination de la concentration de la substance d'essai.
1	Contrôle de l'alimentation en air, consignation du comportement des vers et de la température; prélèvement d'échantillons de sol et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai.
2	Comme le 1 ^{er} jour.
3	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température.
4	Comme le 1 ^{er} jour.
5 – 6	Comme le 3 ^e jour.
7	Comme le 1 ^{er} jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée.
8 – 9	Comme le 3 ^e jour.
10	Comme le 1 ^{er} jour.
11 – 13	Comme le 3 ^e jour.
14	Comme le 1 ^{er} jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée.
15 – 16	Comme le 3 ^e jour.
17	Comme le 1 ^{er} jour.
18 – 20	Comme le 3 ^e jour.
21	Comme le 1 ^{er} jour; mesure de la température et du pH du sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai; échantillonnage du sol et des vers des témoins au solvant.
	La préparation du sol avant le début de la phase d'élimination intervient de la même manière qu'avant la phase d'absorption.
	Les activités décrites pour le 3 ^e jour sont réalisées quotidiennement (au moins les jours ouvrés).

Essai sur des enchytrées

a) Phase d'absorption avec 8 dates d'échantillonnage pour le calcul des paramètres cinétiques

Jour	Activité
- 6	Conditionnement du sol préparé durant 48 h.
- 4	Chargement d'une fraction du sol avec la solution de la substance d'essai; évaporation de tout solvant; mélange des constituants du sol; répartition du sol dans les récipients d'essai; équilibration dans les conditions d'essai durant 4 jours (3 semaines pour les sols chargés en métaux).

Jour	Activité
- 3 à - 1	Séparation des organismes d'essai du milieu d'élevage pour acclimatation; préparation et humidification des constituants du sol.
0	Mesure de la température et du pH du sol; retrait d'échantillons de sol des récipients traités et des témoins au solvant pour la détermination de la concentration de la substance d'essai; ajout d'une ration alimentaire dans le sol; pesée et distribution aléatoire des vers dans les récipients d'essai; conservation de suffisamment de sous-échantillons de vers pour la détermination des valeurs de fond analytiques, du poids sec et humide et de la teneur en lipides; pesée de tous les récipients d'essai pour le contrôle de l'humidité du sol; contrôle de l'alimentation en air, en cas de système en circuit fermé.
1	Contrôle de l'alimentation en air, consignation du comportement des vers et de la température; prélèvement d'échantillons de sol et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai.
2	Comme le 1 ^{er} jour.
3	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température.
4	Comme le 1 ^{er} jour.
5 – 6	Comme le 3 ^e jour.
7	Comme le 1 ^{er} jour; ajout d'une ration alimentaire dans le sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée.
9	Comme le 1 ^{er} jour.
10	Comme le 3 ^e jour.
11	Comme le 1 ^{er} jour.
12 – 13	Comme le 3 ^e jour.
14	Comme le 1 ^{er} jour; ajout d'une ration alimentaire dans le sol; mesure de la température et du pH du sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai; fin de la phase d'absorption; transfert des vers des réplicats exposés restants vers des récipients contenant du sol propre pour la phase d'élimination (sans purge de l'intestin); échantillonnage du sol et des vers des témoins au solvant.
	Les activités préalables à l'exposition (phase d'équilibration) sont programmées en tenant compte des propriétés de la substance d'essai.
	Les activités décrites pour le 3 ^e jour sont réalisées quotidiennement (au moins les jours ouvrés)

Appendice 4

Sol artificiel – recommandations pour la préparation et le stockage

Les sols naturels provenant d'une source particulière ne sont pas toujours disponibles tout au long de l'année, et des organismes indigènes ainsi que la présence de micropolluants peuvent influencer sur l'essai; il est donc recommandé d'utiliser un substrat artificiel, le sol artificiel décrit au chapitre C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre (48). Plusieurs espèces d'essai peuvent survivre, se développer et se reproduire dans ce sol, et une normalisation maximum doublée d'une comparabilité intra- et interlaboratoire des conditions d'essai et d'élevage est proposée.

Constituants du sol:

Tourbe:	10 %	Tourbe de sphaigne, conformément à la ligne directrice 207 de l'OCDE (48).
Sable quartzique:	70 %	Sable quartzique industriel (séché à l'air); taille des grains: plus de 50 % des particules seront dans une fourchette comprise entre 50 et 200 µm, mais toutes seront ≤ 2 mm.
Argile kaolinique:	20 %	Teneur en kaolinite ≥ 30 %.
Carbonate de calcium:	≤ 1 %	CaCO ₃ , pulvérisé, chimiquement pur.

Il est également possible de réduire la teneur en carbone organique du sol artificiel, notamment en abaissant la teneur en tourbe à 4-5 % de sol sec et en augmentant la teneur en sable en conséquence. Cette réduction de la teneur en carbone organique est susceptible de diminuer les possibilités d'adsorption de la substance d'essai sur le sol (carbone organique) et d'augmenter la disponibilité de la substance d'essai pour les vers (74). Il a été démontré que *Enchytraeus albidus* et *Eisenia fetida* peuvent satisfaire aux critères de validité concernant la reproduction lorsqu'ils sont testés sur des sols naturels dont la teneur en carbone organique est inférieure (2,7 %, par exemple) (33) et (61), et on a constaté expérimentalement qu'il pouvait en aller de même sur un sol artificiel renfermant 5 % de tourbe.

Préparation

Les constituants secs du sol sont soigneusement mélangés (par exemple, dans un grand mélangeur de laboratoire). Ce mélange est réalisé environ une semaine avant le début de l'essai. Le mélange sec de constituants du sol est humidifié avec de l'eau désionisée au moins 48 h avant l'application de la substance d'essai de manière à équilibrer/stabiliser l'acidité. Pour déterminer le pH, on utilisera un mélange de sol et d'une solution de 1 M KCl suivant un rapport de 1/5. Si le pH ne se trouve pas dans la plage requise (6,0 ± 0,5), soit on ajoute au sol une quantité suffisante de CaCO₃, soit on prépare un nouveau lot de sol.

La capacité maximale de rétention d'eau (CRE) du sol artificiel est déterminée conformément à la norme ISO 11268-2 (35). Au moins deux jours avant de démarrer l'essai, on humidifie le sol artificiel sec en ajoutant suffisamment d'eau désionisée ou reconstituée pour obtenir approximativement la moitié de la teneur finale en eau. Cette teneur finale en eau devrait représenter 40 % à 60 % de la CRE maximale. Au début de l'essai, on divise le sol préalablement humidifié en lots d'un nombre égal à celui des concentrations d'essai et des témoins utilisés pour l'essai, et, en employant la solution de la substance d'essai et/ou en ajoutant de l'eau désionisée ou reconstituée, on ajuste le taux d'humidité pour qu'il se trouve entre 40 et 60 % de la CRE_{max}. Le taux d'humidité est déterminé au début et à la fin de l'essai (à 105 °C). Il sera optimal pour satisfaire les exigences des espèces (le taux d'humidité peut aussi être contrôlé comme suit: le sol légèrement pressé dans la main doit laisser apparaître de petites gouttes d'eau entre les doigts).

Stockage

Les constituants secs du sol artificiel peuvent être stockés à température ambiante jusqu'à leur utilisation. Le sol préparé, préhumidifié peut être stocké dans un endroit frais pendant maximum trois jours avant d'être chargé; il convient de veiller à minimiser l'évaporation de l'eau. Un sol chargé avec la substance d'essai sera utilisé immédiatement, sauf si des informations spécifient qu'il est possible de stocker ce sol sans affecter la toxicité et la biodisponibilité de la substance d'essai. Des échantillons de sol chargé peuvent alors être stockés dans les conditions recommandées pour la substance d'essai donnée jusqu'à l'analyse.

Appendice 5

Espèces d'oligochètes terrestres recommandées pour les essais de bioaccumulation dans le sol**Vers de terre**

L'espèce d'essai recommandée est *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), qui appartient à la famille des *Lumbricidae*. Depuis 1972, on la divise en deux sous-espèces [*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* (10)]. Selon Jaenike (36), il s'agit là de deux espèces à part entière. *Eisenia fetida* est facilement reconnaissable à ses larges bandes jaunes entre les segments alors qu'*Eisenia andrei* présente une couleur rouge foncé uniforme. Probablement originaires de la région de la mer Noire, elles sont aujourd'hui présentes partout dans le monde, surtout dans les habitats modifiés par les activités anthropiques comme les tas de compost. Toutes deux se prêtent à la réalisation d'essais écotoxicologiques et d'essais de bioaccumulation.

Eisenia fetida et *Eisenia andrei* sont disponibles dans le commerce, notamment comme appât pour la pêche. Par rapport à d'autres vers de terre de la même famille, ces deux espèces ont un cycle de vie court et atteignent leur maturité en 2 à 3 mois (à température ambiante). Leur température optimale oscille entre 20 et 24 °C. Elles préfèrent les substrats relativement humides, d'un pH presque neutre et à forte teneur en matière organique. Ces espèces étant largement utilisées dans les essais écotoxicologiques normalisés depuis environ 25 ans, leur élevage est bien établi (48) (77).

Ces deux espèces peuvent être élevées dans des déjections animales très diverses. Le milieu d'élevage recommandé par l'ISO (35) est un mélange 50/50 de crottin de cheval ou de bouse de vache et de tourbe. Le milieu aura un pH d'environ 6 à 7 (ajusté avec du carbonate de calcium), une faible conductivité ionique (une concentration de sels inférieure à 0,5 % ou à 6 mS/cm) et ne sera pas trop contaminé par de l'ammoniac ou des urines animales. Il est également possible d'utiliser de la terre de jardin, vendue dans le commerce, qui soit sans additifs, un sol artificiel tel que défini par l'OCDE (48), ou encore un mélange des deux, à parts égales (50/50). Le substrat sera humide, mais pas mouillé. Des boîtes d'élevage d'une capacité de 10 à 50 litres conviennent.

Pour obtenir une population de vers homogène quant à l'âge et à la masse, il vaut mieux commencer l'élevage avec des cocons. À cet effet, des vers adultes sont ajoutés à une boîte d'élevage qui contient du substrat frais pour produire des cocons. L'expérience a montré qu'une densité démographique d'environ 100 vers adultes par kg de substrat (poids humide) donne de bons taux de reproduction. Après 28 jours, les vers adultes sont retirés. Les vers de terre éclos sont utilisés pour les essais une fois adultes, soit 2 mois plus tard au moins mais pas au-delà de 12 mois.

Les vers des espèces décrites précédemment peuvent être considérés comme sains s'ils se déplacent dans le substrat, ne tentent pas de s'en échapper et se reproduisent continuellement. Une extrémité postérieure qui bouge très lentement ou qui est jaune (s'agissant d'*E. fetida*) indique un épuisement du substrat. Il est alors recommandé d'utiliser du substrat frais et/ou de réduire le nombre d'animaux par boîte.

Références bibliographiques complémentaires

- Gerard B.M. (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.
- Graff O. (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.
- Römbke J., Egeler P., Füll C. (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.
- Rundgren S. (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.
- Satchell J.E. (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.
- Sims R.W. and Gerard B.M. (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.
- Tomlin A.D. (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 pp.

Enchytrées

L'espèce d'essai recommandée est *Enchytraeus albidus*, Henle 1837 (ver blanc). *Enchytraeus albidus* est l'une des plus grosses espèces (jusqu'à 15 mm) de la famille des annélides oligochètes (*Enchytraeidae*) et c'est la plus répandue dans le monde (8). *Enchytraeus albidus* colonise des habitats marins, dulcicoles et terrestres, constitués la plupart du temps de matière organique en décomposition (algues, compost), et fréquente rarement les prairies (42). Le fait qu'il tolère une gamme étendue de conditions écologiques et certaines variations morphologiques indiquent qu'il pourrait exister différentes races.

Enchytraeus albidus est disponible dans le commerce, plus particulièrement sous forme de nourriture pour les poissons. Il convient de vérifier si l'élevage est contaminé par d'autres espèces, généralement plus petites (60). Dans l'affirmative, tous les vers sont lavés à l'eau dans une boîte de Petri. De grands spécimens adultes d'*Enchytraeus albidus* sont ensuite

sélectionnés (à l'aide d'un stéréomicroscope) pour commencer un nouvel élevage. Tous les autres vers sont éliminés. Le cycle de vie de ces vers est court puisqu'ils arrivent à maturité entre 33 jours (à 18 °C) et 74 jours (à 12 °C). Seuls les vers ayant été conservés en laboratoire pendant au moins 5 semaines (une génération) sans problème devront être utilisés pour des essais.

D'autres espèces du genre *Enchytraeus* conviennent également, notamment *Enchytraeus luxuriosus*. L'univers de vie de cette espèce est le sol, comme récemment décrit dans (65). Si on utilise d'autres espèces d'*Enchytraeus*, il faut les identifier clairement et justifier ce choix dans le rapport.

L'espèce *Enchytraeus crypticus* (Westheide et Graefe, 1992) appartient au même groupe qu'*E. luxuriosus*. L'existence d'*Enchytraeus crypticus* dans la nature n'est pas certaine, cette espèce n'ayant été décrite que dans les élevages de lombrics et les tas de compost (Römbke, 2003). Par conséquent, on ne connaît pas ses besoins écologiques d'origine. Cependant, des études récemment menées en laboratoire avec différents sols naturels ont confirmé la grande tolérance de cette espèce vis-à-vis de propriétés du sol telles que le pH et la texture (Jänsch *et al.*, 2005). Ces dernières années, cette espèce a souvent été utilisée dans des études écotoxicologiques en raison de sa facilité d'élevage et de mise à l'essai (Kuperman *et al.*, 2003). Néanmoins, elle est petite (3-12 mm; 7 mm en moyenne) (Westheide et Müller, 1996), ce qui la rend plus difficile à manipuler qu'*Enchytraeus albidus*. Si on utilise cette espèce et non *Enchytraeus albidus*, les récipients d'essai peuvent être de plus petite taille, mais cela n'est pas nécessaire. En outre, il convient de considérer que cette espèce se reproduit très rapidement, son temps de génération étant inférieur à 20 jours à 20 ± 2 °C (Achazi *et al.*, 1999), voire encore plus court à des températures supérieures.

Les *Enchytraeidae* de l'espèce *Enchytraeus albidus* (comme d'autres espèces d'enchytrées) peuvent être élevés dans de grandes boîtes en plastique (par exemple: 30 × 60 × 10 cm ou 20 × 12 × 8 cm, ce qui convient à la culture de vers de petite taille) remplies d'un mélange de sol artificiel et d'une terre de jardin, vendue dans le commerce, non contaminée et sans additifs. L'emploi de compost, qui risque de contenir des substances toxiques, telles que des métaux lourds, est à éviter. La faune est retirée du sol d'élevage avant usage par triple congélation. Un sol entièrement artificiel est également envisageable, mais le taux de reproduction pourrait être moindre par rapport à celui obtenu avec des substrats mixtes. Il convient que le substrat présente un pH de 6,0 ± 0,5. Les vers sont conservés dans un incubateur à une température de 15 ± 2 °C sans lumière. Dans tous les cas, il convient d'éviter une température supérieure à 23 °C. Ce sol artificiel/naturel sera humide, mais pas mouillé. Légèrement pressé dans la main, il laissera apparaître de petites gouttes d'eau. Dans tous les cas, on évite de créer des conditions anoxiques (si on utilise un couvercle, ce dernier devra comporter un nombre de trous suffisamment élevé pour assurer un échange d'air approprié). Il convient d'aérer le sol d'élevage en le remuant délicatement une fois par semaine.

Les vers sont nourris au moins une fois par semaine ad libitum avec des flocons d'avoine placés dans une cavité à la surface du sol et recouverte de sol. Si de la nourriture reste de la fois précédente, il convient d'ajuster la ration alimentaire à ajouter. Si la nourriture restante est infestée de champignons, elle est remplacée par une nouvelle ration de flocons d'avoine. Pour favoriser la reproduction, les flocons d'avoine peuvent être remplacés toutes les deux semaines par une poudre protéique du commerce, enrichie en vitamines. Après trois mois, les animaux sont transférés vers un substrat d'élevage fraîchement préparé. Les flocons d'avoine, qui sont conservés dans des récipients hermétiquement fermés, sont passés à l'autoclave ou chauffés avant l'emploi afin de prévenir toute infection par des acariens de stockage (*Glycyphagus* sp., Astigmata, Acarina, par exemple) ou des acariens prédateurs [*Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina, par exemple]. Une fois désinfectée, la nourriture est moulue de façon à pouvoir être facilement parsemée à la surface du sol. Il est également possible de nourrir les vers avec de la levure de boulanger ou de la nourriture pour poissons TetraMin®.

En règle générale, les conditions d'élevage sont satisfaisantes si les vers ne tentent pas de quitter le substrat, se déplacent rapidement dans le sol, présentent une surface brillante sur laquelle les particules de sol n'adhèrent pas, ont une couleur plus ou moins blanchâtre, et représentent diverses tranches d'âge. On peut considérer que les vers sont sains s'ils se reproduisent continuellement.

Références bibliographiques complémentaires

- Achazi R.K., Fröhlich E., Henneken M., Pilz C. (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.
- Jänsch S., Amorim M.J.B., Römbke J. (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.
- Kuperman R.G., Checkai R.T., Simini M., Phillips C.T., Kolakowski J.E., Kurnas C.W., Sunahara G.I. (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.
- Römbke J. (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.
- Westheide W. and Graefe U. (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.
- Westheide W. and Müller M.C. (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.»