

LIGNES DIRECTRICES DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

Métabolisme dans les animaux d'élevage

INTRODUCTION

1. Les études sur le métabolisme dans les animaux d'élevage sont utilisées pour définir qualitativement et quantitativement le métabolisme et/ou la dégradation de l'ingrédient actif qui procède de l'utilisation de pesticides dans les matières alimentaires, de l'application directe aux animaux d'élevage ou du traitement des locaux d'élevage. Elles sont habituellement menées sur des ruminants en lactation et des volailles.

2. Les études sur le métabolisme dans les animaux d'élevage sont complexes. Les techniques scientifiques d'étude de métabolisme xénobiotique et de la formation de conjugués, d'isolement de macromolécules animales et les protocoles de production de monomères et d'oligomères progressent en permanence. Par conséquent, il est du devoir du demandeur d'utiliser les techniques de l'état de l'art et de citer ces techniques lorsqu'elles sont utilisées.

OBJECTIF

3. Les études sur le métabolisme dans les animaux d'élevage servent plusieurs objectifs principaux :
- Estimation des résidus totaux dans les produits animaux comestibles, ainsi que dans les excréments.
 - Identification des composants majeurs du résidu terminal dans les tissus comestibles, et ainsi, indication des composants à analyser dans les études de quantification de résidus, (c'est-à-dire les définitions de résidus dans des objectifs d'évaluation des risques et d'application de la réglementation).
 - Elucidation d'une voie métabolique pour le pesticide chez les ruminants et les volailles.
 - Preuves démontrant si un résidu est liposoluble ou non.

CONDUITE DES ETUDES

Généralités

4. Il est nécessaire de mener des études sur le métabolisme dans les animaux d'élevage pour élucider les mécanismes d'absorption et d'élimination des ingrédients actifs dans tous les cas où l'utilisation d'un pesticide peut engendrer des résidus qui entrent dans la chaîne alimentaire humaine. Les résultats obtenus *in vitro* peuvent également servir à démontrer si le pesticide est susceptible de subir une hydrolyse (acide, basique ou enzymatique), une oxydation ou une réduction, une photolyse ou d'autres modifications.

5. Si les pesticides sont destinés à être directement appliqués aux animaux d'élevage, il est recommandé aux demandeurs d'homologation de consulter les pouvoirs publics afin de déterminer si ce type d'utilisation est soumis à une réglementation des pesticides ou bien à une réglementation des médicaments vétérinaires. En effet, une ligne directrice harmonisée concernant l'utilisation vétérinaire de l'application directe est également en cours d'élaboration au plan international¹.

6. Les demandeurs devront présenter la voie métabolique proposée, notamment à l'aide d'un tableau comportant les structures et les noms chimiques concernés (Chemical Abstract Service (CAS) et International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), s'ils existent). Tous les intermédiaires et les métabolites dont l'existence est supposée doivent être indiqués dans la voie. Il convient de préciser clairement dans quelle mesure les procédés analytiques utilisés dans l'étude de métabolisme ont la capacité de déterminer les composants du résidu, qu'ils soient libres, conjugués ou non extractibles.

7. Les demandeurs doivent rester vigilants quant à l'existence possible de métabolites nouveaux et imprévus du pesticide, susceptibles de modifier les futures propositions de limites maximales de résidu. Si la structure d'un métabolite ou d'un produit dérivé d'une modification est identique à celle d'un autre produit chimique pesticide homologué et si l'information est tombée dans le domaine public, le demandeur doit la communiquer.

8. Pour chaque ensemble de conditions expérimentales relatives aux pesticides (par exemple application dermique ou bien orale, ou pour chaque position du radiomarqueur), il faut utiliser les nombres suivants d'animaux. Une étude de métabolismes chez un ruminant peut être effectuée sur un seul animal. Dans le cas des volailles, il est recommandé d'utiliser dix oiseaux par expérience (ou dose). Il convient de noter que l'objectif de ces études n'est pas d'obtenir des analyses statistiques du résidu radioactif dans les matrices comestibles, mais bien plutôt d'évaluer qualitativement l'absorption, la translocation et l'élimination du résidu. Les demandeurs restent libres d'ajouter des animaux s'ils le jugent nécessaire au plan scientifique.

9. Si le demandeur souhaite solliciter une exemption de certaines données liées à l'alimentation animale justifiée par l'utilisation de l'étude sur le métabolisme dans les animaux d'élevage, l'inclusion dans l'étude d'un second animal (ou groupe d'animaux dans le cas des volailles) traités par une dose réaliste est vivement recommandée. Le demandeur peut de surcroît souhaiter prolonger la période d'administration pour le second animal dès lors qu'il semble peu probable qu'un plateau ait été atteint. La demande d'exemption pour les études d'alimentation exige l'appui d'une argumentation scientifique irréprochable, en particulier lorsqu'aucun plateau n'a été atteint dans le lait ou les œufs dans l'étude de métabolisme.

10. Les études sur le métabolisme dans les animaux d'élevage doivent être mises en œuvre à l'aide d'un composé d'essai radiomarqué. L'objectif avoué d'une étude sur le métabolisme dans les animaux d'élevage est l'identification et la caractérisation d'au moins 90 % des résidus radioactifs totaux dans les tissus comestibles, le lait et les oeufs. Dans de nombreux cas, il reste impossible d'identifier des parties importantes des résidus radioactifs totaux, en particulier lorsque le résidu est présent en faibles quantités totales, lorsqu'il est incorporé dans des biomolécules ou lorsque le métabolisme poussé de l'ingrédient actif donne de nombreux composants en faibles concentrations. Dans ce dernier cas, il est important que les demandeurs démontrent clairement la présence des composants et en mesurent leurs teneurs, et tentent, dans la mesure du possible, de les caractériser.

¹ Au moment de la rédaction de cette Ligne directrice, le groupe d'experts était averti de l'existence du processus VICH (International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products) et du CCRMVA (Comité du codex sur les résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments) et de son groupe consultatif scientifique, le JECFA.

NATURE DU RESIDU DANS LES ANIMAUX D'ELEVAGE

11. Les données caractérisant le métabolisme d'un pesticide dans des animaux de laboratoire qui sont demandés dans la section toxicologie de ces lignes directrices (c'est-à-dire Ligne directrice de l'OCDE pour les essais 417 Toxicocinétique) ne peuvent généralement pas remplacer les résultats de métabolisme dans les animaux d'élevage. Toutefois, les informations cinétiques issues de ces études de laboratoire peuvent jouer un rôle important dans la conception des études sur le métabolisme dans les animaux d'élevage. Dans quelques cas exceptionnels, il est possible d'utiliser les résultats sur le métabolisme d'animaux de laboratoire pour compléter les études sur le métabolisme dans les animaux d'élevage lorsque la caractérisation et/ou l'identification du résidu reste incomplète.

12. De manière générale, les ruminants et les volailles feront l'objet d'études de métabolisme séparées. Les chèvres en lactation et les poulets (poules pondeuses) constituent les espèces de choix. Les études de métabolisme sur des animaux non ruminants (porcs) peuvent s'avérer nécessaires lorsque le métabolisme dans le rat diffère significativement de celui observé chez le ruminant ou la volaille. Ces différences peuvent comprendre (sans s'y limiter) les suivantes :

- Différences dans le degré de métabolisme ;
- Différences de nature du résidu observé ; et
- Apparition de métabolites comportant des sous-structures qui présentent un risque toxicologique potentiel connu.

13. Il est inutile d'inclure des animaux témoins dans les études sur le métabolisme dans les animaux d'élevage. En revanche, la période d'acclimatation doit garantir le maintien d'une production satisfaisante de lait et d'œufs par l'animal avant l'administration des doses dans l'étude.

14. Toutes estimations portant sur la dose relative utilisée dans les études sur le métabolisme animal doivent être calculées par rapport au poids sec. Il convient de noter que l'utilisation d'informations sur le pourcentage dans les plantes traitées et les valeurs médianes de résidus ne sont pas acceptables pour déterminer la concentration des doses dans ces expériences.

15. La dose minimale utilisée dans les études de métabolisme par voie orale dans les animaux d'élevage doit correspondre à peu près au niveau d'exposition escompté par l'alimentation avec des végétaux traités contenant les quantités de résidus les plus élevées observées. Dans le cas d'une application dermique, la dose minimale équivaut à la concentration maximale indiquée par l'étiquette. Il est souvent nécessaire d'appliquer des doses excessives pour que la quantité de résidu dans les tissus soit suffisante pour permettre une caractérisation et/ou une identification. Quoi qu'il en soit, pour les études orales, la dose administrée à un animal s'élèvera à au moins 10 mg/kg dans la ration alimentaire. L'administration aux animaux doit être orale. Les ruminants et les porcs doivent recevoir une dose quotidienne pendant au moins cinq jours et les volailles pendant au moins sept jours.

16. Il est déconseillé d'administrer des doses préalables du composé d'essai aux animaux pour les raisons suivantes :

- Un prétraitement peut provoquer l'induction de voies enzymatique, et
- Un prétraitement peut modifier la radioactivité spécifique du composé initial et des métabolites, et réduire ainsi les teneurs en radioactivité dans les tissus, le lait et les œufs, et en masquant

l'importance du transfert de résidu, ce qui entrave l'identification des composants du résidu terminal.

En outre, les différences entre les radioactivités spécifiques des composants des résidus radioactifs totaux qui en découlent peuvent rendre difficile la comparaison des quantités relatives du composé initial et des métabolites.

17. Lorsqu'ils mènent une étude sur le métabolisme dans les animaux d'élevage, les demandeurs ne doivent pas perdre de vue les problèmes futurs susceptibles d'affecter la capacité des méthodes analytiques (application de la réglementation et collecte de données) à extraire efficacement les résidus définis en matière de détermination des limites maximales de résidus ou des seuils de tolérance ou d'évaluation des risques alimentaires. Il est préférable d'utiliser des échantillons de foie et de lait ; toutefois, lorsque des métabolites spécifiques s'accumulent dans des organes spécifiques, il convient de conserver également des échantillons de ces organes. Ainsi, il faut parfois garder des échantillons marqués à des fins d'analyses futures par des procédés qui restent à développer (processus parfois désignés par "radiovalidation" des procédés). Toutefois, avec des protocoles d'extraction des méthodes analytiques qui correspondent à ceux utilisés dans les études de radiomarquage, ces données seront généralement inutiles.

DISCUSSION DE LA METHODE D'ESSAI

Administration du pesticide radiomarké

18. Les ingrédients actifs marqués par un isotope radioactif sont indispensables pour permettre la quantification des résidus totaux, extractibles, et non extractibles. Le marquage de l'ingrédient actif devra permettre de suivre la voie de dégradation aussi longtemps que possible. Il convient de placer le marqueur radioactif dans la molécule de façon à dépister tous les radicaux ou produits de dégradation significatifs. La présence de structures à plusieurs cycles ou de chaînes latérales importantes déterminera des études séparées correspondant au marquage de chaque cycle ou de chaque chaîne latérale, si toutefois un clivage entre ces radicaux est susceptible de se produire. Une argumentation scientifique peut remplacer les études incluant plusieurs marqueurs radioactifs lorsqu'aucun clivage n'est présumé. Cependant, si le clivage de la molécule est évident, il peut être nécessaire d'effectuer une étude supplémentaire avec un marqueur radioactif qui permet de suivre la partie clivée de la molécule.

19. Il convient de s'assurer de la stabilité de la position choisie pour le marquage. L'isotope préféré est ^{14}C , mais lorsque la molécule ne contient aucun atome de carbone ou seulement des chaînes latérales portant des atomes de carbone labiles, ^{32}P , ^{35}S , ou d'autres isotopes radioactifs sont parfois mieux adaptés. L'utilisation du marqueur tritium (^3H) est fermement déconseillée, car des échanges d'atomes d'hydrogène avec des substances endogènes sont toujours possibles. Si le choix se porte sur une chaîne latérale, potentiellement labile ou un marquage au tritium, l'étude de métabolisme ne sera considérée comme valide que si toute la radioactivité significative dans l'animal est identifiée et que son association avec le pesticide est démontrée, et non liée au marqueur perdu par la structure de base de la molécule de pesticide.

20. L'activité spécifique de l'ingrédient actif radiomarké doit se conformer aux conditions imposées sur les données de l'étude sur le métabolisme dans les animaux d'élevage (quantification de 0.01 mg/kg de résidus radioactifs totaux dans les tissus comestibles).

21. Il arrive que les autorités nationales ou internationales refusent l'utilisation d'une dose excessive pour calculer les "valeurs seuils" (voir paragraphe 30 et tableau 1). Par exemple, si la dose de substance radiomarkée administrée à un animal est excessive (par exemple 5X), on ne peut diviser les teneurs en radioactivité obtenues par le facteur multiplicatif (c'est-à-dire 5) pour obtenir les valeurs seuils. Par conséquent, il est généralement indispensable de mener les études à la dose 1X pour décider si les niveaux

seuils ont été ou non outrepassés. Toutefois, il est recommandé au demandeur d'employer une dose excessive lorsqu'il s'attend à obtenir de faibles teneurs en résidus, et par conséquent des données insuffisantes pour définir les voies métaboliques (par le traitement à la dose 1X). Il est à remarquer que le calcul des résidus à la dose 1X à partir d'essais réalisés à des doses excessives fait l'objet d'une décision par les autorités réglementaires individuelles et n'est admissible que si ces autorités jugent les résidus identifiés importants en termes de réglementation.

22. Il est conseillé d'utiliser des isotopes stables tels que ^{13}C , ^{15}N , ou ^2D (non échangeable) en combinaison avec l'isotope radioactif pour faciliter l'identification des métabolites par plusieurs méthodes spectroscopiques (spectrométrie de masse (SM) ou résonance magnétique nucléaire (RMN)).

23. Les études sur le métabolisme dans les animaux d'élevage doivent représenter un régime alimentaire comprenant un composé, généralement le composé initial. Pour les études par voie orale, la substance administrée ne doit pas être constituée d'un mélange d'ingrédient actif et de métabolites végétaux. Si les métabolites végétaux se révèlent identiques aux métabolites animaux, il n'est généralement pas nécessaire de mener des expériences supplémentaires sur le métabolisme dans les animaux d'élevage qui incluent une administration de métabolites d'origine végétale. Lorsqu'un métabolite végétal représente la majorité des résidus radioactifs totaux dans un produit alimentaire, une étude sur le métabolisme dans les animaux d'élevage par administration du métabolite végétal peut être demandée. Dans le cas d'un métabolite végétal unique, des études sur le métabolisme animal sont parfois nécessaires. Il est conseillé aux demandeurs de consulter l'autorité réglementaire compétente qui sera à même de les orienter sur l'ingrédient actif approprié.

24. L'administration orale à un animal d'élevage doit faire intervenir un lance-capsule, une capsule ou une technique de gavage pour garantir l'administration de la totalité de l'ingrédient actif.

25. Il est préférable de mener une étude de métabolisme par voie dermique, le cas échéant, sur la même espèce animale que celle employée dans l'étude orale. Il conviendra de décrire le véhicule, le nombre d'administrations, la dose et le type de traitement(s). Les traitements doivent être comparés à ceux dont l'utilisation est proposée sur l'animal, en insistant particulièrement et en expliquant en détail toutes les différences de formulation, de posologie et d'autres paramètres expérimentaux. Lorsque des faibles teneurs en radioactivité sont observées même aux doses excessives, l'utilisation d'adjuvants ou de substances inertes conventionnelles peut améliorer l'absorption dermique de l'ingrédient actif dans l'animal. Les demandeurs sont invités à décrire les précautions prises pour garantir l'absence d'absorption orale par toilettage du pesticide appliqué par voie dermique ; ce point est particulièrement important pour les ruminants.

Date du sacrifice

26. Un des principaux objectifs des études sur le métabolisme dans les animaux d'élevage est la détermination de l'identité du résidu dans les tissus comestibles, le lait et les œufs au moment du sacrifice. Le demandeur est invité à communiquer les arguments scientifiques qui fondent et justifient la date de sacrifice choisie pour les espèces utilisées dans ces études. Elle se situera de préférence 6 à 12 heures après l'administration de la dernière dose. Quoi qu'il arrive, l'intervalle entre la dernière dose et la date du sacrifice ne doit jamais dépasser 24 heures. [Voir chapitre : Rapport des résultats – Données – Matériel/méthodes – e) Date du sacrifice].

Prélèvement d'échantillons animaux

27. Les excréments, le lait et les œufs sont récoltés deux fois par jour (dans la mesure du possible). Les tissus prélevés doivent inclure au moins un tissu musculaire (longe et flanchet sur les ruminants,

cuisses et poitrine sur la volaille), du tissu hépatique (organe entier pour les chèvres et les volailles et éléments représentatifs des différents lobes du foie pour les bovins et les porcs), les reins (ruminants seulement) et des graisses (rénales, de coiffe, sous-cutanées). Les résidus radioactifs totaux doivent être quantifiés dans tous les tissus, les excréments, le lait et les œufs. La fraction de matière grasse du lait est séparée de la fraction aqueuse par des moyens physiques et les résidus radioactifs totaux sont quantifiés dans chaque fraction. La caractérisation et l'identification du résidu dans l'urine et les fèces facilitent souvent la caractérisation du résidu contenu à faible concentration dans des tissus, mais elles ne sont pas exigées. La radioactivité doit être quantifiée séparément dans les différents types de muscles et de graisses. Une concentration de radioactivité similaire dans un type de tissu autorise à rassembler des échantillons avant l'analyse des métabolites. Toutefois, les demandeurs doivent tout d'abord s'assurer pour ce faire que les proportions relatives des différents types de muscles et types de graisses dans ces échantillons réunis sont représentatives de l'importance relative de ces tissus dans l'animal. S'ils sont significativement différents, l'analyse des métabolites doit alors être réalisée sur les différents types de muscles et de graisses. Une recherche de pathologie macroscopique doit être réalisée sur les organismes collectés. Toute anomalie est notée et rapportée.

Phase analytique

28. Dans la phase analytique d'une étude sur le métabolisme dans les animaux d'élevage, les parties d'animaux à analyser sont prélevées, hachées ou homogénéisées et les résidus radioactifs totaux déterminés. Il faut s'assurer de recouvrir la totalité de la radioactivité.

29. Les échantillons sont extraits par une série de solvants ou de systèmes de solvants (notamment aqueux) dont les polarités et des autres caractéristiques dépendent de la nature des résidus attendus. Les extraits obtenus sont désignés par résidus extractibles. La caractérisation et/ou l'identification exigées des résidus extractibles sont résumées dans le tableau 1.

30. Le mode opératoire décrit n'a qu'une valeur de description générale du type d'informations nécessaires pour déterminer l'acceptabilité d'une étude sur le métabolisme dans les animaux d'élevage. Des protocoles et des méthodologies différentes peuvent être adoptées dans des circonstances particulières. Il conviendra toutefois, pour garantir l'adéquation de l'étude soumise, de respecter les concepts de base concernant les valeurs "seuils" d'identification de la radioactivité, les méthodologies de caractérisation et/ou d'identification de la radioactivité requises, et les étapes appropriées à la libération des résidus non extractibles. Ces valeurs seuils (voir tableau 1) n'ont qu'une finalité indicative large et ne s'appliquent pas forcément dans les cas où un métabolite soulève des inquiétudes au plan toxicologique, ou lorsque une valeur inférieure à 10 pour cent des résidus radioactifs totaux représente un seuil de résidu absolu élevé.

31. **L'identification** correspond à la détermination structurale exacte des composants du résidu radioactif total. 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 SM, 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 doit faire 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 requise. 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 RMN peuvent également fournir une identification

non ambiguë. Un métabolite dont on a déterminé qu'il était d'importance minimale en raison de sa faible teneur absolue (<0.05 mg/kg) ou sa faible proportion dans les résidus radioactifs totaux (moins de 10 pour cent des résidus radioactifs totaux), peut être identifié par co-élution avec des métabolites synthétiques putatifs jouant le rôle d'étalons de référence en n'utilisant qu'une seule technique chromatographique, par exemple une CLHP en phase inversée

32. La **caractérisation** correspond à l'élucidation de la nature générale et des caractéristiques du résidu radioactif. Pour caractériser les résidus, les termes suivants sont employés : organosoluble, soluble dans l'eau ou dans une solution aqueuse, neutre, acide ou alcalin, polaire, non polaire, non extractible, etc. La caractérisation peut également faire intervenir des descriptions de radicaux chimiques dont la présence dans la molécule est avérée par leur conversion en une structure courante, ou par leur réactivité avec des réactifs particuliers. Le degré de caractérisation atteste de la précision avec laquelle l'attribution s'approche de l'identification structurale.

33. En cas d'échec de l'identification des résidus radioactifs, le degré de caractérisation nécessaire pour une partie de la radioactivité totale dépend de plusieurs facteurs, notamment la quantité du résidu présent, la quantité des résidus radioactifs totaux déjà identifiés, l'importance du produit animal en tant qu'aliment pour l'homme, des préoccupations d'ordre toxicologique liées à une classe de composés, l'importance escomptée du résidu évaluée par la caractérisation déjà réalisée et l'aptitude des procédés analytiques à détecter des résidus caractérisés mais non identifiés.

34. Lorsque l'on emploie des doses particulièrement excessives dans l'alimentation pour des études sur le métabolisme et que les résultats démontrent une faible radioactivité dans les tissus, les conditions de caractérisation et/ou d'identification doivent être moins rigoureuses que celles employées lorsque l'exposition escomptée par l'alimentation se traduit par une radioactivité significative dans les produits animaux. Par exemple, dans le cas où l'exposition prévue pour l'animal est d'environ 0.01 mg/kg, que la quantité de composé radiomarqué ingérée s'élève à 10 mg/kg (1000 X) et que la radioactivité totale mesurée dans les tissus, le lait ou les œufs est inférieure à 0.1 mg/kg, une caractérisation et/ou une identification minimale des résidus suffira (à moins qu'il soit fait état d'inquiétudes d'ordre toxicologiques particulières à propos des résidus présents à cette teneur). Cette situation est caractéristique des herbicides appliqués à faibles doses en début de saison.

35. Des concentrations de radioactivité supérieures à 0.01 mg/kg observées dans les produits animaux après ingestion du pesticide aux concentrations escomptées dans les substances alimentaires exigent généralement une identification approfondie des résidus. Ce cas est représentatif des pesticides appliqués aux cultures à hautes doses et en fin de saison de croissance. Le protocole présenté dans le tableau 1 doit être suivi.

36. Il n'est généralement pas nécessaire de déterminer la stéréochimie des métabolites. Lorsque des métabolites identifiés comprenant des centres stéréochimiques doivent être inclus dans la définition des résidus et sont préoccupants au plan toxicologique, il est parfois nécessaire de calculer le rapport des stéréoisomères dans les études supervisées sur le terrain.

37. Il convient parfois d'utiliser de nouvelles techniques d'extraction et d'analyse au lieu des techniques mentionnées ci-dessus. Les nouveaux protocoles d'extraction, tels que l'extraction de fluide supercritique (EFS), l'extraction aux micro-ondes et l'extraction accélérée par solvant peuvent être utilisés. Toutefois, il conviendra d'utiliser la technologie de l'état de l'art, lorsqu'elle est adéquate, pour élucider la voie métabolique dans sa totalité.

Tableau 1. Stratégie d'identification et de caractérisation de résidus extractibles issus du métabolisme dans les animaux d'élevage

Quantité relative (%)	Concentration (mg/kg)	Action requise
< 10	< 0.01	Pas d'action en l'absence d'inquiétudes au plan toxicologique
< 10	0.01 – 0.05	Caractériser. Ne tenter de confirmer l'identité que s'il existe des moyens directs, par exemple si un composé de référence est disponible, ou si l'identification a été réalisée dans une étude précédente.
< 10	> 0.05	La caractérisation/identification doit être décidée au cas par cas en tenant compte de la quantité identifiée.
> 10	< 0.01	Caractériser. Ne tenter de confirmer l'identité que s'il existe des moyens directs, par exemple si un composé de référence est disponible, ou si l'identification a été réalisée dans une étude précédente.
> 10	0.01 – 0.05	Des efforts significatifs doivent être consacrés à l'identification, en particulier s'il est nécessaire d'établir une voie, une caractérisation finale peut être acceptée.
> 10	> 0.05	Identification en utilisant tous les moyens possibles
> 10	> 0.05 Radiomarqueur non extrait	Radiomarqueur non extrait – Voir paragraphes 43 et suivants et Figure 1

Stratégie permettant de déterminer si une identification des métabolites est nécessaire

38. Les valeurs seuils de radioactivité présentées dans le tableau 1 correspondent à la caractérisation ou à l'identification minimale requise pour chaque tissu ou organe après application du composé d'essai radiomarqué. Pour une quantité inférieure ou égale à 0.01 mg/kg de radioactivité totale dans un produit animal, aucune différenciation de radioactivité n'est nécessaire, sous réserve que les résidus ne soulèvent pas d'inquiétude au plan toxicologique à des concentrations plus basses. Lorsque la radioactivité dépasse 0.01 mg/kg, l'échantillon doit être extrait avec des solvants ou des mélanges de solvants de polarités diverses. La quantification par analyse chromatographique (CCM, CLHP) des composants de la radioactivité extractibles permettra alors de déterminer le degré de caractérisation nécessaire.

39. Si la radioactivité extractible représente 0.01 mg/kg ou moins, il n'est pas nécessaire de l'étudier plus avant. Si les valeurs sont comprises entre 0.01-0.05 mg/kg, le comportement chromatographique des composés radioactifs peut être comparé à celui du pesticide initial et des métabolites probables (caractérisation et/ou identification).

40. Lorsque la quantité de radioactivité extractible est supérieure à la valeur la plus élevée entre 0.05 mg/kg ou à 10 % des résidus radioactifs totaux, on s'efforcera de caractériser et d'identifier les produits dans chaque fraction. Cette démarche doit également être entreprise lorsque les résidus potentiels soulèvent des inquiétudes au plan toxicologique à des concentrations inférieures.

41. Il n'est pas toujours nécessaire d'identifier les résidus individuels présents en faibles proportions (en termes de mg/kg et de pourcentage des résidus totaux) si les composants majeurs du résidu ont été identifiés. Par exemple, pour une concentration de radioactivité totale dans un tissu (ou un organe) égale à 3 mg/kg dont 75 % ont été identifiés sans ambiguïté, il sera vraisemblablement inutile d'identifier plusieurs

résidus individuels dont les concentrations sont comprises dans l'intervalle allant de 0.05 à 0.1 mg/kg. En revanche, il est recommandé de tout mettre en œuvre pour identifier des résidus à hauteur de 0.05-0.1 mg/kg lorsque la radioactivité totale ne s'élève qu'à 0.3 mg/kg. Il convient de noter que les valeurs seuils exprimées en termes de concentration ne constituent pas des normes incontournables, mais de simples indicateurs du degré adéquat de caractérisation. Il arrive néanmoins dans de nombreux cas qu'un métabolite d'importance supposée se répartisse dans de nombreuses fractions en raison de ses caractéristiques de solubilité ou de la présence simultanée de formes libres et conjuguées. L'application des valeurs seuils exigera donc, en particulier dans les cas où les résidus radioactifs totaux sont répartis dans de nombreuses fractions, de démontrer (par exemple par analyse chromatographique de chaque fraction) que la concentration combinée (la somme des concentrations) d'un métabolite individuel distribué dans les diverses fractions ne dépasse pas significativement la valeur seuil.

42. Les quantités de radioactivité présentées dans le tableau 1 s'appliquent quelle que soit la dose utilisée dans les études sur le métabolisme dans les animaux d'élevage. Si les doses utilisées sont insuffisantes pour permettre une caractérisation et/ou une identification des résidus par la radioactivité, il faudra mener des études complémentaires afin d'obtenir des quantités suffisantes de radioactivité par des moyens appropriés, par exemple, augmentation de la radioactivité spécifique, détermination d'une date appropriée de sacrifice ou dose excessive.

Libération des résidus non extractibles

43. Dans les trois cas suivants, des résidus radioactifs non extractibles sont observés dans les animaux d'élevage :

- Incorporation dans des biomolécules (par exemple acides aminés, sucres, etc.), en particulier lorsque l'ingrédient actif est dégradé en petites chaînes carbonées (généralement 1 ou 2 atomes de carbone), qui intègrent le pool de carbone des composés endogènes utilisés dans la synthèse de nouveaux constituants cellulaires par l'animal.
- Réaction chimique avec certains radicaux appropriés dans des biomolécules ou bien liaison physico-chimique étroite avec ces radicaux que seules d'autres réactions chimiques peuvent libérer (par exemple hydrolyse enzymatique ou acide/alcaline).
- Encapsulation physique (piégeage) ou intégration des résidus radioactifs dans des matrices animales. Dans ce cas, une solubilisation du tissu, habituellement par l'intermédiaire d'un traitement drastique par une base, peut être indispensable pour libérer les résidus, et l'utilisation de tensioactifs peut également convenir dans des conditions moins rigoureuses.

44. L'objectif du programme de travail général présenté ci-dessous est d'orienter et clarifier la démarche à suivre pour caractériser et/ou identifier ces résidus.

45. Le matériel animal solide extrait doit être dosé et si la quantité de radioactivité est supérieure à la plus élevée des valeurs seuils entre 0.05 mg/kg ou 10 pour cent des résidus radioactifs totaux, il faut s'efforcer de libérer la radioactivité (voir tableau 1). Il est rappelé que dans le cas où les résidus potentiels présents à faibles teneurs sont source de préoccupations d'ordre toxicologique, les valeurs seuils ne s'appliquent pas nécessairement.

46. A chaque étape du tableau 1, il faut procéder à une quantification de la radioactivité totale dans les résidus libérés. Pour ce qui est de la caractérisation, il est important de comparer le comportement chromatographique de la radioactivité libérée (y compris les matériaux hydrosolubles) à celui du composé initial et des métabolites probables, dont la structure est proche de celle du composé initial. Ces

comparaisons signaleront des différences chimiques entre la radioactivité libérée et celle de la molécule initiale. Une radioactivité non extraite résiduelle, après l'application d'un protocole donné, qui est inférieure à 0.05 mg/kg ou à 10 % des résidus radioactifs totaux permet d'interrompre les tentatives de libération de radioactivité.

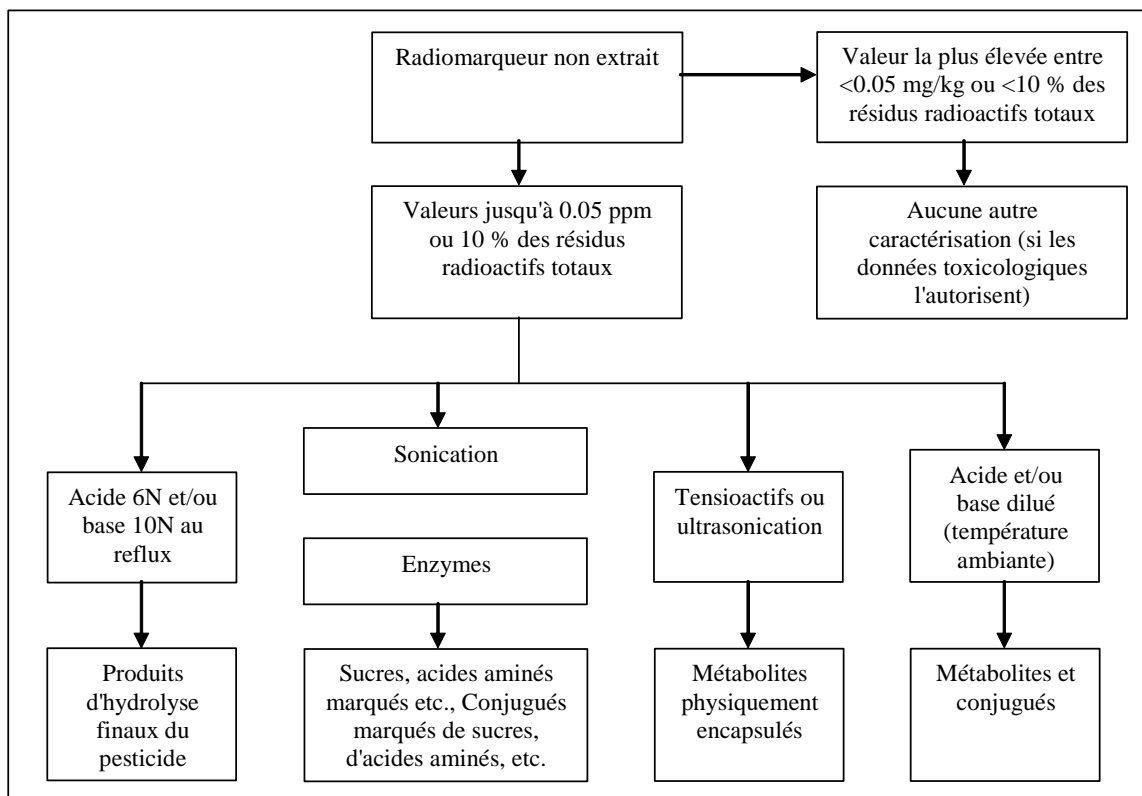
47. Les traitements peuvent être appliqués successivement ou sur des fractions d'échantillons. L'addition d'acide et de base dilués à 37 °C (ces protocoles étant employés à l'origine dans le contexte de d'étude sur le métabolisme et pour la mise au point de la méthode), ou l'utilisation de tensioactifs, d'enzymes, et d'acide 6 N et/ou d'alcali 10 N au reflux font partie des types de traitements possibles. Toutefois, il est indéniable que les modes opératoires les plus doux permettent d'attribuer le plus précisément les structures des métabolites libérés, et une extraction dans un reflux acide ou alcalin, risque de libérer des fragments sous forme de produits finaux d'hydrolyse, dont la structure peut être très éloignée de celle de la substance radioactive non extractible conjuguée.

48. Un traitement acide à température ambiante suivi d'un traitement par une base à température ambiante sont des conditions d'hydrolyse douce des fragments conjugués, susceptibles, eux aussi, de libérer toutes les biomolécules ayant incorporé la radioactivité. Les tensioactifs peuvent permettre de délivrer des résidus physiquement encapsulés ou liés à une membrane. Pour améliorer l'accessibilité du substrat à l'enzyme par rupture de la membrane ou de la paroi cellulaire, une étape de sonication peut précéder un traitement par une combinaison d'enzymes judicieusement choisies (Il est à noter que dans les cas, l'activité de chaque enzyme utilisée doit être confirmée). Ces étapes peuvent contribuer à libérer le radiomarqueur chimiquement lié, en particulier toutes les biomolécules ayant incorporé de la radioactivité.

49. Les étapes finales de libération peuvent mettre en œuvre une hydrolyse acide et alcaline au reflux, susceptible de solubiliser le tissu animal. La radioactivité libérée par cette opération correspondra probablement aux acides aminés, sucres et composés encapsulés ou conjugués, liés ou non aux structures non extractibles encapsulées. Toutefois, cette étape peut démontrer la possibilité de libérer des résidus de pesticide, et fournir des données sur la radioactivité incorporée ainsi que quelques informations sur la nature des métabolites. Les échantillons, les homogénats et les extraits doivent toujours être maintenus à basse température, sauf pendant les étapes d'hydrolyse, afin de réduire la dégradation et la formation d'artefacts (voir la discussion dans les paragraphes 52-55 à propos de la stabilité durant l'entreposage). La figure 1 donne une description visuelle des étapes discutées ci-dessus.

50. L'identification de composés endogènes radiomarqués tels que des acides aminés, des sucres, des composés phénoliques, des nucléotides, etc. peut modérer dans de nombreux cas la nécessité d'une caractérisation et/ou d'une identification plus détaillée des résidus non extractibles, car elle prouve généralement la dégradation du pesticide en petites unités carbonées qui se sont intégrées dans le pool de carbone. Cette conclusion ne concerne pas les composés marqués au tritium ou les pesticides dans lesquels le marqueur ¹⁴C s'est incorporé dans un site labile de la molécule, ni aux cas dans lesquels un seul métabolite libéré, qui constitue une proportion significative des résidus radioactifs totaux (plus de 10 pour cent ou plus de 0.05 mg/kg) n'a pas été identifié.

FIGURE. 1. Caractérisation et identification des résidus non extractibles et liés



51. Commentaires sur le tableau 1 et la figure 1 :

- La radioactivité des résidus libérés doit être quantifiée à chaque étape de la figure 1. Si les valeurs seuils présentées dans le tableau 1 pour les résidus extractibles sont atteintes, la radioactivité doit être séparée grâce à des solvants ou des mélanges de solvants et caractérisée ou identifiée comme il est demandé. Pour ce qui est de la caractérisation, il est important de comparer le comportement chromatographique de la radioactivité libérée (y compris les matériaux hydrosolubles) à celui du composé initial et des métabolites probables, dont la structure est proche de celle du composé initial. Ces comparaisons signaleront des différences chimiques entre la radioactivité libérée et celle de la molécule initiale. Une radioactivité non extraite résiduelle après l'application d'un protocole inférieure à 0.05 mg/kg ou à 10 % des résidus radioactifs totaux permet d'interrompre les tentatives de libération de radioactivité.
- Les valeurs seuils présentées dans le tableau 1 signalent qu'il est possible de se dispenser de caractériser ou d'identifier les métabolites présents à des teneurs très faibles et non significatives. Il arrive néanmoins dans de nombreux cas qu'un métabolite d'importance supposée se répartisse dans de nombreuses fractions en raison de ses caractéristiques de solubilité ou de la présence simultanée de formes libres et conjuguées. L'application des valeurs seuils exigera donc, en particulier dans les cas où les résidus radioactifs totaux sont répartis dans de nombreuses fractions, de démontrer (par exemple, par CLHP de chaque fraction) que la concentration combinée (la somme des concentrations) d'un métabolite individuel distribué dans les diverses fractions ne dépasse pas significativement la valeur seuil.

Stabilité durant l'entreposage

52. Il convient de vérifier si l'intégrité de l'échantillon a été maintenue pendant le prélèvement, la préparation et l'entreposage de l'échantillon. Ces analyses doivent démontrer que le profil de base des résidus radiomarqués ne s'est pas modifié pendant toute la durée de l'étude. Il est impossible d'enrichir les échantillons avant de connaître l'identité du résidu et la durée nécessaire à la mise en œuvre des études sur le métabolisme. Les données de stabilité durant l'entreposage ne sont habituellement pas exigées pour des échantillons analysés dans les six mois suivant leur prélèvement, sous réserve de prouver que des mesures ont été prises pour limiter la dégradation des résidus par un entreposage approprié des matrices et des extraits tout au long des étapes analytiques de l'étude.

53. Si d'autres informations font état d'une instabilité suspectée ou observée de l'ingrédient actif, on s'efforcera de préserver l'intégrité de l'étude. Dans les cas où une étude sur le métabolisme ne peut être achevée dans les six mois suivant la collecte des échantillons, il faudra démontrer que l'identité des résidus n'a pas évolué pendant la période comprise entre la collecte et l'analyse finale, par exemple par l'examen de substrats représentatifs au début de l'étude et à la fin. Le substrat doit correspondre à l'élément conservé, c'est-à-dire que dans le cas de l'utilisation d'un extrait de matrice dans toute l'étude et si cette matrice n'est pas extraite ultérieurement, il convient de démontrer la stabilité de l'extrait.

54. La mise en évidence de modifications (par exemple disparition d'un pic de CLHP ou d'une tache de CCM) rendra nécessaires de nouvelles analyses ou une nouvelle étude sur le métabolisme en réduisant le délai séparant le prélèvement de l'analyse.

55. La température d'entreposage idéale des échantillons est inférieure ou égale à -18°C . Toute autre condition d'entreposage doit être signalée et justifiée.

Eclaircissements

56. Dans les techniques de chromatographie (par exemple CHLP, CCM) des résidus radioactifs, la polarité du système de solvants est dictée par la polarité des composés analysés, c'est-à-dire que la polarité des solvants doit être ajustée aux composés concernés.

57. Le choix de l'unité de mesure de la radioactivité spécifique, mégabéquers par milligramme (MBq/mg) ou désintégrations par minute par gramme ou Curie/mole n'est pas déterminant et toute unité permettant le calcul de la concentration de radioactivité en utilisant les désintégrations enregistrées convient. Les informations communiquées aux autorités réglementaires concernées dans ce domaine doivent leur permettre de vérifier la concentration (en mg/kg) indiquée pour les tissus animaux et leurs diverses fractions chromatographiques. Quelle que soit l'unité utilisée, l'analyste doit donner un exemple de calcul montrant comment il passe des données expérimentales aux concentrations (en mg/kg).

58. Des images nettes ou la détection par imagerie radioanalytique des plaques de CCM ou des autoradiogrammes déterminants pour l'identification doivent être jointes. L'emploi d'une CLHP couplée à un détecteur capable de mesurer la radioactivité implique la soumission des radiochromatogrammes appropriés. Quelle que soit la technique chromatographique utilisée, des chromatogrammes représentant le comportement des étalons analytiques seront également insérés dans le rapport.

59. Les demandeurs sont invités à indiquer à tout le moins la concentration de radioactivité totale en mg/kg (généralement en équivalents du pesticide initial) pour chaque tissu animal susceptible d'être utilisé dans l'alimentation. Dans les études mesurant la radioactivité dans toutes les parties ou tissus de l'animal, il peut être utile d'indiquer le pourcentage de radioactivité totale dans chaque tissu.

60. La radiovalidation du procédé d'extraction des méthodes analytiques sera intégrée au rapport sur la méthode analytique, incorporée dans le rapport sur le métabolisme ou fera l'objet d'un rapport séparé. La lettre d'accompagnement ou le résumé de la somme des données doit permettre de la localiser.

CONSIDERATIONS SUR LE RAPPORT DES RESULTATS

Résultats

61. Les éléments suivants doivent être pris en compte lors de la conception, de la conduite et du rapport de l'étude :

Généralités

- (i) Techniques de radiomarquage, y compris dose, méthode d'administration ou d'application.
- (ii) Techniques d'extraction, de fractionnement et de caractérisation employées pour identifier les composants du résidu, libre ou non extractible, dans chaque échantillon.
- (iii) Définition des résidus terminaux totaux, notamment les résultats concernant tous les composants majeurs du résidu terminal total, présentant leur répartition dans le tissu ou l'organe, exprimée en pourcentage de la radioactivité récupérée totale et en concentration (en mg/kg) mesurée au moment du sacrifice.
- (iv) Discussion détaillée, de préférence assortie d'un diagramme de fonctionnement, des voies de dégradation ou des voies métaboliques éventuelles observées. Les métabolites ou les produits de dégradation supposés (mais non identifiés) doivent être clairement indiqués.
- (v) Lorsqu'ils mènent une étude sur le métabolisme dans les animaux, les demandeurs ne doivent pas perdre de vue les futurs problèmes susceptibles de surgir en matière de capacité des méthodes analytiques (respect de la réglementation et collecte des données) à extraire efficacement les résidus définis pour le calcul des limites maximales de résidus (LMR) et des seuils de tolérance ou l'évaluation des risques alimentaires. De préférence, on emploiera des échantillons de foie et de lait, mais si des métabolites spécifiques s'accumulent dans des organes spécifiques, des échantillons de ces organes seront également prélevés. C'est pourquoi il faudra parfois conserver les échantillons radiomarqués à des fins d'analyse future par des méthodes qui restent à mettre au point (processus parfois désigné par "radiovalidation" des méthodes). Toutefois, si les protocoles d'extraction employés dans les méthodes analytiques correspondent précisément à ceux utilisés dans les études de radiomarqueurs, ce type de données sera généralement inutile. La lettre d'accompagnement ou le résumé de la somme des données doit permettre de la localiser.

Résumé/Introduction.

- (i) Objectif de l'étude, notamment les stratégies employées et la justification de leur choix.
- (ii) Protocole expérimental général employé, en particulier discussion, s'il y a lieu, des problèmes expérimentaux inhabituels rencontrés, des tentatives visant à résoudre ces problèmes qui ont conduit à s'écarter du protocole d'essai envisagé et des effets, le cas échéant, de ces écarts sur les résultats de l'étude.

- (iii) Modes et voies du métabolisme observés, y compris la description complète de l'identité et de la quantité (libre et non-extractible) de tous les composants majeurs des résidus radioactifs totaux et de leur répartition dans les tissus et les organes animaux comestibles.
- (iv) Conclusion à propos de la nature qualitative des résidus terminaux dans les tissus analysés et dans le lait et les oeufs.
- (v) Lorsqu'une méthodologie analytique visant à vérifier le respect de la réglementation a été développée, elle doit être validée avec des échantillons dérivés de l'étude sur le métabolisme dans les animaux, accompagnés d'une notification évaluant sa capacité à déterminer tous les composants majeurs du résidu terminal, qu'il s'agisse de radiomarqueur libre, non extractible ou de substances conjuguées et tous les composants du résidu concerné. La notification doit aussi indiquer les limites de détection, la précision et l'exactitude de la méthodologie employée. Il convient de noter que si les déclarations ou les informations spécifiées sont indiquées par ailleurs, il n'est pas nécessaire de les répéter dans ce chapitre, mais il suffit d'y renvoyer.

Matériels/méthodes

a) Ingrédient actif

- (i) Identification de l'ingrédient actif pesticide de l'essai, notamment, nom chimique ; nom commun, noms de l'American National Standards Institute (ANSI), de la British Standards Institution (BSI), ou de l'International Standards Organization (ISO) ; nom utilisé pour le développement et l'expérimentation par l'entreprise ; et numéro CAS (Chemical Abstract Service) et nom chimique IUPAC. Un certificat de pureté chimique et radiochimique doit être joint.
- (ii) La ou les structures chimiques de l'ingrédient actif et des métabolites qui constituent le résidu doivent être fournies, et un renvoi pour chaque nom utilisé dans le développement ou l'expérimentation doit être proposé dans un document de synthèse ou une annexe de l'étude. Les certificats d'analyse décrivant la pureté et l'identité des étalons utilisés dans le processus d'identification seront également joints, s'ils sont disponibles.
- (iii) Information sur les paramètres de formulation pertinents, s'il y a lieu (par exemple, nature du solvant, du véhicule, de l'appât, de l'additif ou de toute autre matrice sur laquelle a été appliqué le pesticide radiomarqué).
- (iv) Indication de la pureté radiochimique et de la nature et de la source du marqueur radioactif employé dans le matériau d'essai radiomarqué. L'identité des impuretés radiomarquées présentes, dérivées de la substance d'essai, doit également être indiquées, le cas échéant, ainsi que le ou les site(s) de marquage dans la molécule de substance d'essai radiomarquée. Le choix de radiomarqueurs autres que le ^{14}C et du ou des sites de marquage dans la molécule sera justifié (dans la mesure du possible, la position de marquage sur le cycle sera particulièrement détaillée).
- (v) L'activité spécifique doit être notée en MBq/mg, avec un exemple de calcul expliquant comment l'analyste obtient les concentrations de radioactivité (mg/kg) à partir des données expérimentales. L'information sur les désintégrations doit permettre aux autorités réglementaires compétentes de vérifier les concentrations indiquées pour les tissus et les organes et dans les diverses fractions chromatographiques.

- (vi) Toute information supplémentaire estimée utile et pertinente par le demandeur pour parachever une description complète et détaillée du produit chimique d'essai, par exemple ses propriétés physico-chimiques (solubilité, etc.).

b) Conditions d'essais et santé des animaux

- (i) Description détaillée de l'ensemble de l'environnement d'essai utilisé sur l'étude, pour l'étude, par exemple conditions d'hébergement des animaux.
- (ii) Stade de développement ou âge des animaux utilisés
- (iii) Description de la santé de l'animal pendant toute l'étude ; observations des changements de l'état sanitaire de l'animal pendant l'étude ; changements et observations relatifs au foie et aux reins de l'animal, en particulier lorsque ces observations ont fait l'objet d'un rapport dans les études sur animaux de laboratoire. Pour l'application dermique, le degré d'hydratation de la peau doit être noté et rapporté.
- (iv) Masses corporelles et production d'œufs et de lait.
- (v) Explication ou justification par les demandeurs de toute condition d'essai signalée qui n'est pas représentative des pratiques normales dans lesquelles les animaux d'élevage sont susceptibles d'être traités ou qui en diffère significativement.

c) Collecte d'échantillons animaux représentatifs.

- (i) Justification ou déclaration par le demandeur du choix d'un animal d'essai différent de ceux qui sont conseillés. Dans ce chapitre, il conviendra d'argumenter ou d'établir les raisons de l'omission d'une étude de métabolisme chez un ruminant ou une volaille.
- (ii) Identification des parties d'animaux spécifiques prélevées et soumises à la détermination des résidus radioactifs et à d'autres analyses et identifications des résidus radioactifs totaux.
- (iii) Toute information supplémentaire considérée par le demandeur comme appropriée et pertinente pour établir une description complète et détaillée des expériences.
- (iv) Protocole de collecte de chaque fraction animale (viande, lait, œufs, abats, graisses, excréments, etc.).

d) Administration du pesticide

- (i) Description détaillée de la méthode d'administration du pesticide utilisée (par exemple, dose administrée par lance-capsules, appliquée sur les aliments, ou par voie dermique, etc.) y compris le véhicule (pulvérisation sur un produit alimentaire, formulation commerciale utilisée dans les pesticides appliqués par voie dermique, etc.) dans lequel le pesticide radiomarqué a été administré aux animaux de l'essai.
- (ii) Dose réelle utilisée dans l'étude, en mg/kg de masse corporelle. Cette information doit être rapportée à la concentration 1X prévue dans la ration alimentaire de l'animal et exprimée en poids sec, ou en concentration maximale de l'ingrédient actif appliqué à l'animal par rapport au poids sec en mg/kg.

(iii) Nombre et dates des administrations, intervalles entre les doses ou les applications, nombres d'applications et date du sacrifice.

e) Date du sacrifice

(i) Deux facteurs entrent en considération au moment de décider de la date du sacrifice : les informations cinétiques disponibles et les délais habituels avant abattage. Elle se situera de préférence entre 6 et 12 heures après l'administration de la dose finale. En aucun cas, cette durée ne dépassera 24 heures. Les arguments scientifiques justifiant la date de sacrifice choisie doivent être présentés.

(ii) A la date du sacrifice, la quantité de matériaux radioactifs liés aux matières organiques doit impérativement suffire à une identification/caractérisation détaillée des métabolites. S'il est à prévoir que la quantité de matériau radioactif sera insuffisante à la date choisie pour le sacrifice, il est envisageable de déterminer au préalable une charge tissulaire maximale par des expériences cinétiques. Dans la plupart des cas la charge tissulaire maximale se situe aux alentours du point temporel de concentration plasmatique ou sanguine maximale (C_{\max}) en se fondant sur l'hypothèse d'une distribution rapide de la radioactivité entre le compartiment central (sang) et les compartiments périphériques (organes, tissus). Cette information peut directement être tirée de l'animal d'essai au cours de l'expérience. Des échantillons de sang prélevés (par exemple par la veine de l'oreille) à plusieurs intervalles de temps après l'administration de la première dose contribuent à déterminer la cinétique dans le sang. La courbe ainsi tracée permet de conclure sur les concentrations éventuelles dans les tissus en fonction du temps après l'administration de la dose. En outre, l'expérience a montré que le comportement biocinétique d'un pesticide administré par voie orale est souvent similaire chez les rats, les ruminants, et, dans une large mesure, les volailles. Les résultats de ces estimations devront alors être ajustés par des coefficients allométriques. Par conséquent, une autre option envisageable pour déterminer le moment où la concentration sanguine est maximale (C_{\max}) consiste à utiliser les informations contenues dans l'étude biocinétique sur le rat, menée conformément à des lignes directrices reconnues, et intégrés dans l'ensemble des données toxicologiques soumises. Le plus souvent, cette étude contient les informations détaillées nécessaires, ainsi qu'une description du comportement biocinétique de la radioactivité totale dans le plasma après administration orale. Elle peut également comprendre des informations sur la répartition de la radioactivité dans les tissus et les organes, basées sur une étude autoradiographique quantitative ou qualitative sur l'organisme entier. Il ne faut pas abattre les animaux avant d'avoir atteint C_{\max} pour éviter toute surestimation de la contribution du composé initial non modifié dans la définition du résidu. L'abattage est accepté à une date plus tardive (mais qui ne situe pas toutefois pas au-delà des 24 heures suivant la dernière dose), si les délais avant l'abattage habituels sont beaucoup plus longs que l'intervalle de temps nécessaire à atteindre C_{\max} .

(iii) Enfin, il convient de rappeler que les informations cinétiques peuvent également garantir que les métabolites présents dans les résidus concernés sont effectivement des métabolites terminaux.

(iv) La justification de la date choisie pour le sacrifice est demandée. Outre la prise en compte des délais avant abattage habituels, il s'agit d'un résumé des informations cinétiques obtenues sur l'animal d'essai lui-même ou par des études sur le métabolisme chez le rat exigées dans le cadre de l'analyse toxicologique. Un résumé des informations disponibles doit être proposé, assorti d'une annexe contenant des renseignements qui les confirment. Les demandeurs fourniront une explication ou une justification de toutes les divergences significatives en matière de doses administrées ou d'autres facteurs pertinents par rapport aux protocoles acceptés.

f) Manipulation et stabilité durant l'entreposage des échantillons (des informations supplémentaires sont données dans le « Guidance Document on Overview of Residue Chemistry Studies » de l'OCDE). Le rapport doit contenir les éléments suivants :

- (i) Description de la manipulation, de l'entreposage préalable au transport, et des protocoles de transport, s'il y a lieu, des échantillons récoltés (prélevés).
- (ii) Description des conditions et de la durée de l'entreposage des échantillons récoltés (prélevés) après leur arrivée au laboratoire.
- (iii) Description détaillée des conditions et de la durée de l'entreposage des extraits avant l'identification des résidus.

g) Méthodes analytiques utilisées dans les analyses des résidus radioactifs

- (i) Les demandeurs doivent préciser dans quelle mesure les méthodes analytiques utilisées dans l'étude de métabolisme sont capables de déterminer les composants des résidus, qu'ils se présentent sous forme libre, conjuguée ou non extraits.
- (ii) Méthode de quantification et de détermination de la répartition de la radioactivité totale récupérée dans les fractions animales prélevées, proposée sous forme de texte rédigé, de tableau ou de figure.
- (iii) Description détaillée de la préparation de l'échantillon avant les analyses par combustion oxydante ou scintillation liquide.
- (iv) Démonstration quantitative de la récupération de la majeure partie de la radioactivité totale à partir des animaux traités.
- (v) Détails sur les paramètres des méthodes analytiques, notamment description de l'équipement utilisé pour déterminer la radioactivité totale dans chaque échantillon.
- (vi) Détails sur les données de comptage radioactif sur des échantillons représentatifs sélectionnés, incluant les durées de comptage, les dpm totales enregistrées, les équivalents de concentrations mesurées, la sensibilité, et la limite de détection, y compris des calculs représentatifs.
- (vii) Description des méthodes de dosages de radioactivité employant une correction pour l'extinction (automatique ou non) qui doit contenir la méthodologie de correction et les méthodes appliquées pour atténuer l'extinction.

h) Extraction et fractionnement de la radioactivité

- (i) Discussion et justification de la séquence d'extraction et du choix du solvant d'extraction utilisé (polaire ou non) et des protocoles d'extraction (mélange, macération, séparation, Soxhlet), sans omettre les techniques supplémentaires employées (réactifs décomplexants, extraction ultrasonique, etc.).
- (i) Description des conditions choisies pour l'hydrolyse acide, basique et/ou enzymatique du gâteau de filtration ou du résidu qui subsiste du tissu préalablement extrait et/ou des extraits hydrosolubles, en vue de libérer les résidus conjugués de ces échantillons. Il convient également de détailler la source, la pureté, la spécificité et l'activité de toutes les préparations enzymatiques utilisées lors de l'hydrolyse.

- (ii) Méthodes de calcul permettant de quantifier le rapport et les quantités de composé initial et/ou de métabolites libres par rapport aux formes conjuguées dans chaque matrice d'échantillon extrait.
- (iii) Les demandeurs sont invités à présenter une estimation quantitative de la radioactivité résiduelle (c'est-à-dire non extractible) qui subsiste dans la matrice de l'échantillon extrait après sa soumission à des extractions poussées par des solvants et des traitements hydrolytiques. La radioactivité résiduelle est exprimée en pourcentage et en concentration (équivalents du composé initial) de la radioactivité totale récupérée. Toutes les démarches entreprises pour libérer le radiomarqueur non extrait doivent également être signalées par le demandeur qui justifiera leur utilisation.
- (iv) Calcul et notification des efficacités d'extraction des produits chimiques radioactifs pour tous les tissus animaux récoltés.
- (v) Présentation des données permettant la mesure ou le suivi de la radioactivité perdue dans chaque étape successive du protocole de fractionnement et d'isolement et discussion des démarches entreprises pour réduire ces pertes.
- (vi) Exposition par les demandeurs des protocoles détaillés de fractionnement de la radioactivité non extractible ou liée dans les tissus animaux inclus dans les protéines, les graisses, etc.
- (vii) Les demandeurs doivent signaler si des quantités significatives du résidu radioactif originel caractérisé comme non extractible se sont incorporées dans les produits naturels.
- (viii) Quantification et notification de la quantité de radioactivité dans chaque fraction d'échantillon (par exemple, hydrosoluble, organosoluble, libérée par hydrolyse, etc.) en terme désintégrations totales et en pourcentage et en mg/kg (équivalents du composé initial) de la radioactivité totale recouvrée dans la matrice de l'échantillon originel analysée.

a) Caractérisation et/ou identification de la radioactivité

- (i) Liste complète et description sous forme de tableau de tous les métabolites connus et suspectés du composé initial (composés modèles, notamment structure, et pureté) employés pour faciliter la caractérisation et/ou l'identification des métabolites non identifiés dans l'échantillon.
- (ii) Calculs et résultats des valeurs de R_f des échantillons et des références sur les autoradiogrammes de CCM et temps de rétention relatifs sur les colonnes de CG et de CLHP. Les écarts ou les variances anormaux relevés par rapport aux valeurs attendues, y compris une diminution de la résolution des échantillons entre les différents analytes (échantillons) dans des analyses chromatographiques successives doivent être signalés, et les mesures prises pour résoudre ce type de problèmes discutées.
- (iii) Présentation des images (ou de la détection par imagerie radioanalytique) des plaques de CCM, des autoradiogrammes, ou des résultats obtenus par d'autres systèmes d'imagerie appropriés déterminants pour l'identification. Les échantillons ou les reproductions de chromatogrammes de CLHP/CLG, en particulier les analyses de spectre de masse doivent également être soumis. Quelle que soit la technique chromatographique utilisée, il faut inclure dans le rapport les chromatogrammes illustrant le comportement des étalons analytiques.
- (iv) Descriptif détaillé de tous les protocoles analytiques de confirmation additionnels appliqués à la séparation et à la caractérisation/identification des métabolites (électrophorèse sous haute

tension, échange d'ions ou chromatographie d'exclusion, dérivation, etc.) ainsi que des méthodes de détermination (spectrométrie de masse) appliquées à l'identification finale des métabolites.

- (v) Description complète de tous les instruments, de tous les matériels et de tous les réactifs employés, en particulier les conditions de fonctionnement des instruments utilisés pour la séparation, la caractérisation et l'identification des résidus radioactifs.
- (vi) Explication de toute perte ou absence de mesure de la radioactivité dans chaque extrait ou fraction de tous les échantillons prélevés. La quantité signalée doit être exprimée en pourcentage et en concentration (équivalents du composé initial en mg/kg) de la radioactivité totale récupérée dans un élément animal donné ou une fraction particulière analysée.
- (vii) Rapport contenant les données et les informations donnant un aperçu des démarches entreprises pour caractériser et identifier au plan chimique tout le radiomarqueur conjugué ou complexé non extractible provenant du pesticide initial dans les organes et les tissus animaux comestibles.
- (viii) Toute la radioactivité peut être recensée sous les différentes formes suivantes :
 1. Métabolites libres – normalement extractibles par les solvants organiques et leur libération ne demande pas de traitement chimique.
 2. Métabolites conjugués – les conjugués sont constitués de deux parties, l'une dérivée d'un pesticide, appelée exocon et l'autre qui provient de l'animal, appelée endocon. L'endocon est souvent l'acide glucuronique, mais il peut s'agir d'autres composés, par exemple, des sulfates, des acides aminés, du glutathion. Il est généralement impossible d'identifier l'exocon sans cliver la liaison du conjugué, ce qui est ordinairement accompli à l'aide d'un acide, d'une base ou d'une hydrolyse enzymatique. Après l'hydrolyse, le pesticide ou son métabolite, séparé de sa partie conjuguée, est habituellement soluble dans les solvants organiques.
 3. Radiomarqueur non extrait, c'est-à-dire métabolites liés par covalence à des composants cellulaires en formant des produits impossibles à extraire de la matrice par une extraction poussée avec des solvants polaires ou non polaires. Si ces résidus sont éliminés chimiquement, par exemple, à l'aide d'un acide, d'une base ou d'une hydrolyse enzymatique, il convient de créer une sous-classe de résidus non extractibles.
 4. Constituants naturels – désignent un pesticide qui a été dégradé en petits fragments dirigés vers des cycles anaboliques et incorporé dans des constituants cellulaires. S'ils ne sont pas extractibles, les constituants naturels sont difficiles à distinguer des métabolites liés. Ils peuvent alors être classés à tort parmi les résidus de pesticide liés, alors qu'il ne s'agit absolument pas de résidus de pesticide. Il est parfois souhaitable de définir les résidus radioactifs comme des constituants naturels, surtout si l'on pense qu'ils sont responsables d'une part importante de la radioactivité terminale.
- (ix) Toute information considérée par les demandeurs comme appropriée et pertinente à l'obtention d'une description complète et détaillée de la conduite de l'étude sur le métabolisme dans les animaux d'élevage et de la détermination des résidus radioactifs totaux.

Résultats et discussion

- (i) Stratégies d'essai. Cette section du rapport doit inclure une discussion des écarts enregistrés par rapport aux protocoles ou aux stratégies d'essai prévus, attribuables à des conditions ou à des difficultés inhabituelles d'ordre expérimental, notamment les problèmes d'extraction, de

fractionnement et de caractérisation des résidus et, s'il y a lieu, les stratégies spécifiques d'extraction et de caractérisation employées pour traiter les résidus non extractibles ou liés. Une discussion sur l'impact ou les effets éventuels de ces écarts sur les résultats de l'étude doit également être proposée.

- (ii) Voies métaboliques. Dans la mesure du possible, il faut présenter une discussion détaillée, assortie d'un schéma de fonctionnement, des voies de dégradation ou des voies métaboliques observées dans les animaux. Dans ce contexte, les résultats obtenus dans le tissu peuvent être comparées et différenciées des voies métaboliques déterminées dans l'étude sur le métabolisme dans le rat et des résultats observés dans les études sur le métabolisme végétal portant sur le composé chimique étudié, lorsqu'ils sont disponibles au moment où l'étude sur le métabolisme dans les animaux d'élevage est mise en œuvre. Il convient de proposer la définition chimique de la voie métabolique en se fondant sur les résultats des études de caractérisation et/ou d'identification, assortie d'un tableau indiquant les structures et les noms chimiques associés (CAS et IUPAC lorsqu'ils existent et numéros CAS). Tous les intermédiaires et métabolites supposés (mais non identifiés) doivent également être clairement indiqués dans la voie.
- (iii) Caractérisation et/ou identification et répartition des résidus radioactifs totaux
 1. Utiliser un format de tableau ou de graphique. Identifier tous les composants majeurs des résidus radioactifs totaux libres et conjugués, et non extractibles, notamment par leur nom, leur structure et leur quantité (exprimée en pourcentage des résidus radioactifs totaux et en concentrations en équivalents du produit initial), et indiquer leur répartition dans chaque fraction animale. Toute la radioactivité doit apparaître, sous forme de métabolites ou de constituants naturels libres, conjugués ou non extractibles.
 2. Les demandeurs doivent fournir le maximum d'informations sur tous les constituants non identifiables et/ou non caractérisables importants des résidus terminaux, leurs quantités et leur distribution dans toutes les fractions animales.
 3. Traitement(s) statistique(s). Inclure des exemples représentatifs de tous les tests statistiques appliqués aux données brutes obtenues sur les échantillons et par les analyses au cours de l'étude sur le métabolisme dans les animaux d'élevage. Fournir la limite de quantification de la détermination de radioactivité et des séparations chromatographiques.
- (iv) Ajouter toute information supplémentaire jugée appropriée et pertinente par les demandeurs pour garantir une description complète et approfondie du métabolisme dans les animaux d'élevage, en particulier les mesures de contrôle de qualité et les précautions prises pour garantir la validité de tous les aspects de l'étude.

Conclusion

- (i) Voies et mécanismes impliqués et degré du métabolisme observé dans les animaux
- (ii) Nature, quantité et distribution des résidus radioactifs totaux dans les échantillons de tissus, d'œufs et de lait au moment du prélèvement des échantillons.
- (iii) Capacité des méthodologies analytiques mises au point et disponibles relatives à la réglementation à déterminer les composants identifiés du résidu terminal, qu'ils soient libres ou bien non extractibles ou conjugués, et capacité de ces méthodologies analytiques ou d'une leur version modifiée à distinguer tous les composants du résidu d'intérêt, libres ou bien non extractibles ou conjugués, dans le tissu animal, le lait ou les œufs, démontrée en se fondant sur

les résultats des études menées sur les échantillons animaux radiomarqués pour démontrer l'efficacité d'extraction.

- (iv) Toute conclusion considérée par les demandeurs comme appropriée et pertinente pour élucider complètement et en détail la cinétique et les processus métaboliques à l'œuvre dans les animaux d'élevage.

Tableaux/Figures

- (i) Tableaux (par exemple) :

1. Nom, structure, pureté de tous les étalons et métabolites de référence utilisés dans l'étude.
2. Temps de rétention en CLHP/GCL et valeur de R_f en CCM du composé initial, des métabolites, des composés apparentés et des composés modèles dans les conditions chromatographiques appliquées.
3. Propriétés, caractéristiques, quantités et répartition dans le lait, les œufs, les tissus et les organes comestibles de tous les composants importants non identifiés du résidu final.

- (ii) Figures (par exemple) :

1. Stratégies ou schémas généraux d'extraction et de fractionnement appliqués à chaque matrice d'échantillon analysée.
2. Répartition de la radioactivité dans diverses fractions de CLHP/CLG d'échange d'ions (d'exclusion) ou préparative.
3. Diagrammes ou schémas des voies métaboliques.

Références

Annexes

- (i) Chromatogrammes, spectres représentatifs, etc. (le cas échéant).
- (ii) Rapports contenant toutes les informations cinétiques qui ont été utilisées pour confirmer les résultats.
- (iii) Autres. Tout matériel pertinent qui n'entre dans aucune des autres sections de ce rapport doit être annexé.

Rapport d'étude

62. Le chapitre suivant fait office de liste de pointage permettant de s'assurer de l'inclusion dans le rapport d'étude de toutes les informations pertinentes :

- Identification de l'ingrédient actif pesticide de l'essai, en particulier, nom chimique ; nom commun, American (National Standards Institute (ANSI), British Standards Institution (BSI), ou International Standards Organization (ISO)) ; nom ou numéro utilisé pour le développement et l'expérimentation par l'entreprise ; et numéro CAS et nom chimique IUPAC.

- Description du ou des ingrédients actifs radiomarqués et justification du ou des sites de radiomarquage, description de la pureté radioactive, nature du radiomarqueur, activité spécifique (en Mbq/Mg), source, identité des impuretés radiomarquées significatives, le cas échéant.
- Nom, structure, et pureté des étalons de références et des métabolites utilisées dans l'étude.
- Description de l'environnement d'essai général utilisé dans l'étude (c'est-à-dire, conditions d'hébergement des animaux).
- Description des animaux sélectionnés (race, âge, stade de développement, état sanitaire) et justification du choix d'un animal d'essai qui n'est pas un animal spécifié.
- Description de la méthode d'administration du pesticide employée (voie dermique, lance-capsule, etc.), de la formulation, de la dose réelle (en milligrammes par kilogramme de masse corporelle) et des quantités réelles de pesticides radiomarqués et non marqués dans chaque dose du nombre et du calendrier d'administration des doses, et de l'intervalle entre les doses, de la durée comprise entre la dose finale et le sacrifice, et justification de ce délai.
- Description des types d'échantillons et de leur manipulation et de leur entreposage (urine, fèces, œufs, lait) prélevés avant le sacrifice.
- Description des échantillons recueillis au moment du sacrifice, y compris description de la manipulation et de l'entreposage avant leur préparation au laboratoire.
- Description de la préparation et de l'analyse des tissus animaux, des œufs, du lait et d'autres échantillons (fèces, liquides de lavage de cages) pour les déterminations de résidu radioactifs totaux.
- Description minutieuse et complète de l'extraction et du fractionnement de la radioactivité dans les diverses matrices animales, assortie de rapports sur la quantité de radioactivité dans chaque fraction d'échantillon, notamment la radioactivité résiduelle dans les solides issus de l'extraction, quantifiée en termes de désintégrations totales et de pourcentage et de concentration (mg/kg, équivalents du composé initial) dans la matrice d'échantillon originelle analysée.
- Description complète de tous les instruments, de tout le matériel et de tous les réactifs utilisés, en particulier des conditions de fonctionnement des instruments utilisés pour la séparation, la caractérisation et l'identification des résidus radioactifs.
- Caractérisation et/ou identification des résidus radioactifs, notamment les données concernant tous les constituants majeurs, qu'il s'agisse de constituants libres, conjugués, non extraits ou naturels, de façon à représenter leur présence dans les tissus, les œufs ou le lait, exprimée en pourcentage des résidus radioactifs totaux (% des RRT) et en concentration (mg/kg).
- Description du comportement chromatographique (temps de rétention en CLHP et/ou en CG, valeur Rf en CCM) et comportement spectroscopique (ions de SM et abondances) des résidus radioactifs dans les extraits de matrices animales, le composé initial, les métabolites et les étalons de référence.
- Information sur la stabilité durant l'entreposage de tous les composants majeurs des résidus radioactifs totaux dans les diverses matrices animales.

- Information quantitative sur la récupération des résidus radioactifs à partir des tissus animaux, du lait et des œufs, en particulier relativement aux méthodes analytiques liées à la réglementation (probable).
- Discussion détaillée, assortie d'une voie métabolique, des mécanismes de dégradation ou de métabolisme observés dans l'animal, y compris une comparaison avec le métabolisme ou la dégradation observé dans d'autres études sur animaux d'élevage, sur les rats et dans des études de métabolisme végétal lorsqu'elles sont disponibles au moment de la réalisation de l'étude sur le métabolisme dans les animaux d'élevage.
- Conclusion débattant des points suivants : (a) voies et importance du métabolisme observé pour l'animal ; (b) nature, quantité et répartition des résidus radioactifs totaux dans les tissus animaux, le lait et les œufs ; et (c) résultats des études de validation menées sur les tissus animaux, le lait et/ou les œufs afin de démontrer dans quelle mesure la méthodologie analytique de vérification du respect de la réglementation est capable d'extraire ou de libérer les composants identifiés inclus dans la définition du résidu.

LITTERATURE

Les documents suivants ont servi de sources pour cette Ligne directrice :

- (1) OECD Guidance Document on Overview of Residue Chemistry Studies (2006)
- (2) OECD Guidance Document on the Definition of Residue (2006)
- (3) Commission of the European Communities (1997). Document 7030/VI/95 - Rev.3 (22/7/1997) ; Appendix F : Metabolism and Distribution in Domestic Animals.
- (4) Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2002). Submission and Evaluation of Pesticide Residues Data for the Estimation of Maximum Residue Levels in Food and Feed. Rome.
- (5) Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (1986). Directives sur les essais de pesticides pour l'obtention de données applicables aux fins d'homologation de pesticides et d'établissement de limites maximales de résidus – Etude de marquage radioactif (études de métabolisme), Rome.