

LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

Bioaccumulation chez le poisson : exposition via le milieu aquatique et via la voie alimentaire

INTRODUCTION

1. La révision de la LD 305 poursuit deux objectifs. Tout d'abord, il s'agit d'intégrer à la Ligne directrice (LD) un essai de bioaccumulation via la nourriture¹ à même de déterminer le potentiel de bioaccumulation des substances très faiblement solubles dans l'eau. En deuxième lieu, on souhaite créer une LD qui, dans un souci du bien-être animal, utilise le cas échéant un nombre plus réduit de poissons, et qui soit d'un meilleur rapport rendement-coût.

2. Depuis l'adoption de la LD consolidée en 1996 (1), de nombreuses substances ont été testées, et les laboratoires comme les autorités réglementaires ont accumulé une expérience considérable. Il en ressort la conviction que l'essai peut être simplifié si des critères spécifiques sont remplis (voir paragraphe 88), et qu'une approche à plusieurs niveaux est possible. L'expérience a aussi montré que les facteurs biologiques comme le développement et la teneur en lipides du poisson ont une forte incidence sur les résultats et doivent probablement être pris en compte. De plus, on admet aujourd'hui que tester des substances très faiblement solubles dans l'eau n'est peut-être pas faisable techniquement. En outre, pour les substances très peu hydrosolubles, l'exposition par l'eau peut présenter moins d'intérêt que l'exposition par la nourriture. D'où le développement d'une méthode d'essai dans laquelle le poisson est exposé via son régime alimentaire (voir paragraphes 7 à 14, puis 97 et suivants). La validation (essai circulaire) de l'essai avec exposition par voie alimentaire a été effectuée en 2010 (51).

Les principaux changements apportés à la LD sont les suivants :

- On peut désormais considérer comme suffisant de tester une seule concentration d'essai quand il est probable que le facteur de bioconcentration (FBC) est indépendant de la concentration d'essai.
- Il est possible, si l'on respecte des critères spécifiques, de concevoir un essai d'exposition réduite en milieu aquatique, avec un nombre restreint de temps d'échantillonnage.
- La teneur en lipides du poisson est mesurée pour pouvoir exprimer le FBC sur la base d'une teneur en lipides de 5 %.
- L'accent est mis, outre l'estimation du FBC à l'état stationnaire, sur celle du FBC cinétique (quand elle est possible).
- Pour certains groupes de substances, un essai avec exposition par voie alimentaire sera proposé, quand il paraît plus adapté qu'un essai par exposition via le milieu aquatique.

(1) Voir définitions et unités à l'annexe 1.

- Le poisson est pesé, pour pouvoir corriger le FBC_k de l'effet de dilution par la croissance.
3. Avant de procéder à un essai de bioaccumulation quel qu'il soit, il convient d'avoir sur la substance d'essai les informations suivantes :
- (a) Sensibilité de la technique d'analyse utilisée pour mesurer les concentrations présentes dans les tissus et le milieu aquatique ou la nourriture tant de la substance d'essai que de ses possibles métabolites (voir paragraphe 65) ;
 - (b) Solubilité dans l'eau [LD 105 ; (2)] ; celle-ci est déterminée selon une méthode adaptée à la plage d'hydrosolubilité (estimée) de manière à obtenir une valeur fiable. Pour les substances hydrophobes, on emploiera généralement la méthode d'élution sur colonne ;
 - (c) Coefficient de partage *n*-octanol/eau, K_{oe}^2 [LD 107 (4), 117 (5), 123 (6)] ; ou autres informations adaptées sur le comportement en matière de partage (par exemple la sorption sur les lipides, le K_{CO}) ; ce coefficient est déterminé selon une méthode adaptée à la plage de K_{oe} (estimée) de manière à obtenir une valeur fiable. Pour les substances hydrophobes, on emploiera généralement la méthode du brassage lent [LD 123 (6)] ;
 - (d) Stabilité de la substance dans l'eau (hydrolyse [LD 111 (7)]) ;
 - (e) Stabilité de la substance dans la nourriture (en particulier si l'essai avec exposition par voie alimentaire est retenu) ;
 - (f) Informations sur la phototransformation pertinentes pour les conditions d'irradiation de l'essai (8) ;
 - (g) Tension superficielle (pour les substances dont le log K_{oe} ne peut être déterminé) [LD 115 (9)] ;
 - (h) Pression de vapeur [LD 104 (10)] ;
 - (i) Toute information sur la dégradation biotique ou abiotique dans l'eau, notamment : biodégradabilité facile (exemple non restrictif) [LD 301 A à F (11), 310 (12)], s'il y a lieu ;
 - (j) Information sur les métabolites : structure, log K_{oe} , formation et dégradabilité, lorsqu'il y a lieu ;
 - (k) Constante acide de dissociation (pK_a) pour les substances susceptibles de s'ioniser. Si besoin est, le pH de l'eau d'essai est ajusté pour s'assurer que la substance se trouve sous sa forme ionisée, si cela est compatible avec l'espèce de poisson choisie.

4. Indépendamment de la méthode d'exposition ou du dispositif d'échantillonnage retenus, cette LD décrit une procédure permettant de caractériser le potentiel de bioaccumulation de substances chez le poisson. Bien qu'il faille accorder une nette préférence aux régimes d'essai en dynamique, les

(2) Parfois noté P_{OE} ; il est déterminé par agitation en flacon dans la Ligne directrice 107 (3), par la méthode HPLC dans la Ligne directrice 117 (4) et par brassage lent dans la Ligne directrice 123 (5). La technique par colonne est parfois utilisée pour déterminer le log K_{OE} . Un petit nombre d'études disponibles y recourent, essentiellement pour les biphényles chlorés et les dibenzodioxines (par exemple Li et Doucette, 1993) (3). Pour les substances susceptibles de s'ioniser, le K_{OE} se réfère à la forme non ionisée.

régimes semi-statiques sont acceptables à condition de respecter les critères de validité (voir paragraphes 24 et 113). Dans la méthode avec exposition par voie alimentaire, le régime dynamique n'est pas nécessaire pour maintenir dans le milieu aquatique les concentrations de la substance testée, mais il aidera à maintenir les concentrations adéquates d'oxygène dissous, à assurer la propreté de l'eau et à supprimer l'influence notamment des produits d'excrétion.

5. Quelle que soit la méthode retenue, cette LD offre suffisamment de détails pour que l'on puisse réaliser l'essai, tout en offrant une marge de liberté suffisante pour adapter le schéma expérimental aux conditions particulières des laboratoires et à la variation des caractéristiques des substances d'essai. L'essai par exposition via le milieu aquatique est le plus adapté pour les produits chimiques organiques stables avec des valeurs de $\log K_{OE}$ situées entre 1.5 et 6.0 (13), mais peut aussi s'appliquer aux substances très hydrophobes (dont le $\log K_{OE}$ est supérieur à 6.0), si l'on peut démontrer l'existence d'une concentration stable et pleinement dissoute de la substance d'essai dans l'eau. Si on ne peut démontrer une telle concentration, l'étude par exposition via le milieu aquatique n'est pas adaptée, aussi faut-il recourir à la méthode par la nourriture (encore que l'interprétation et l'utilisation des résultats de cet essai par voie alimentaire puissent dépendre du cadre réglementaire). Des pré-estimations du facteur de bioconcentration (FBC, parfois noté K_B) pour les produits chimiques organiques dont les valeurs de $\log K_{OE}$ sont supérieures à environ 9.0 peuvent être obtenues à l'aide de l'équation de Bintein *et al.* (14). La pré-estimation du facteur de bioconcentration pour des substances très hydrophobes de ce type peut être supérieure au facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES}) attendu pour des expériences en laboratoire, surtout si on utilise pour cette pré-estimation un modèle linéaire simple. Parmi les paramètres caractérisant le potentiel de bioaccumulation figurent la constante cinétique d'absorption (k_1), les constantes de perte dont la constante d'élimination (k_2), le facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES}), le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) et le facteur de bioamplification alimentaire (FBA)³.

6. Le marquage radioactif des substances d'essai peut faciliter l'analyse des échantillons d'eau, de nourriture et de poisson, et être utilisé pour décider s'il y a lieu ou non d'identifier et de quantifier les métabolites. Si la totalité des résidus radioactifs est mesurée seule (par exemple par solubilisation des tissus ou par combustion), le FBC ou le FBA est déterminé à partir de la totalité de la substance parente, des métabolites retenus ainsi que du carbone assimilé. Le FBC ou le FBA déduit de la totalité des résidus radioactifs ne peut donc être directement comparable au FBC ou au FBA obtenu par une analyse spécifique de la substance parente seule. Des procédures de séparation, telles que la CCM, la CLHP ou la CG⁴, peuvent être utilisées avant les études comportant un marquage radioactif pour déterminer le FBC ou le FBA correspondant à la substance parente. Quand on utilise des procédures de séparation, il convient d'identifier et de quantifier la substance parente et les métabolites pertinents⁵ (voir paragraphe 65) si le FBC ou le FBA est déduit de la concentration de la substance parente dans le poisson plutôt que de la totalité des résidus radioactifs. Il est également possible de combiner une étude du métabolisme dans le poisson ou une étude de distribution *in vivo* et une étude de bioaccumulation, grâce à l'analyse et à l'identification des résidus présents dans les tissus. La possibilité de métabolisme peut être prévue par des outils adaptés (par exemple la boîte à outils QSAR de l'OCDE (15) et les programmes QSAR déposés).

7. Le choix entre un essai par exposition via le milieu aquatique et un essai par voie alimentaire, et celui du dispositif d'essai, s'appuient sur les facteurs évoqués au paragraphe 3, ainsi que sur la réglementation en vigueur. Par exemple, pour des substances à $\log K_{OE}$ élevé, mais présentant une bonne solubilité dans l'eau compte tenu de la sensibilité des techniques d'analyse

(3) Voir définitions et unités à l'annexe 1.

(4) CCM : chromatographie en couche mince ; CLHP : chromatographie en phase liquide à haute performance ; CG : chromatographie en phase gazeuse.

(5) Dans certains cadres réglementaires, l'analyse des métabolites peut être obligatoire dans certaines conditions (voir paragraphe 65).

disponibles, un essai par exposition via le milieu aquatique est considéré en premier lieu. Il se peut cependant que l'information sur l'hydrosolubilité ne soit pas définitive pour ce type de produits chimiques hydrophobes, aussi convient-il, avant de décider de la méthode à utiliser (16), d'étudier la possibilité de préparer des concentrations dissoutes dans le milieu aquatique stables et mesurables (les émulsions stables n'étant pas permises) utilisables pour une étude par exposition via le milieu aquatique. Il n'est pas possible de donner des instructions exactes sur la méthode à employer en fonction de critères d'exclusion d'hydrosolubilité et de coefficient de partage octanol-eau, car d'autres facteurs (techniques d'analyse, dégradation, adsorption, etc.) peuvent avoir une influence marquée sur la validité de la méthode, pour les raisons indiquées plus haut. Néanmoins, à partir d'un $\log K_{OE}$ supérieur à 5 et d'une solubilité dans l'eau inférieure à $\sim 0.01 - 0.1$ mg/L les essais par exposition via le milieu aquatique deviennent de plus en plus difficiles.

8. D'autres facteurs susceptibles d'influencer le choix de l'essai sont examinés, notamment le potentiel de la substance à l'adsorption vers les récipients d'essai et les appareils, sa stabilité dans la solution aqueuse par rapport à sa stabilité dans la nourriture pour poisson (17) (18), etc.

9. D'autres études en milieu aquatique peuvent contenir des renseignements sur ces aspects pratiques. De plus amples informations sur l'évaluation des aspects liés à la performance des études de bioaccumulation sont disponibles dans la littérature [par exemple (19)].

10. S'agissant des substances pour lesquelles la solubilité ou le maintien de la concentration aqueuse et l'analyse de cette concentration ne représentent pas une contrainte pour la réalisation d'un essai par exposition via le milieu aquatique, cette méthode sera préférée pour déterminer le potentiel de bioconcentration. Dans tous les cas, on devra vérifier que la ou les concentrations de l'exposition via le milieu aquatique à appliquer s'inscrivent dans les limites d'hydrosolubilité dans les milieux d'essai. Différentes méthodes peuvent servir à maintenir des concentrations stables de la substance d'essai dissoute. On peut notamment recourir à des solutions mères ou à des systèmes de dosage passif (par exemple à la méthode d'élution sur colonne), pourvu qu'on puisse démontrer que des concentrations stables sont maintenues et que les milieux d'essai respectent les préconisations du paragraphe 27.

11. Pour les substances très hydrophobes ($\log K_{OE}$ supérieur à 5 et solubilité inférieure à $\sim 0.01-0.1$ mg/L), les essais par exposition via le milieu aquatique peuvent s'avérer ardu. La difficulté peut venir de ce qu'on ne parvient pas à maintenir la concentration aqueuse à un niveau considéré comme suffisamment constant (par exemple du fait de la sorption vers le verre des récipients ou de l'absorption rapide par le poisson) ou de ce que les concentrations aqueuses à appliquer sont si faibles qu'elles sont du même ordre de grandeur que la limite analytique de quantification ou inférieures à elle⁶. Pour ces substances très hydrophobes, il est recommandé de pratiquer l'essai par voie alimentaire, si celui-ci respecte la réglementation en vigueur et les obligations d'évaluation des risques.

12. Pour les tensioactifs, il convient d'examiner la faisabilité de l'essai de bioconcentration en milieu aquatique, compte tenu des propriétés de la substance, mais l'étude par voie alimentaire est probablement plus adaptée. Les tensioactifs sont des agents de surface, qui diminuent la tension interfaciale entre deux liquides. Amphiphiles (c'est-à-dire présentant une partie hydrophile et une partie hydrophobe), ils s'accumulent aux interfaces, par exemple eau-air, eau-nourriture et sur les parois en verre, ce qui empêche de déterminer leur concentration aqueuse.

13. L'essai par voie alimentaire peut contourner certaines difficultés d'exposition pour les mélanges complexes dont les composants présentent des limites d'hydrosolubilité différentes, dans la

(6) En général, les concentrations mesurées dans l'eau durant la phase d'absorption sont supérieures d'au moins une puissance dix à la limite de quantification, de sorte que plus d'une demi-vie de la charge corporelle puisse être mesurée lors de la phase d'élimination de l'étude.

mesure où il est plus probable d'obtenir une exposition comparable de tous les composants du mélange par voie alimentaire que par exposition en milieu aquatique [voir (20)].

14. Notons que la méthode par voie alimentaire permet d'obtenir un facteur de bioamplification alimentaire (FBA) et non un facteur de bioconcentration (FBC)⁷. Il existe des méthodes pour estimer un facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) à partir des données obtenues dans l'étude par voie alimentaire (voir annexe 8), mais elles sont à utiliser avec précaution. En général, ces méthodes supposent une cinétique du premier ordre, et ne sont applicables qu'à certains groupes de composés. Il est peu probable qu'elles puissent s'appliquer aux tensioactifs (voir paragraphe 12).

15. L'essai réduit avec exposition via le milieu aquatique comportant moins de temps d'échantillonnage afin de réduire le nombre d'animaux et/ou les ressources (voir paragraphes 83 et suivants) ne devra être choisi que pour les substances pour lesquelles on a des raisons de penser que l'absorption et l'élimination obéiront approximativement à la cinétique du premier ordre (c'est-à-dire en général pour les substances organiques non ionisées, voir paragraphe 88).

(7) Voir définitions et unités à l'annexe 1.

305 I : E ssai de bioconcentration chez le poisson par exposition via le milieu
aquatique

PRINCIPE DE L'ESSAI

16. L'essai se déroule en deux phases : l'exposition (absorption) et la post-exposition (élimination). Pendant la phase d'absorption, un groupe de poissons d'une même espèce est exposé à la substance d'essai à une ou plusieurs concentrations, en fonction des propriétés de la substance (voir paragraphe 49). Ces poissons sont ensuite transférés vers un milieu dépourvu de la substance d'essai, pour la phase d'élimination. La phase d'élimination est toujours nécessaire, sauf si l'absorption de la substance au cours de la phase d'absorption est négligeable. La concentration de la substance d'essai dans ou sur le poisson (ou dans un tissu spécifié de cet animal) est suivie au cours des deux phases de l'essai. Outre le groupe exposé, un groupe témoin de poissons est élevé dans des conditions identiques, sans être exposé à la substance d'essai, afin de comparer les éventuels effets nocifs observés dans l'essai de bioconcentration au comportement d'un groupe témoin analogue et d'obtenir la concentration naturelle de la substance d'essai⁸.

17. Dans l'essai par exposition via le milieu aquatique, la phase d'absorption dure généralement 28 jours. Cette durée peut au besoin être prolongée (voir paragraphe 18), ou raccourcie s'il est démontré que l'état stationnaire a été atteint plus tôt (voir définitions et unités à l'annexe 1). Il est possible de prédire la durée de la phase d'absorption et le temps nécessaire à l'instauration de l'état stationnaire à partir des équations données à l'annexe 5. La phase d'élimination, au cours de laquelle les poissons ne sont plus exposés à la substance d'essai, débute ensuite, les poissons étant transférés dans un récipient propre contenant un milieu identique, mais dépourvu de la substance d'essai. Il est préférable, dans la mesure du possible, de calculer le facteur de bioconcentration de deux manières, d'une part le facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES} ; voir définition à l'annexe 1), à savoir le rapport de la concentration dans les poissons (C_p) à la concentration dans l'eau (C_e) et, d'autre part, le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k ; voir définitions et unités à l'annexe 1 à l'annexe 1), à savoir le rapport de la constante cinétique d'absorption (k_1) à la constante cinétique d'élimination (k_2) dans l'hypothèse d'une cinétique du premier ordre⁹.

18. Si après 28 jours l'état stationnaire n'est pas encore atteint, il convient soit de calculer le FBC par la méthode cinétique (voir paragraphe 38) soit de prolonger la phase d'absorption. Si le temps requis pour atteindre l'état stationnaire est trop long dans la pratique (voir paragraphes 37 et 38 et annexe 5), on préférera la méthode cinétique. Pour les substances très hydrophobes, on envisagera de pratiquer l'essai par voie alimentaire¹⁰, si celui-ci respecte la réglementation en vigueur.

19. La constante cinétique d'absorption, la constante cinétique d'élimination (pertes) – ou les constantes, si des systèmes plus complexes sont en jeu –, le facteur de bioconcentration (à l'état stationnaire et/ou cinétique) et, si possible, l'intervalle de confiance de chacun de ces paramètres, sont

(8) Pour la plupart des substances d'essai, aucune concentration ne doit, dans l'idéal, être détectée dans l'eau témoin. Des concentrations ne doivent se retrouver que pour des matériaux d'origine naturelle (par exemple certains métaux) et des substances omniprésentes dans l'environnement.

(9) Si, de toute évidence, le système n'obéit pas à une cinétique du premier ordre, il convient de recourir à des modèles plus complexes (voir la bibliographie de l'annexe 5 et demander conseil à un biostatisticien).

(10) L'absorption peut être limitée par des concentrations d'exposition basses dues à la faible hydrosolubilité de la substance dans l'essai de bioconcentration ; l'essai par voie alimentaire permettra, lui, d'atteindre des concentrations d'exposition beaucoup plus fortes.

calculés à partir du modèle qui décrit le mieux les concentrations de la substance d'essai mesurées dans les poissons et dans l'eau (voir annexe 5).

20. La prise de poids des poissons durant l'essai provoquera chez eux une baisse de la concentration de la substance d'essai (c'est ce qu'on appelle la dilution par la croissance). Le FBC cinétique sera donc sous-estimé s'il n'est pas corrigé en conséquence (voir paragraphes 72 et 73).

21. Le FBC est déduit à partir de la concentration totale dans le poisson (autrement dit en fonction du poids frais total du poisson). On pourra toutefois utiliser des tissus ou des organes déterminés (par exemple les muscles, le foie) pour des raisons particulières, si le poisson est suffisamment grand ou s'il peut être divisé en fractions comestibles (filets) et non comestibles (viscères). Il existe une nette relation entre le potentiel de bioconcentration et l'hydrophobicité pour beaucoup de substances organiques, qui implique une autre relation entre la teneur en lipides du poisson d'essai et la valeur observée de la bioconcentration de ces substances. Dès lors, afin de réduire cette source de variabilité dans les résultats des essais portant sur des substances très lipophiles (c'est-à-dire dont le $\log K_{OE}$ est inférieur à 3), il convient d'exprimer la bioconcentration de façon normalisée rapportée à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 % (de son poids corporel total), outre la bioconcentration obtenue directement de l'essai. Cela est nécessaire pour pouvoir comparer les résultats obtenus pour différentes substances et/ou espèces d'essai. Une teneur en lipides de 5 % est généralement utilisée, car c'est la teneur moyenne en lipides des poissons le plus souvent utilisés dans le cadre de cette LD (21).

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

22. En dehors des propriétés de la substance d'essai énumérées dans l'introduction (paragraphe 3), il y a lieu de connaître sa toxicité pour l'espèce de poisson utilisée dans l'essai, de préférence la CL_{50} asymptotique (indépendante du temps) et/ou sa toxicité estimée lors d'essais à long terme sur des poissons [voir notamment les Lignes directrices de l'OCDE 210 (22), 212 (23), 215(24)].

23. Il convient de disposer d'une méthode d'analyse appropriée, dont on connaît la fiabilité, la précision et la sensibilité, pour quantifier la substance dans les solutions d'essai et dans le matériel biologique, ainsi que d'instructions précises pour la préparation et le stockage des échantillons. Il convient que la limite analytique de quantification de la substance d'essai dans l'eau et dans les tissus des poissons soit aussi connue. Lorsqu'on utilise une substance marquée à la radioactivité, il convient qu'elle présente une pureté très élevée (de préférence supérieure à 98 %) et que le pourcentage de radioactivité des impuretés soit connu.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

24. La validité de l'essai est subordonnée à la réalisation des conditions suivantes :

- la variation de la température est inférieure à $\pm 2^{\circ}\text{C}$, car des écarts importants peuvent influencer les paramètres biologiques pertinents pour l'absorption et l'élimination, mais aussi stresser les poissons ;
- la concentration de l'oxygène dissous reste supérieure ou égale à 60 % de saturation ;
- la concentration de la substance d'essai dans les chambres est maintenue dans un intervalle de + 20 % autour de la moyenne des valeurs mesurées pendant la phase d'absorption;

- la concentration de la substance d'essai est inférieure à sa limite de solubilité dans l'eau, en tenant compte de l'effet éventuel de l'eau d'essai sur la solubilité réelle¹¹ ;
- la mortalité, les maladies ou d'autres effets nocifs chez les poissons traités et témoins sont inférieurs à 10 % à la fin de l'essai ; lorsque l'essai dure plusieurs semaines ou mois, la mortalité ou d'autres effets nocifs dans les deux groupes de poissons sont inférieurs à 5 % par mois et ne dépasseront pas 30 % en tout. Des différences significatives de croissance moyenne entre les échantillons du groupe d'essai et du groupe témoin pourraient indiquer un effet toxique de la substance d'essai.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

25. Il serait utile de disposer de substances de référence à faible métabolisme et potentiel de bioconcentration connu pour vérifier le mode opératoire, le cas échéant (par exemple quand un laboratoire n'a encore jamais réalisé l'essai ou quand les conditions expérimentales ont été modifiées).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

26. Il convient qu'aucune partie du montage ne comporte de matériaux susceptibles d'être dissous, lessivés ou sorbés et de nuire aux poissons. Des bassins classiques, rectangulaires ou cylindriques, composés d'un matériau chimiquement inerte et dotés d'une capacité adaptée au taux de charge (voir paragraphe 43), peuvent être utilisés. Il convient de minimiser l'emploi des tubes en plastique souple. On choisira des tubes en Teflon[®], en acier inoxydable ou en verre. L'expérience a montré qu'en présence de substances d'essai à coefficient d'adsorption élevé, telles que les pyrèthrine synthétiques, il sera peut-être nécessaire d'utiliser du verre silanisé. Dans ces circonstances, l'appareillage devra être jeté après usage. Il est préférable d'exposer les systèmes d'essai aux concentrations voulues de la substance aussi longtemps que nécessaire pour démontrer le maintien de concentrations d'exposition stables avant l'introduction des organismes d'essai.

Eau

27. Pour l'essai, on utilise généralement une eau naturelle obtenue à partir d'une source non contaminée et de qualité constante. Néanmoins, l'eau reconstituée (eau déminéralisée dans laquelle des nutriments spécifiques ont été ajoutés en quantités connues) peut être plus adaptée pour garantir une qualité uniforme dans le temps. La qualité de l'eau de dilution, c'est-à-dire de l'eau mélangée avec la substance d'essai avant d'être introduite dans le récipient d'essai (voir paragraphe 30), doit permettre à l'espèce de poisson choisie de survivre pendant la durée de l'acclimatation et de l'essai, sans présenter d'anomalies sur le plan du comportement ou de l'apparence. Idéalement, il faudrait démontrer que l'espèce testée peut survivre, croître et se reproduire dans l'eau de dilution (par exemple par un élevage en laboratoire ou par un essai de toxicité sur la totalité du cycle de vie). L'eau de dilution est au moins caractérisée par le pH, la dureté, les solides totaux, le carbone organique total (COT¹²) et de préférence aussi l'ammonium, les nitrites et l'alcalinité, ainsi que la salinité dans le cas des espèces marines. Les paramètres qui commandent le bien-être optimal des poissons ne sont pas entièrement connus, mais l'annexe 2 fournit les concentrations maximales recommandées de plusieurs paramètres pour des espèces d'eau douce et d'eau de mer.

(11) Pour les substances multi-composants comme les UVCB (substances de composition inconnue ou variable), l'hydrosolubilité de chaque composant pertinent est examinée pour déterminer les concentrations d'exposition appropriées.

(12) Le COT comprend le carbone organique particulaire et le carbone organique dissous. En d'autres termes, COT = COP + COD.

28. Il convient que la qualité de l'eau de dilution reste constante tout au long de l'essai. Le pH est compris entre 6.0 et 8.5 au début de l'essai, mais sans varier au-delà de ± 0.5 unité de pH au cours d'un essai donné. On analysera des échantillons prélevés à divers intervalles, afin de veiller à ce que l'eau de dilution n'influence les résultats de l'essai (par exemple par complexation de la substance d'essai) ou ne perturbe le comportement des poissons, au moins au début et à la fin de l'essai. Il convient de déterminer les métaux lourds (par exemple Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), les principaux anions et cations (par exemple Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), les pesticides (par exemple le total des organophosphorés et le total des organochlorés), le carbone organique total et les solides en suspension, par exemple tous les trois mois si on sait que l'eau de dilution présente une qualité relativement constante. S'il a été prouvé que la qualité de l'eau de dilution est demeurée constante pendant au moins un an, les déterminations peuvent être espacées et avoir lieu, par exemple, tous les six mois).

29. La teneur naturelle de l'eau de dilution en particules et en carbone organique total est aussi basse que possible pour éviter l'adsorption de la substance d'essai sur la matière organique, ce qui réduirait sa biodisponibilité et conduirait à sous-estimer le FBC. La valeur maximale acceptable s'élève à 5 mg/L pour les matières particulaires (matière sèche retenue par un filtre de 0.45 μm) et à 2 mg/L pour le carbone organique total (voir annexe 2). Au besoin, l'eau de dilution est filtrée avant utilisation. Il convient que la contribution des excréta des poissons testés et des résidus alimentaires à la teneur en carbone organique de l'eau d'essai soit aussi faible que possible (voir paragraphe 46).

Solutions d'essai

30. On préparera une solution mère de la substance d'essai à la concentration appropriée. Il vaut mieux préparer la solution mère par simple mélange ou agitation de la substance d'essai dans l'eau de dilution. Une autre option adaptée dans certains cas consiste à utiliser un système de dosage de désorption de la phase solide. Il est généralement déconseillé de recourir à des solvants et à des dispersants (agents solubilisants) [voir (25)]; néanmoins, l'utilisation de ces produits peut être acceptable pour obtenir une solution mère à la concentration appropriée, mais il convient de s'efforcer d'y recourir aussi peu que possible et de ne pas dépasser leur concentration micellaire critique (le cas échéant). Les solvants qui peuvent être utilisés sont l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthylformamide et le triéthylène glycol; les dispersants qui ont été utilisés sont le Tween 80, la méthylcellulose à 0.01 % et l'HCO-40. Il convient que la concentration de solvant dans le milieu d'essai final soit la même dans tous les traitements (indépendamment de la concentration de la substance) et n'excède pas les niveaux de toxicité définis pour le solvant dans les conditions d'essai. La concentration maximale est de 100 mg/L (ou 0.1 ml/L). Il est peu probable qu'une concentration de solvant de 100 mg/L modifie beaucoup la concentration maximale de substance d'essai dissoute pouvant être obtenue dans le milieu d'essai (25). Il convient que la contribution du solvant et celle de la substance d'essai à la teneur en carbone organique total de l'eau de l'essai soient connues. Tout au long de l'essai, la concentration du carbone organique total dans les récipients d'essai ne devra pas dépasser la concentration du carbone organique provenant de la substance d'essai et, le cas échéant, du solvant ou du solubilisant¹³, de plus de 10 mg/L (± 20 %). La teneur en matières organiques peut avoir un effet important sur le volume de substance d'essai dissoute dans les essais dynamiques, en particulier pour les substances très lipophiles. La microextraction en phase solide (voir paragraphe 60) peut fournir des informations importantes sur le ratio entre composés liés et dissous libres, ces derniers étant considérés comme la fraction biodisponible. Il convient que la concentration de la substance d'essai soit inférieure à la limite de solubilité de cette substance dans le milieu d'essai malgré l'utilisation d'un solvant ou d'un solubilisant. Des précautions s'imposent lors de l'utilisation de solvants facilement biodégradables, ceux-ci pouvant poser des problèmes de prolifération bactérienne dans les essais dynamiques. S'il n'est pas possible de préparer une solution mère sans recourir à un

(13) Bien que ce ne soit généralement pas recommandé, si un solvant ou un agent solubilisant est utilisé, le carbone organique en provenant est ajouté à celui issu de la substance d'essai pour évaluer la concentration en carbone organique dans les récipients d'essai.

agent solubilisant, il convient d'évaluer l'intérêt d'un essai par exposition en milieu aquatique par rapport à un essai par voie alimentaire.

31. Les essais dynamiques demandent un système capable de fournir et de diluer continuellement une solution mère de la substance d'essai (par exemple une pompe doseuse, un dilueur proportionnel, un système de saturation) ou un système de dosage de désorption de la phase solide, afin d'obtenir la concentration voulue dans les enceintes d'essai. Le volume sera remplacé de préférence cinq fois par jour dans chaque chambre d'essai. Le régime dynamique est préférable, mais lorsqu'il ne sera pas possible de l'instaurer (par exemple lorsque cela porte préjudice aux organismes testés), une technique semi-statique peut être utilisée à condition de respecter les critères de validité (voir paragraphe 24). Les débits des solutions mères et de l'eau de dilution sont vérifiés 48 heures avant l'essai et au moins une fois par jour pendant l'essai. Au cours de cette vérification, il faudra déterminer le débit dans chaque enceinte d'essai et veiller à ce que sa variation n'excède pas 20 % au sein des enceintes et entre les enceintes.

Sélection des espèces

32. Les critères importants dans la sélection des espèces sont leur disponibilité immédiate, leur taille adéquate et le fait qu'elles supportent bien les conditions du laboratoire. D'autres critères orientent la sélection des espèces de poissons, comme leur importance récréative, commerciale et écologique ainsi que leur sensibilité comparable, les bons résultats qu'elles ont donnés précédemment, etc. Des espèces recommandées pour les essais sont énumérées à l'annexe 3. D'autres espèces peuvent être utilisées, mais le mode opératoire devra éventuellement être adapté pour que l'essai se déroule dans des conditions appropriées. Dans ce cas, il convient de justifier le choix de l'espèce et d'exposer la méthode expérimentale. En général, l'utilisation de petites espèces réduira le délai d'établissement du régime stationnaire, mais un plus grand nombre de poissons (prélèvements) peut être nécessaire pour analyser correctement la teneur en lipides et la concentration de la substance d'essai dans les poissons. En outre, des différences de fréquence respiratoire et de métabolisme entre les poissons jeunes et les poissons plus âgés peuvent empêcher les comparaisons entre essais et entre espèces. Pratiquer l'essai sur des poissons à un stade précoce de leur vie (juvéniles) en croissance rapide peut compliquer l'interprétation des données.

Conditions de vie des poissons en laboratoire (pertinentes pour les expositions via le milieu aquatique et par voie alimentaire)

33. Le stock de poissons est acclimaté dans l'eau pendant au moins deux semaines (voir paragraphe 28) à la température de l'essai et être suffisamment nourri pendant toute cette période (voir paragraphe 45). L'eau et le régime alimentaire sont du même type que ceux qu'on utilisera durant l'essai.

34. Après une période d'adaptation de 48 heures, on enregistre la mortalité et on applique les critères suivants :

- Si la mortalité est supérieure à 10 % de la population en sept jours : on rejette la totalité du lot ;
- Si la mortalité est comprise entre 5 et 10 % de la population en sept jours : on acclimate les organismes pendant sept jours supplémentaires (si la mortalité de la deuxième semaine dépasse 5 %, on rejette la totalité du lot) ;
- Si la mortalité est inférieure à 5 % de la population en sept jours : on accepte le lot.

35. On s'assurera que les poissons utilisés dans les essais ne présentent pas de maladies ou d'anomalies observables. Tous les poissons malades seront éliminés. Il convient de ne pas traiter les poissons pour une maladie durant les deux semaines qui précèdent l'essai ou pendant l'essai.

DÉROULEMENT DE L'ESSAI

Essai préliminaire

36. Il peut être utile de conduire un essai préliminaire pour optimiser les conditions expérimentales de l'essai définitif, par exemple du point de vue de la sélection de la (des) concentration(s) de la substance d'essai. L'essai préliminaire est conçu de façon à obtenir les informations requises. On peut ainsi examiner si un essai réduit peut suffire à obtenir un FBC ou si une étude complète est requise (voir les paragraphes 83 à 95 sur l'essai réduit).

Conditions d'exposition

Durée de la phase d'absorption

37. La durée de la phase d'absorption peut être prédite expérimentalement (par exemple à partir d'une étude précédente ou d'une étude d'accumulation portant sur un produit chimique de structure voisine) ou d'après certaines relations empiriques qui exploitent la connaissance que l'on a du coefficient de partage n-octanol/eau ou de l'hydrosolubilité de la substance d'essai (à condition que l'absorption soit régie par une cinétique du premier ordre, voir annexe 5).

38. La phase d'absorption dure 28 jours, sauf s'il est démontré que l'état stationnaire a été atteint plus tôt (voir définitions et unités à l'annexe 1 à l'annexe 1). La courbe de la concentration de la substance d'essai dans le poisson (C_p) en fonction du temps atteint un état stationnaire lorsqu'elle devient parallèle à l'axe du temps et que les résultats de trois analyses successives de la C_p , réalisées sur des échantillons prélevés à au moins deux jours d'intervalle, ne s'écartent pas de plus de 20 % l'un de l'autre, et qu'il n'y a pas d'augmentation nette de C_p dans le temps entre la première et la dernière analyse successive. Les échantillons regroupés font l'objet d'au moins quatre analyses successives. Pour les substances d'essai qui sont absorbées lentement, il serait plus approprié de prendre des intervalles de sept jours. Si l'état stationnaire n'a pas été atteint en 28 jours, il convient soit de calculer le FBC par la méthode cinétique seule, qui ne dépend pas de l'établissement du régime stationnaire, soit de prolonger la phase d'absorption, en poursuivant les mesures, jusqu'à ce que l'état stationnaire soit atteint ou jusqu'à 60 jours, suivant ce qui est le plus rapide. En outre, il convient que la concentration de la substance d'essai dans le poisson à la fin de la période d'absorption soit suffisamment élevée pour permettre une estimation fiable de la constante k_2 lors de la phase d'élimination. Si aucune absorption significative n'est constatée après 28 jours, l'essai peut être arrêté.

Durée de la phase d'élimination

39. Pour les substances régies par une cinétique du premier ordre, une période égale à la moitié de la phase d'absorption suffit généralement à entraîner une diminution appropriée (par exemple 95 %) de la charge corporelle de la substance d'essai (voir annexe 5 pour une explication de l'estimation). Si le temps requis pour obtenir une élimination de 95 % est trop long dans la pratique et qu'il excède, par exemple, le double de la durée normale de la phase d'absorption (c'est-à-dire plus de 56 jours), on peut appliquer une période plus courte (jusqu'à ce que la concentration de la substance d'essai soit inférieure à 10 % de la concentration à l'état stationnaire, par exemple). Néanmoins, une phase d'élimination plus longue peut être nécessaire pour les substances dont l'absorption et l'élimination suivent des lois plus complexes que celles qui sont représentées par le modèle à compartiment unique pour les poissons, qui obéit à une cinétique du premier ordre. Si on observe de tels phénomènes et/ou si on s'attend à les observer, il est recommandé de demander conseil à un biostatisticien et/ou à un pharmacocinéticien pour garantir un bon dispositif d'essai. Lorsque la phase

d'élimination est prolongée, le nombre de poissons à prélever peut devenir un obstacle et les différences dans la croissance des poissons peuvent influencer les résultats. La durée de la phase dépendra également de la période durant laquelle la concentration de la substance d'essai dans les poissons reste supérieure à la limite analytique de quantification.

Nombre de poissons testés

40. Le nombre de poissons par concentration d'essai est choisi de manière à ce que les échantillons comportent au moins quatre poissons à chaque temps d'échantillonnage. Les poissons ne sont regroupés que si l'analyse d'un seul poisson n'est pas praticable. Si on souhaite une plus grande précision dans l'ajustement des courbes (et dans les paramètres dérivés) ou si des études de métabolisme sont requises (par exemple pour faire la distinction entre les métabolites et la substance mère quand on utilise des substances marquées à la radioactivité), il faut un plus grand nombre de poissons par temps d'échantillonnage. La teneur en lipides et la concentration de la substance d'essai sont déterminées sur le même matériel biologique. Si ce n'est pas faisable, des poissons supplémentaires peuvent être nécessaires (voir paragraphes 56 et 57).

41. Si l'on utilise des poissons adultes (c'est-à-dire sexuellement matures), il convient qu'ils ne soient pas en période de frai pendant l'essai ou qu'ils n'aient pas récemment frayé. Il faut aussi préciser s'il s'agit de mâles ou de femelles, ou des deux. Si les deux sexes sont utilisés, il convient de démontrer qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux sexes du point de vue de la croissance et de la teneur en lipides avant le début de l'exposition, en particulier si on prévoit que le regroupement de mâles et de femelles sera nécessaire pour obtenir des concentrations détectables de la substance et/ou la teneur en lipides.

42. Dans tous les essais, il convient de choisir des poissons de poids voisin de telle sorte que le poids des plus petits ne soit pas inférieur aux deux tiers du poids des plus gros. Il convient qu'ils soient tous de la même année et proviennent de la même source. Le poids et l'âge d'un poisson pouvant avoir une incidence importante sur le FBC (12), il y a lieu de consigner ces détails avec précision. On recommande de peser un sous-échantillon du stock de poissons peu de temps avant l'essai, afin d'estimer le poids moyen (voir paragraphe 61).

Taux de charge

43. On appliquera des rapports élevés du volume d'eau au poids des poissons afin de minimiser la réduction de la concentration du composé d'essai dans l'eau provoquée par l'introduction des poissons au début de l'essai et d'éviter une diminution de la concentration de l'oxygène dissous. Il est important d'adapter le taux de charge à l'espèce de poisson. Quoiqu'il en soit, on recommande normalement un taux de charge de 0.1-1.0 g de poissons (poids frais) par litre d'eau et par jour. Des taux de charge plus élevés peuvent être pratiqués, s'il a été prouvé que la concentration requise de la substance d'essai peut être maintenue à $\pm 20\%$ près et que la concentration de l'oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 60 % de la saturation (voir paragraphe 24).

44. L'habitat naturel du poisson guide le choix du régime de charge. Les espèces benthiques, par exemple, peuvent avoir besoin d'un aquarium doté d'un plus grand fond pour le même volume d'eau que les espèces pélagiques.

Alimentation

45. Pendant les périodes d'acclimatation et d'essai, les poissons recevront une alimentation appropriée, dont la teneur en lipides et en protéines totales est connue, en quantité suffisante pour être en bonne santé et conserver leur poids (une certaine croissance est permise). Il convient de les nourrir quotidiennement pendant les périodes d'acclimatation et d'essai suivant un dosage qui est fonction de l'espèce utilisée, des conditions expérimentales et de la valeur calorique des aliments (par exemple

pour la truite, un dosage approximatif de 1 à 2 % du poids corporel par jour). La ration alimentaire est définie de manière à éviter un développement rapide et une forte augmentation de la teneur en lipides. Pour maintenir une ration stable, le volume de nourriture est recalculé s'il y a lieu, par exemple une fois par semaine. Pour ce calcul, le poids des poissons de chaque chambre d'essai peut être estimé à partir du poids des derniers poissons prélevés dans cette chambre. Il ne faut pas peser les poissons qui restent dans la chambre.

46. Dans les chambres d'essai, les aliments non consommés et les excréments seront siphonnés chaque jour, peu après l'alimentation (de 30 minutes à une heure après celle-ci). Il convient que les chambres restent aussi propres que possible tout au long de l'essai, pour maintenir la concentration de matières organiques aussi basse que possible (voir paragraphe 29), la présence de carbone organique pouvant limiter la biodisponibilité de la substance d'essai (12).

47. Comme beaucoup d'aliments sont à base de farine de poissons, il convient de veiller à ce qu'ils n'influencent pas les résultats de l'essai ou n'induisent pas d'effets négatifs, par exemple en contenant des (traces de) pesticides, de métaux lourds et/ou de la substance d'essai elle-même.

Lumière et température

48. Une photopériode de 12 à 16 heures est recommandée et il convient que la température (± 2 °C) soit adaptée à l'espèce testée (voir annexe 3). Il convient de connaître le type et les caractéristiques de l'illumination. Il convient de faire attention à une éventuelle phototransformation de la substance d'essai dans les conditions d'irradiation appropriée afin d'éviter d'exposer les poissons à des produits de photodégradation. Dans certains cas, il suffit d'utiliser un filtre pour éliminer les radiations ultra-violet inférieures à 290 nm.

Concentrations d'essai

49. Cet essai a tout d'abord été conçu pour les substances organiques non polaires. Pour ce type de produit, l'exposition d'un poisson à une concentration unique devrait être suffisante, puisqu'on n'attend pas d'effet de concentration, bien que le cadre réglementaire en vigueur puisse exiger deux concentrations. Si on teste d'autres types de substances, ou s'il existe d'autres indications de dépendance éventuelle à la concentration, l'essai est réalisé avec deux concentrations ou plus. Si on ne teste qu'une concentration, il convient de justifier le choix de cette concentration (voir paragraphe 79). En outre, il convient que la concentration testée soit aussi basse qu'il est pratiquement et techniquement faisable (autrement dit, elle n'approche pas la limite de solubilité).

50. Dans certains cas on peut s'attendre à ce que la bioconcentration d'une substance dépende de sa concentration dans l'eau (par exemple pour les métaux, pour lesquels l'absorption par les poissons peut être au moins en partie régulée). Dans des cas de ce type, il peut être nécessaire de tester au moins deux concentrations, et si possible plus (voir paragraphe 49) pertinentes d'un point de vue environnemental. De plus, pour les substances pour lesquelles les concentrations testées doivent, pour des raisons pratiques, se rapprocher de la limite de solubilité, il est recommandé de tester au moins deux concentrations, ce qui peut donner une idée de la fiabilité des concentrations d'exposition. Parmi les concentrations d'essai figurent la concentration réaliste sur le plan environnemental ainsi que celle pertinente pour l'objet spécifique de l'évaluation.

51. Il convient que la ou les concentrations de la substance d'essai soient inférieures au niveau auquel elles produisent un effet chronique ou à 1 % de la CL_{50} aiguë asymptotique, s'inscrivent dans une fourchette pertinente du point de vue de l'environnement et soient supérieures d'au moins une puissance dix à la limite de quantification dans l'eau par la méthode d'analyse utilisée. La concentration d'essai la plus élevée admise peut être déterminée en divisant la CL_{50} aiguë (96 h) par un rapport aigu/chronique (par exemple des rapports adéquats pour certains produits chimiques se situent autour de 3, mais quelques-uns sont au-dessus de 100). Si une seconde concentration est utilisée, il

convient qu'elle diffère de la première d'un facteur dix. Si ce n'est pas possible en raison du critère de toxicité (qui plafonne la concentration d'essai) et du seuil de détection analytique, il convient d'envisager d'appliquer un facteur inférieur à 10 et d'utiliser une substance d'essai marquée à la radioactivité (de la pureté la plus élevée, de préférence supérieure à 98 %). Il convient de veiller à ce que la concentration de la substance d'essai ne dépasse pas sa solubilité dans le milieu d'essai.

Témoins

52. Un groupe témoin traité avec de l'eau de dilution ou, le cas échéant, (voir paragraphes 30 et 31), avec le solvant est testé parallèlement aux groupes traités avec la substance d'essai.

Fréquence des mesures de la qualité de l'eau

53. Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le carbone organique total, le pH et la température sont mesurés dans tous les récipients d'essai et témoins. La dureté totale et la salinité (le cas échéant) sont mesurées dans le(s) groupe(s) témoin(s) et dans le récipient. Si au moins deux concentrations sont testées, il convient de mesurer ces paramètres à la concentration la plus élevée. L'oxygène dissous et la salinité (le cas échéant) sont mesurés au moins trois fois pendant la période d'absorption (au début, vers le milieu et à la fin) et au moins une fois par semaine pendant la période d'élimination. Le carbone organique total est mesuré au début de l'essai (24 h et 48 h avant le début de la phase d'absorption) avant l'introduction des poissons et au moins une fois par semaine pendant les phases d'absorption et d'élimination. La température devrait être mesurée et enregistrée quotidiennement, le pH au début et à la fin de chaque période et la dureté une fois au cours de l'essai. La température est de préférence mesurée en continu dans au moins un récipient.

Prélèvement et analyse des poissons et de l'eau

Programme de prélèvement des poissons et de l'eau

54. On prélèvera de l'eau dans les chambres d'essai afin de déterminer la concentration de la substance d'essai avant l'introduction des poissons et pendant les phases d'absorption et d'élimination. L'eau est prélevée en même temps que les poissons et avant leur alimentation. Des prélèvements plus fréquents peuvent être utiles pour garantir la stabilité des concentrations après l'introduction des poissons. Il convient de déterminer les concentrations de la substance d'essai pendant la phase d'absorption pour vérifier si les critères de validité ont été respectés (paragraphe 24). Si l'analyse de l'eau prélevée au début de la phase d'élimination ne détecte pas de substance d'essai, cela peut justifier de ne plus rechercher la présence de cette substance dans l'eau d'essai et l'eau témoin pour le restant de la phase d'élimination.

55. Les poissons seront prélevés au moins cinq fois pendant la phase d'absorption et au moins quatre fois pendant la phase d'élimination de la substance d'essai. Comme dans certains cas il sera difficile de calculer une estimation raisonnablement précise du FBC avec ce nombre d'échantillons (en particulier lorsque l'absorption et l'élimination n'obéiront pas à une simple cinétique du premier ordre), il peut se justifier de prélever des échantillons plus fréquemment au cours des deux périodes (voir annexe 4).

56. La teneur en lipides et la concentration de la substance d'essai sont déterminées sur le même matériel biologique au moins au début et à la fin de la phase d'élimination. Si ce n'est pas praticable, au moins trois poissons devront être prélevés pour déterminer leur teneur en lipides à chacun des trois mêmes temps d'échantillonnage. Il faudra ajuster en conséquence le nombre de poissons par bassin au début de l'expérience¹⁴. Sinon, si on ne détecte pas un volume important de substance d'essai dans les

(14) Si la teneur en lipides et la concentration de la substance d'essai ne sont pas mesurées sur le même poisson, les poissons utilisés ont au moins un poids similaire et (si approprié) être du même sexe.

poissons témoins (c'est-à-dire les poissons du stock), les poissons témoins de l'essai peuvent n'être analysés que pour leur teneur en lipides, et l'analyse de la substance d'essai dans le ou les groupes d'essai (ainsi que la constante cinétique d'absorption, la constante cinétique d'élimination et le FBC associés) peut être corrigée en fonction de la teneur en lipides du groupe témoin au cours de l'essai¹⁵.

57. Les poissons morts ou malades ne sont pas être analysés à la recherche d'une concentration de la substance d'essai ou de leur teneur en lipides.

58. Un exemple de programme de prélèvement acceptable est donné à l'annexe 4. D'autres programmes peuvent être établis facilement d'après d'autres valeurs supposées du K_{OE} qui permettent de calculer le temps d'exposition correspondant à une absorption de 95 % (se reporter à l'annexe 5 pour les calculs).

59. Pendant la phase d'absorption, les prélèvements se poursuivent jusqu'à ce que l'état stationnaire soit atteint (voir définitions et unités à l'annexe 1 à l'annexe 1) ou que la phase d'absorption s'achève (après 28 ou 60 jours, voir paragraphes 37 et 38). Avant d'entamer la phase d'élimination, il convient de transférer les poissons dans des récipients propres.

Prélèvement et préparation des échantillons

60. On prélèvera les échantillons d'eau à analyser par exemple en siphonnant à travers un tube inerte à partir d'un point central de l'enceinte d'essai. La centrifugation ou la filtration ne réussissent pas toujours à séparer les fractions biodisponible et non biodisponible de la substance d'essai. Si on recourt à une technique de séparation, il convient de la justifier ou de la valider dans le rapport d'essai, compte tenu des difficultés de biodisponibilité (25). Les prélèvements de produits chimiques très hydrophobes, en particulier (c'est-à-dire dont le $\log K_{OE}$ est inférieur à 5) (12) (26), pour lesquels une adsorption vers le filtre ou vers les récipients de centrifugation peut survenir, ne sont pas soumis à ces traitements. En revanche, il convient de s'efforcer de maintenir la plus grande propreté dans les aquariums (voir paragraphe 46) et de suivre la teneur en carbone organique totale pendant les phases d'absorption et d'élimination (voir paragraphe 53). Pour éviter les problèmes potentiels dus à la réduction de la biodisponibilité, on peut réaliser, pour les substances faiblement solubles et très hydrophobes, des prélèvements par techniques de microextraction en phase solide.

61. Il convient d'euthanasier instantanément les poissons prélevés, suivant la méthode la plus appropriée et la moins cruelle (pour des mesures sur des poissons entiers, il suffit de rincer ceux-ci à l'eau (voir paragraphe 28) et de les sécher en surface). Il convient ensuite de peser les poissons et de mesurer leur longueur totale¹⁶. Pour chaque poisson, le poids et la longueur mesurés sont reliés à la concentration chimique analysée (et s'il y a lieu à la teneur en lipides), par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé.

62. Il est préférable d'analyser les poissons et l'eau immédiatement après les avoir prélevés pour éviter les dégradations ou d'autres pertes et de calculer des constantes d'absorption et d'élimination approximatives pendant le déroulement de l'essai. En procédant à une analyse immédiate, on évite aussi de retarder la détermination du moment où le plateau (état stationnaire) a été atteint.

(15) Cette solution alternative n'est valable que si les poissons de tous les groupes d'essai sont répartis en groupes de taille similaire, prélevés selon la même méthode et nourris de manière identique. Cela garantit que la croissance des poissons est la même dans tous les groupes d'essai, si la concentration testée est inférieure au seuil toxique. Si la croissance est similaire, la teneur en lipides devrait l'être aussi. Une différence de croissance dans le groupe témoin indiquerait un effet de la substance et invaliderait l'essai.

(16) Outre le poids, la longueur totale est enregistrée car l'augmentation de cette longueur au cours de l'essai est un bon indicateur de la survenue d'un éventuel effet négatif.

63. À défaut de pouvoir pratiquer une analyse immédiate, on stockera les échantillons selon une méthode appropriée. Avant de commencer l'étude, on se renseignera sur la méthode de stockage adaptée à la substance d'essai, par exemple la congélation, la conservation à 4 °C, l'extraction, etc. La durée de stockage est choisie de façon à ce que le produit chimique ne se dégrade pas pendant le stockage.

Qualité de la méthode d'analyse

64. Comme toute la procédure est essentiellement subordonnée à la fiabilité, la précision et la sensibilité de la méthode d'analyse appliquée à la substance d'essai, il convient de vérifier expérimentalement que la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique ainsi que l'isolement de la substance d'essai à partir de l'eau et du poisson sont satisfaisants pour la méthode en question. Ces vérifications s'effectuent au cours des essais préliminaires. Il convient de s'assurer également que la substance d'essai n'est pas détectable dans l'eau de dilution utilisée. Il faudra, au besoin, corriger les valeurs de la concentration de la substance d'essai dans l'eau et dans les poissons en fonction des valeurs fournies par les témoins pour l'isolement de la substance d'essai et sa concentration naturelle. Les échantillons d'eau et de poisson sont manipulés avec soin tout au long de l'essai de manière à minimiser la contamination et les pertes (provoquées par l'adsorption sur l'instrument de prélèvement, par exemple).

Analyse des échantillons de poissons

65. Si on utilise du matériel marqué pendant l'essai, il est possible d'analyser la radioactivité totale (c'est-à-dire celle de la substance parente et des métabolites) ou de purifier les échantillons pour analyser la substance parente séparément. Si le FBC doit s'appuyer sur la substance parente, les principaux métabolites sont caractérisés, au minimum à la fin de la phase d'absorption (voir paragraphe 6). Les principaux métabolites sont ceux qui représentent au moins 10 % des résidus totaux présents dans les tissus des poissons, ceux qui en représentent au moins 5 % à deux temps d'échantillonnage consécutifs, ceux en hausse tout au long de la phase d'absorption, enfin, ceux dont on sait qu'ils posent des problèmes toxicologiques. Si le FBC pour l'ensemble du poisson, en termes de résidus radiomarqués totaux, est supérieur ou égal à 500, il peut être conseillé, et même fortement recommandé dans le cas de certains produits chimiques comme les pesticides – d'identifier et de quantifier les principaux métabolites. La quantification de ces métabolites peut être exigée par certaines autorités réglementaires. Si les produits de dégradation représentant 10 % ou plus (> 10 %) des résidus radioactifs totaux dans les poissons sont identifiés et quantifiés, il est alors aussi recommandé d'identifier et de quantifier les produits de dégradation dans l'eau d'essai. Si ce n'est pas praticable, il y a lieu de l'expliquer dans le rapport.

66. La concentration de la substance d'essai est habituellement déterminée pour chaque poisson pesé individuellement. Si cela est impossible, on peut regrouper les échantillons d'un même prélèvement, mais cette opération limite le traitement statistique applicable aux résultats, aussi y a-t-il lieu d'inclure un nombre suffisant de poissons dans l'essai pour que le regroupement, la procédure et la précision voulus soient possibles. Les références (27) et (28) peuvent servir d'introduction sur les procédures de regroupement adaptées.

67. Il convient d'exprimer le FBC de façon normalisée rapportée à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 % (par rapport à son poids frais), outre le FBC obtenu directement de l'essai (voir paragraphe 21), à moins de pouvoir démontrer que la substance d'essai ne s'accumule pas prioritairement dans les lipides. Il faut, si possible, déterminer la teneur en lipides des poissons à chaque prélèvement, de préférence à partir du même extrait que la substance d'essai, l'extrait devant souvent être débarrassé de ses lipides avant d'être analysé par chromatographie. Néanmoins, l'analyse des substances d'essai nécessite souvent des procédures d'extraction spécifiques, qui peuvent être en contradiction avec les lignes directrices sur la détermination des lipides. Dans ce cas (jusqu'à ce que des méthodes instrumentales non destructives adaptées soient disponibles), il est recommandé

d'employer une stratégie différente pour déterminer la teneur en lipides des poissons (voir paragraphe 56). Les lipides sont déterminés suivant les méthodes appropriées (20). On recommande (30) habituellement la technique d'extraction chloroforme/méthanol (29), mais la méthode de Smedes (31) peut également être utilisée. Elle présente la même efficacité d'extraction, une grande précision, utilise moins de solvants organiques toxiques et facilite la performance. D'autres méthodes dont la précision soutient la comparaison avec les méthodes recommandées peuvent être utilisées, à condition de justifier correctement leur choix. Il est important de donner des détails sur la méthode mise en œuvre.

Mesure du développement des poissons

68. Au début de l'essai, il convient de peser et de mesurer un à un cinq à dix poissons du stock. Il peut s'agir des mêmes poissons utilisés pour l'analyse lipidique (voir paragraphe 56). Il convient de mesurer le poids et la longueur des poissons issus des groupes d'essai et témoins utilisés pour chaque échantillonnage avant de procéder à leur analyse chimique ou lipidique. Ces mesures peuvent servir à estimer le poids et la longueur des poissons restant dans les bassins d'essai et témoins (voir paragraphe 45).

RAPPORT D'ESSAI ET RÉSULTATS

Traitement des résultats

69. On tracera la courbe de l'absorption de la substance d'essai en portant sur un diagramme arithmétique sa concentration dans/sur le poisson (ou dans des tissus spécifiés) pendant la phase d'absorption en fonction du temps. Si la courbe atteint un plateau, autrement dit si elle devient approximativement asymptotique par rapport à l'axe du temps, on calcule le FBC à l'état stationnaire (FBC_{ES}) à l'aide de la formule suivante :

$$\frac{C_p \text{ à l'état stationnaire (moyenne)}}{C_e \text{ à l'état stationnaire (moyenne)}}$$

Le développement de C_p peut être influencé par la croissance des poissons (voir paragraphes 72 et 73). La concentration moyenne d'exposition (C_e) est influencée par la variation dans le temps. On peut s'attendre à ce qu'une concentration moyenne pondérée par rapport au temps soit plus pertinente, même si la variation s'inscrit dans les limites de la fourchette de validité (voir paragraphe 24). Une moyenne pondérée par rapport au temps de la concentration dans l'eau peut être calculée en suivant les instructions donnée à l'annexe 5, section 1.

70. Il y a lieu de déterminer le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) en calculant le ratio k_1/k_2 , k_1 et k_2 étant les deux constantes cinétiques du premier ordre. Les constantes cinétiques k_1 et k_2 et le FBC_k peuvent être déduits en évaluant simultanément la phase d'absorption et la phase d'élimination. Une autre solution consiste à déterminer k_1 et k_2 l'un après l'autre (voir l'annexe 5 qui décrit et compare ces méthodes). La constante d'élimination (k_2) peut devoir être corrigée de l'effet de dilution par la croissance (voir paragraphes 72 et 73). Si la courbe d'absorption et/ou d'élimination n'obéit manifestement pas à une cinétique du premier ordre, il convient d'employer des modèles plus complexes (voir la bibliographie de l'annexe 5) et de demander conseil à un biostatisticien et/ou à un pharmacocinéticien.

Poids et longueur des poissons

71. Le poids frais et la longueur totale de chaque poisson, à chaque temps d'échantillonnage, sont présentés séparément pour les groupes d'essai et les groupes témoins pendant les phases d'absorption et d'élimination (y compris les poissons du stock au début de la période d'absorption).

Pour chaque poisson, le poids et la longueur sont reliés à la concentration chimique analysée, par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé. Le poids est la mesure du développement à privilégier afin de corriger le FBC cinétique de l'effet de dilution par la croissance. Le paragraphe 73 et l'annexe 5 présentent la méthode utilisée pour cette correction.

Correction de la dilution par la croissance et normalisation des lipides

72. Le développement des poissons pendant la phase d'élimination peut réduire les concentrations chimiques mesurées chez eux, ce qui augmente la constante cinétique d'élimination globale (k_2) par rapport à ce que provoqueraient les processus d'élimination seuls (par exemple respiration, métabolisme, égestion). Les facteurs de bioconcentration cinétique sont corrigés de la dilution par la croissance. Le FBC_{ES} est aussi influencé par la croissance, mais il n'existe aucune procédure de correction convenue en la matière. Dans les cas de croissance importante, le FBC_k corrigé de la croissance (FBC_{kg}) est aussi calculé car il peut s'avérer plus pertinent. La teneur en lipides des poissons d'essai (fortement associée à la bioaccumulation des produits chimiques hydrophobes) peut suffisamment varier dans la pratique pour qu'une normalisation rapportée à une teneur en lipides prédéfinie (5 % du poids frais) soit nécessaire pour obtenir des facteurs de bioconcentration cinétique et à l'état stationnaire qui aient un sens – sauf si l'on peut démontrer que la substance ne s'accumule pas prioritairement dans les lipides (par exemple certaines substances perfluorées peuvent se lier aux protéines). L'annexe 5 présente les équations et donne des exemples de calculs de ce type.

73. Pour corriger un FBC cinétique de la dilution par la croissance, il convient de corriger la constante cinétique d'élimination de la croissance. Cette constante cinétique d'élimination corrigée (k_{2g}) s'obtient en soustrayant la constante cinétique de croissance (k_g , déduite du poids mesuré) de la constante cinétique d'élimination globale (k_2). Le facteur de bioconcentration cinétique corrigé de la croissance se calcule alors en divisant la constante cinétique d'absorption (k_1) par la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (k_{2g}) (voir annexe 5). Dans certains cas, cette méthode est inadaptée. Par exemple, pour des substances s'éliminant très lentement testées chez des poissons à croissance rapide, la k_{2g} obtenue peut être très faible, aussi toute erreur commise dans les deux constantes cinétiques servant à la calculer est-elle cruciale, et dans certains cas la k_g estimée peut être supérieure à k_2 . Une autre méthode contournant la nécessité d'une correction de la dilution par la croissance consiste à utiliser le poids du produit chimique par poisson (entier) lors de l'élimination plutôt que le poids du produit chimique par unité de masse du poisson (concentration). Ce calcul est facile à faire, car dans le cadre d'essais respectant cette LD, on associe les concentrations tissulaires aux poids individuels des poissons. L'annexe 5 présente la procédure de calcul simple. Il convient de souligner que le recours à cette méthode alternative n'empêche pas qu'il faille consigner la valeur de k_2 .

74. Les facteurs de bioconcentration cinétique et à l'état stationnaire sont aussi être consignés, rapportés à une teneur en lipides par défaut de 5 % (du poids frais du poisson), sauf si l'on peut prouver que la substance d'essai ne s'accumule pas prioritairement dans les lipides. Les données relatives à la concentration dans le poisson, ou le FBC, sont normalisées en fonction du ratio entre ces 5 % et la teneur réelle moyenne en lipides d'un poisson (en pourcentage de son poids frais) (voir annexe 5).

75. Si l'analyse chimique et l'analyse lipidique ont été menées sur le même poisson, il convient d'utiliser ces données lipidiques individuelles normalisées pour calculer un FBC normalisé par rapport aux lipides. Autre possibilité, si la croissance des poissons est similaire dans les groupes exposés et les groupes témoins, on peut n'utiliser que la teneur en lipides des poissons témoins pour la correction en fonction des lipides (voir paragraphe 56). L'annexe 5 décrit une méthode de calcul du FBC normalisé par rapport aux lipides.

Interprétation des résultats

76. Les résultats sont interprétés avec prudence lorsque les valeurs mesurées de la concentration des solutions d'essai avoisinent le seuil de détection de la méthode d'analyse.

77. La croissance moyenne dans le groupe d'essai et celle dans le groupe témoin en principe ne diffèrent pas beaucoup afin d'exclure les effets toxiques. Les constantes cinétiques de croissance ou les courbes de croissance des deux groupes sont comparées au moyen d'une procédure adaptée¹⁷.

78. Des courbes d'absorption et d'élimination clairement définies attestent que les résultats concernant la bioconcentration sont de bonne qualité. S'agissant des constantes cinétiques, il convient que le test du χ^2 constate un bon ajustement du modèle de bioaccumulation [à savoir un faible pourcentage d'erreur dans les mesures (32)] pour que les constantes puissent être considérées comme fiables (voir annexe 5). Si on utilise plus d'une concentration d'essai, il convient que la variation des constantes d'élimination et d'absorption entre les concentrations d'essai soit inférieure à 20 %¹⁸. Sinon, la dépendance à la concentration peut être indiquée. L'observation de différences significatives entre les vitesses d'absorption ou d'élimination mesurées aux diverses concentrations d'essai est signalée et donne lieu à des explications possibles. En général, si l'étude a été bien conçue, le seuil de confiance du FBC à 95 % tourne autour de 20 % du FBC obtenu.

79. Si on teste deux concentrations ou plus, les chiffres obtenus à toutes ces concentrations servent à étudier la cohérence des résultats et à mettre en évidence une éventuelle dépendance à la concentration. Si une seule concentration est testée afin de réduire le nombre d'animaux et/ou les ressources utilisés, il y a lieu de justifier ce choix.

80. Le FBC calculé est incertain si le FBC_k est nettement supérieur au FBC_{ES} , car cela peut indiquer que l'état stationnaire n'a pas été atteint ou que la dilution par la croissance et les processus de pertes n'ont pas été pris en compte. Dans les cas où le FBC_{ES} est très supérieur au FBC_k , le calcul des constantes cinétiques d'absorption et d'élimination est vérifié. Une procédure de validation de l'ajustement différente peut améliorer l'estimation du FBC_k (voir annexe 5).

Rapport d'essai

81. Outre les informations sur la substance d'essai énumérées au paragraphe 3, le rapport d'essai comporte les renseignements suivants :

Substance d'essai

- État physique et, si nécessaire, propriétés physico-chimiques ;
 - identité chimique, par exemple nom CAS/UICPA, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés le cas échéant et si c'était faisable en pratique, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).
 - pour les substances multicomposants et UVCB (substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexe et matières biologiques) il y a

(17) On peut réaliser un test t sur les constantes cinétiques de croissance, pour tester si le développement entre les groupes témoins et d'essai varie, ou test F en cas d'analyse des écarts. Si besoin, on peut recourir à un test F ou à un essai fondé sur les rapports de probabilité pour faciliter le choix du modèle de croissance approprié [monographie OCDE n° 54 (32)].

(18) Ces pourcentages supposent la fiabilité des méthodes d'analyse et une demi-vie inférieure à 14 jours. Si les méthodes d'analyse sont moins fiables ou si la demi-vie est (très) supérieure, les chiffres seront plus élevés.

lieu de décrire avec autant de précision que possible l'identité chimique des différents composants, et d'indiquer pour chacun quel pourcentage de la masse totale de la substance il représente. Il convient d'expliquer succinctement pourquoi la méthode d'analyse utilisée permet de mesurer la concentration de la substance, et de décrire toutes les procédures d'analyse en indiquant notamment le degré de précision de la méthode, son seuil de détection et sa limite de quantification.

- en cas de marquage, position précise des atomes marqués et pourcentage de radioactivité lié aux impuretés.
- informations sur la toxicité de la substance d'essai pour le poisson (idéalement l'espèce testée). La toxicité est consignée sous forme de CL₅₀ aiguë (96 h) et de CSENO et CMENO tirées d'une étude chronique (essais réalisés soit aux premiers stades de la vie, soit tout au long du cycle de vie, si disponibles).
- conditions de stockage du produit ou de la substance chimique d'essai et, le cas échéant, stabilité du produit ou de la substance chimique d'essai dans les conditions de stockage antérieures.

Espèce testée

- Nom scientifique, souche, origine, pré-traitement éventuel, acclimatation, âge, sexe (s'il y a lieu), taille (poids et longueur), etc.

Conditions expérimentales

- Procédé d'essai suivi (par exemple, semi-statique ou dynamique) ; étude complète ou réduite (avec arguments de justification).
- Type et caractéristiques de l'illumination utilisée et photopériode(s).
- Schéma de l'essai (par exemple, nombre et dimension des enceintes d'essai, débit de remplacement de l'eau, taux de charge, nombre de replicats, nombre de poissons par replicat, nombre de concentrations différentes utilisées au cours de l'essai, longueur des phases d'absorption et d'élimination, fréquence de prélèvement des échantillons d'eau et de poissons).
- Méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (le solvant, sa concentration et sa contribution à la teneur en carbone organique de l'eau d'essai sont mentionnés, le cas échéant) ou description du système de dosage alternatif.
- Concentrations d'essai nominales, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les cuves d'essai, méthode de calcul de ces paramètres et données et fréquence à laquelle ils sont calculés.
- Source de l'eau de dilution, description du traitement préalable éventuel, résultats de la démonstration éventuelle de la capacité des poissons testés à vivre dans cette eau et caractéristiques de celle-ci : pH, dureté, température, concentration de l'oxygène dissous, teneurs en chlore résiduel (si elles ont été mesurées), carbone organique total, solides en suspension, salinité du milieu d'essai (si justifié) et toute autre mesure effectuée.

- Qualité de l'eau dans les récipients d'essai, pH, dureté, carbone organique total, température et concentration de l'oxygène dissous ; notamment méthodes utilisées et fréquence des mesures.
- Informations détaillées sur l'alimentation (par exemple, type d'aliment(s), source, composition – si possible, donner au moins les teneurs en lipides et en protéines), ration alimentaire choisie, quantité donnée et fréquence ;
- Informations sur le traitement des échantillons de poissons et d'eau, y compris les détails de la préparation, du stockage, de l'extraction et des procédés d'analyse (et leur précision) pour la substance d'essai et la teneur en lipides.
- Méthodes utilisées pour la randomisation des traitements et l'affectation des poissons aux récipients d'essai.
- Date d'introduction des organismes d'essai dans les solutions d'essai et durée de l'essai.
- Description des essais de détermination de l'ordre de grandeur et des résultats obtenus, s'il y a lieu.

Résultats

- Résultats de l'étude préliminaire éventuelle.
- Mortalité des poissons témoins et des poissons de chaque chambre d'exposition et comportements anormaux éventuels.
- Informations sur les effets nocifs observés.
- Description complète de tous les procédés d'analyse chimique utilisés, y compris les seuils de détection et de quantification, la variabilité et l'isolement.
- Teneur en lipides des poissons, y compris la méthode appliquée, et si déduit le facteur de normalisation des lipides (L_n , facteur pour exprimer les résultats relatifs à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 %).
- Tableau des poids (et longueurs), reliés aux concentrations chimiques (et à la teneur en lipides, s'il y a lieu) dans chaque poisson des groupes témoin et d'essai (par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé) et calculs pour les constante(s) cinétique(s) de croissance obtenues.
- Tableau des concentrations de la substance d'essai dans les poissons (C_p , pour chaque poisson) et dans l'eau (C_e) (avec les valeurs moyennes pour les groupes d'essai et témoin, écart-type et fourchette, s'il y a lieu) pour tous les temps de prélèvement (C_p exprimé en mg/kg de poids frais d'un poisson entier ou de tissus spécifiques, par exemple lipidiques, et C_e en mg/L). Valeurs de C_e des séries témoins (tous les éléments à l'appui sont également mentionnés).
- Courbes (incluant toutes les données mesurées), montrant (s'il y a lieu, les concentrations peuvent être exprimées pour l'animal entier ou des tissus spécifiques et la teneur en lipides être normalisée à 5 % de l'animal ou de tissus spécifiques) :

- le développement (soit le poids du poisson en fonction du temps) ou le poids transformé en logarithme naturel en fonction du temps (y compris la constante cinétique de croissance déduite, k_g) ;
 - l'absorption et l'élimination de la substance d'essai dans le poisson, (sur un graphique) ;
 - le délai d'établissement du régime stationnaire (si atteint) ;
 - la concentration transformée en logarithme naturel en fonction du temps d'absorption (y compris la constante cinétique d'élimination obtenue k_1) ;
 - la concentration transformée en logarithme naturel (ln concentration) en fonction du temps d'élimination (y compris la constante cinétique d'élimination obtenue k_2) ; et
 - les deux courbes des phases d'absorption et d'élimination, montrant les données et le modèle ajusté.
- Si aucun point aberrant manifeste n'est observé sur un tracé, on pourra appliquer le test du point aberrant statistiquement valide pour supprimer les points parasites et on justifiera dûment leur omission.
 - Facteur de bioconcentration à l'état stationnaire, (FBC_{ES}), si l'état stationnaire est (presque) atteint.
 - Facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) et constantes cinétiques d'absorption et d'élimination obtenues k_1 et k_2 , avec les écarts de k_2 (pente et ordonnée à l'origine) dans le cas d'un ajustement séquentiel.
 - Intervalle de confiance, écart-type (s'il est connu) et méthodes de traitement informatique/d'analyse des données pour chaque paramètre et chaque concentration de la substance d'essai.
 - Toute information concernant les métabolites de la substance chimique radiomarquée et leur accumulation.
 - Constante(s) cinétique(s) de croissance (y compris intervalle(s) de confiance de 95 %) et la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (k_{2g}), la demi-vie et le FBC (FBC_{kg}).
 - Toute anomalie concernant l'essai, tout écart à ces modes opératoires et toute autre information pertinente.
 - Un tableau synthétisant les données mesurées et calculées pertinentes, comme ci-après :

Constantes cinétiques d'absorption et d'élimination de la substance et facteurs de bioconcentration (FBC)	
k_g (constante cinétique de croissance ; jour ⁻¹) :	Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾
k_1 (constante cinétique globale ; l kg ⁻¹ jour ⁻¹) :	Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾
k_2 (constante cinétique d'élimination globale ; jour ⁻¹) :	Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾
k_{2g} (constante cinétique d'élimination globale corrigée de la croissance ; jour ⁻¹) :	Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾
C_p (concentration de la substance dans le poisson à l'état-stationnaire ; mg kg ⁻¹) :	Insérer la valeur \pm ET ⁽²⁾
C_e (concentration de la substance dans l'eau à l'état-stationnaire ; mg l ⁻¹) :	Insérer la valeur \pm ET ⁽²⁾
L_n (facteur de normalisation des lipides) :	Insérer la valeur ⁽³⁾
FBC_{ES} (FBC à l'état stationnaire ; l kg ⁻¹) :	Insérer la valeur \pm ET ⁽²⁾
FBC_{ESL} (FBC à l'état stationnaire normalisé des lipides ; l kg ⁻¹) :	Insérer la valeur ⁽³⁾ \pm ET ⁽²⁾
FBC_k (FBC cinétique ; l kg ⁻¹) :	Insérer la valeur (CI de 95 %) ⁽¹⁾
FBC_{kg} (FBC cinétique corrigé de la croissance ; l kg ⁻¹) :	Insérer la valeur (CI de 95 %) ⁽¹⁾
$t_{1/2g}$ (demi-vie corrigée de la croissance ; jour) :	Insérer la valeur (CI de 95 %) ⁽¹⁾
FBC_{kL} (FBC cinétique normalisé des lipides ; l kg ⁻¹) :	Insérer la valeur
FBC_{kLg} (FBC cinétique normalisé des lipides et corrigé de la croissance ; l kg ⁻¹) :	Insérer la valeur

(1) IC : intervalle de confiance (quand estimation possible)

(2) ET : écart-type (quand estimation possible)

82. Il faut éviter de consigner comme résultat « non détecté/quantifié au seuil de détection/quantification » lors de la mise au point de la méthode avant l'essai et à la conception de l'expérience, puisque ces résultats ne peuvent pas servir à calculer les constantes cinétiques.

305-II : Essai réduit d'exposition des poissons via le milieu aquatique

INTRODUCTION

83. L'expérience accumulée dans la conduite et l'interprétation de l'essai complet, que ce soit dans les laboratoires ou au sein des organes de réglementation, montre que – à quelques exceptions près – la cinétique du premier ordre s'applique pour estimer les constantes cinétiques d'absorption et d'élimination. Aussi l'estimation de ces constantes peut-elle se faire avec un minimum de temps d'échantillonnage, et permettre d'obtenir le FBC cinétique.

84. L'étude d'autres concepts pour analyser le FBC avait pour objectif premier la mise au point d'un petit essai à mettre en œuvre lors d'une étape intermédiaire afin de réfuter ou confirmer les estimations du FBC basées sur K_{oe} et sur les relations structure-activité quantitatives (RSAQ) et se passer ainsi de l'essai complet pour de nombreux produits chimiques. Il s'agissait aussi de réduire le coût de l'essai et le nombre d'animaux utilisés, en diminuant les prélèvements et les séquences analytiques. Tout en respectant le concept général de la précédente LD de l'OCDE pour permettre l'intégration des résultats de l'essai aux données existantes sur le FBC et pour améliorer ces résultats et l'interprétation des données, l'objectif était aussi de fournir des estimations du FBC suffisamment précises pour évaluer les risques et prendre les décisions pertinentes. De nombreuses considérations s'appliquent de la même façon que dans l'essai complet, par exemple les critères de validité (voir paragraphe 24) et l'arrêt d'un essai dans le cas où aucune absorption notable n'est observée à l'issue de la phase d'absorption (voir paragraphes 16 et 38).

85. Les substances pouvant se prêter à ce concept d'essai réduit relèvent du domaine général pour lequel cette LD a été développée, à savoir les substances organiques non polaires (voir paragraphe 49). S'il apparaît que la substance à l'étude se comporte différemment (net écart par rapport à la cinétique du premier ordre, par exemple), il convient, pour respecter la réglementation, de réaliser un essai complet.

86. En règle générale, l'essai réduit n'est pas réalisé sur une période plus courte que l'essai type concernant le FBC, mais comprend moins de prélèvements de poissons (voir annexe 6 pour l'explication). Néanmoins, la période d'élimination peut être raccourcie pour les produits chimiques à élimination rapide afin d'éviter que les concentrations dans le poisson ne tombent sous le seuil de détection/quantification avant la fin de l'essai. Un essai réduit d'exposition via le milieu aquatique avec une seule concentration, peut servir à déterminer s'il est nécessaire de mener un essai complet ; et si les données obtenues pour calculer les constantes cinétiques et le FBC sont fiables (voir paragraphe 93), on peut renoncer à l'essai complet à condition que le FBC obtenu soit loin des valeurs réglementaires critiques.

87. Dans certains cas, il peut être avantageux de pratiquer l'essai réduit avec plus d'une concentration d'essai, comme un essai préliminaire, pour déterminer si les estimations du FBC pour un produit chimique sont dépendantes de la concentration. Si les estimations du FBC tirées de l'essai réduit sont dépendantes de la concentration, un essai complet s'imposera. Si en revanche, à l'issue d'un essai réduit, les estimations du FBC sont indépendantes de la concentration mais que les résultats sont jugés définitifs, tout essai complet ultérieur pourra être réalisé avec une seule concentration, ce qui réduira le nombre d'animaux utilisés par rapport à un essai complet avec deux concentrations (ou plus).

88. Les produits chimiques pouvant se prêter à l'essai réduit:

- sont susceptibles de présenter des cinétiques d'absorption et d'élimination du premier ordre approximatives, obtenues par exemple par rapprochement avec des substances similaires ;
- présentent un $\log K_{oe} < 6$, à moins qu'un métabolisme rapide ne soit attendu¹⁹ ;
- sont suffisamment hydrosolubles pour la technique d'analyse utilisée (voir paragraphe 24) ;
- sont clairement quantifiables (les concentrations doivent être environ dix fois plus grandes que le seuil de quantification), dans les poissons et dans l'eau, un marquage radioactif étant recommandé (voir paragraphe 23) ; et
- il convient soit de prévoir une période d'élimination plus longue que la demi-vie prédite du produit chimique (voir annexe 5 pour les calculs), soit d'ajuster la durée d'élimination en conséquence (voir paragraphe 91). Une exception à cette règle est autorisée si un métabolisme rapide du produit chimique est attendu.

PROGRAMME DE PRÉLÈVEMENT POUR LES ESSAIS RÉALISÉS SUIVANT L'ESSAI RÉDUIT

Prélèvement des poissons

89. Le prélèvement des poissons est réduit à quatre temps d'échantillonnage :

- Au milieu et à la fin de la phase d'absorption (le dernier prélèvement marque le début de la phase d'élimination), soit par exemple après 14 et 28 jours (33).
- Au milieu de la phase d'élimination et à la fin de l'étude (quand la concentration du produit chimique est $< 10\%$ à la concentration maximale, ou une fois clairement passée au moins une demi-vie du produit chimique), soit par exemple après 7 et 14 jours d'élimination (33). Si une élimination rapide est attendue ou observée, il peut s'avérer nécessaire de raccourcir la période d'élimination afin d'éviter que les concentrations dans le poisson ne tombent sous le seuil de quantification.
- Mesure de la teneur en lipides comme dans l'essai complet.
- Correction de la croissance comme dans l'essai complet.

Le FBC est calculé comme un FBC cinétique.

Prélèvement de l'eau

90. Lors de l'essai réduit, l'eau est prélevée comme dans l'essai complet (voir paragraphe 54) ou au moins cinq fois à intervalles réguliers pendant la phase d'absorption et une fois par semaine pendant la phase d'élimination.

Modifications du concept

91. En fonction des propriétés de la substance d'essai, de la validité des prédictions des RSAQ et de l'objet spécifique de l'étude, il peut être envisageable de modifier le concept de l'essai :

- Si une précision accrue est nécessaire, il est possible d'utiliser plus de poissons (6 ou 8 au lieu de 4) lors du prélèvement réalisé à la fin de la phase d'absorption.

(19) L'essai réduit peut en effet servir à démontrer un métabolisme rapide attendu comme tel.

- On inclura un groupe supplémentaire de poissons si après 14 jours (ou à l'issue de la durée prévue de la phase d'élimination) l'élimination n'est pas suffisante (> 50 %). Si la durée prévue de la phase d'élimination est inférieure ou supérieure à 14 jours, il convient d'adapter le programme de prélèvement (un groupe de poissons à l'issue prévue de la phase d'élimination, et un groupe à la moitié de cette phase).
- On utilisera deux concentrations d'essai pour étudier une possible dépendance de la concentration. Si les résultats de l'essai réduit, mené avec deux concentrations d'exposition, montrent que le FBC est indépendant de la concentration (différence inférieure à 20 %), on pourra estimer qu'une concentration d'exposition suffira en cas d'éventuel essai complet.
- Les modèles de processus de bioaccumulation tels que ceux proposés par Arnot *et al.* (35) peuvent probablement aider à prévoir la durée des phases d'absorption et d'élimination (voir aussi l'annexe 5).

Calculs

92. Les raisons de cette approche tiennent du fait que le facteur de bioconcentration dans un essai complet peut être déterminé comme un facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES}) en calculant le rapport de la concentration de la substance d'essai dans les tissus du poisson à la concentration de la substance d'essai dans l'eau, ou en calculant le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k), à savoir le rapport de la constante cinétique d'absorption k_1 à la constante cinétique d'élimination k_2 . Le FBC_k est valide même si une concentration à l'état stationnaire d'une substance chimique n'est pas atteinte durant l'absorption, à condition qu'absorption et élimination soient régies pour l'essentiel par des processus cinétiques de premier ordre. Au minimum, deux points sont nécessaires pour estimer les constantes cinétiques d'absorption et d'élimination, l'un à la fin de la phase d'absorption (soit au début de la phase d'élimination) et l'autre à la fin de la phase d'élimination (ou une fois la phase d'élimination bien avancée). Le temps d'échantillonnage intermédiaire est recommandé pour contrôler les cinétiques d'absorption et d'élimination²⁰. (Pour les calculs, voir annexes 5 et 6.)

Interprétation des résultats

93. Pour évaluer la validité et la valeur informative de l'essai, il convient de vérifier que la période d'élimination est supérieure à une demi-vie. De même, on compare le FBC_{km} (FBC cinétique obtenu à partir d'un essai réduit) à la valeur du FBC_{ES} minimisé (qui correspond au FBC_{ES} calculé à la fin de la phase d'absorption, en supposant que l'état stationnaire a été atteint, ce qu'on ne peut que supposer, puisque le nombre de temps d'échantillonnage ne suffit pas à le prouver). Si $FBC_{km} < FBC_{ES}$ minimisé, le FBC_{ES} minimisé sera la valeur à privilégier. Si le FBC_{km} est inférieur à 70 % du FBC_{ES} minimisé, les résultats ne sont pas valides, et un essai complet s'impose.

94. Si l'essai réduit donne un FBC_{km} avoisinant une valeur réglementaire critique, il faudra mener un essai complet. Si le résultat est loin de toute valeur réglementaire critique (nettement au-dessus ou en-dessous), un essai complet n'est pas forcément nécessaire, ou l'on pourra réaliser un essai complet avec une seule concentration si le cadre réglementaire l'exige.

95. S'il apparaît à l'issue d'un essai réduit impliquant une seule concentration qu'un essai complet est nécessaire, ce dernier pourra être mené avec une seconde concentration. Si les résultats correspondent, on pourra se passer d'un essai complet avec une concentration différente, puisque la bioconcentration de la substance n'est apparemment pas dépendante de la concentration. Si l'essai

(20) Si seulement deux points sont mesurés, on pourra estimer le seuil de confiance du FBC_{km} selon les méthodes « bootstrap ». Lorsque des points intermédiaires sont également disponibles, le seuil de confiance du FBC_{km} peut être calculé comme dans l'essai complet.

réduit a été mené avec deux concentrations et que les résultats ne montrent aucune dépendance de la concentration, on pourra réaliser l'essai complet avec une seule concentration (voir paragraphe 87).

Rapport d'essai

96. Le rapport de l'essai réduit inclut toutes les informations exigées pour l'essai complet (voir paragraphe 81), à l'exception de celles qu'il n'est pas possible d'obtenir (à savoir la courbe montrant la durée avant l'établissement de l'état stationnaire et le facteur de bioconcentration à l'état stationnaire ; à la place de ce dernier, il faudra indiquer le FBC_{ES} minimisé). Il conviendra aussi de préciser les raisons pour lesquelles il a été décidé de mener un essai réduit, et d'indiquer le FBC_{km} obtenu.

305-III : Essai de bioaccumulation chez le poisson avec exposition via la voie alimentaire

INTRODUCTION

97. La méthode décrite dans cette section s'applique pour les substances ne se prêtant pas à un essai par exposition via le milieu aquatique (par exemple parce qu'il n'est pas possible de maintenir des concentrations stables et mesurables dans l'eau ou d'obtenir des charges corporelles adéquates en 60 jours d'exposition ; voir les sections précédentes pour la méthode d'exposition en milieu aquatique). Il convient néanmoins de noter que cet essai donnera au final un facteur de bioamplification alimentaire (FBA) et non un facteur de bioconcentration (FBC)²¹.

98. En mai 2001, une nouvelle méthode pour les essais de bioaccumulation de substances organiques peu solubles dans l'eau a été présentée lors de la conférence de SETAC Europe, organisée à Madrid (36). Ce travail s'appuie sur différentes études de bioaccumulation rapportées dans la littérature, utilisant une méthode de dosage avec une alimentation enrichie [voir par exemple (37)]. Début 2004, un projet de protocole (38), destiné à mesurer le potentiel de bioaccumulation des substances organiques peu hydrosolubles pour lesquelles la méthode de bioconcentration par exposition via le milieu aquatique ne convenait pas, a été soumis, avec un document de référence (39), au groupe de travail PBT de l'UE. Parmi les justifications avancées pour appliquer cette méthode, il a été indiqué que l'exposition potentielle de l'environnement à ces substances peu solubles ($\log K_{oc} > 5$) est sans doute largement liée à la voie alimentaire [voir (40) (41) (42) (43) (44)]. Aussi les essais avec exposition par voie alimentaire sont-ils mentionnés dans certains règlements relatifs aux produits chimiques²². Il convient toutefois de noter que la méthode décrite dans la LD évite soigneusement toute exposition via le milieu aquatique. En conséquence, un FBA obtenu à partir de cette méthode d'essai n'est pas directement comparable à un FBA obtenu avec une étude sur le terrain (qui permet de combiner exposition via le milieu aquatique et par voie alimentaire).

99. Cette section qui s'appuie sur le protocole (38) présente une nouvelle méthode qui ne figurait pas dans la version précédente de la LD 305 de l'OCDE (adoptée le 14 juin 1996). Avec cet essai de remplacement, il est possible d'étudier directement l'exposition par voie alimentaire dans des conditions de laboratoire bien définies.

100. Avant de procéder à cette étude, il est indispensable de se reporter aux paragraphes 1 à 14 de la présente LD afin de comprendre les circonstances dans lesquelles l'essai avec exposition par voie alimentaire est préféré à l'essai par exposition via le milieu aquatique. Ces paragraphes apportent aussi des informations sur les substances, et il convient d'en prendre connaissance avant de réaliser un essai.

101. Le marquage radioactif des substances d'essai peut être envisagé pour les mêmes raisons qu'avec la méthode d'exposition via le milieu aquatique (voir paragraphes 6 et 65).

102. La méthode d'exposition par voie alimentaire peut servir à analyser plusieurs substances lors d'un seul essai, à condition que certains critères soient remplis ; ces critères sont détaillés au paragraphe 112. Par souci de simplicité, la méthode décrit ici un essai pratiqué avec une seule substance d'essai.

(21) Voir définitions et unités à l'annexe 1.

(22) Par exemple dans le règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil (dit « REACH ») et le « Guide des exigences d'information et évaluation de la sécurité chimique » qui lui est associé, chapitre R.7c, R.7.10.3.1, p. 13 ; R.7.10.4.1, pp. 31-32 ; et figure R7.10-2, p. 50.

103. L'essai avec exposition par voie alimentaire est similaire à l'essai par exposition via le milieu aquatique à de nombreux égards, à l'exception manifeste du mode d'exposition. Aussi la méthode présentée ici recoupe-t-elle en de nombreux points la méthode d'exposition en milieu aquatique décrite à la section précédente. Dans la mesure du possible, il est fait référence aux paragraphes de la section précédente concernés, mais pour des raisons de lisibilité et de compréhension certaines répétitions n'ont pu être évitées.

PRINCIPE DE L'ESSAI

104. On peut appliquer des conditions d'essai dynamiques ou semi-statiques (voir paragraphe 4) ; il est recommandé de préférer les essais dynamiques pour limiter l'exposition potentielle à la substance d'essai via le milieu aquatique suite à une désorption de l'alimentation enrichie ou des excréments. L'essai comprend deux phases : l'absorption (substance d'essai-aliments enrichis) et l'élimination (aliments « propres », non traités) (voir paragraphe 16). Durant la phase d'absorption, on donne, tous les jours, à un groupe de poissons des aliments du commerce spécifiquement pour poisson et dont la composition est connue, enrichis de la substance d'essai. Idéalement, les poissons consomment toute la nourriture proposée (voir paragraphe 141). Durant la phase d'élimination, on leur donne cette même nourriture du commerce, mais pure, non traitée. Avec la méthode d'exposition via le milieu aquatique, il est possible, si nécessaire, d'utiliser plus d'un groupe en variant la concentration de la substance d'essai, mais pour la majorité des substances organiques très hydrophobes un groupe d'essai suffit (voir paragraphes 49 et 107). Dans des conditions semi-statiques, le poisson est transféré dans un nouveau milieu et/ou une nouvelle chambre d'essai à la fin de la phase d'absorption (au cas où le milieu ou l'appareillage utilisé pendant la phase d'absorption aurait été contaminé par la substance d'essai par lixiviation). Les concentrations de la substance d'essai dans le poisson sont mesurées lors des deux phases de l'essai. En plus du groupe de poissons nourris avec une alimentation enrichie (le groupe d'essai), un groupe de poissons témoin est maintenu dans des conditions identiques et nourri de la même façon, mais son alimentation n'est pas enrichie avec la substance d'essai. Ce groupe témoin permet de quantifier la concentration de la substance d'essai dans les poissons non exposés et sert de point de comparaison lorsque l'on observe chez le ou les groupes d'essai des effets nocifs liés au traitement²³. Cela permet aussi de comparer les constantes cinétiques de croissance entre les groupes pour contrôler que la nourriture proposée a été consommée dans les mêmes quantités (il convient aussi de tenir compte des qualités organoleptiques potentiellement différentes de l'alimentation pour expliquer la différence entre les constantes cinétiques de croissance ; voir paragraphe 138). Il est important que pendant les phases d'absorption et d'élimination, les groupes d'essai et témoin reçoivent une alimentation équivalente.

105. Une phase d'absorption qui dure entre 7 et 14 jours est généralement suffisante, à en juger par l'expérience des équipes ayant mis au point ces méthodes d'essai (38) (39). Cette durée devrait permettre de minimiser le coût de l'essai tout en garantissant une exposition suffisante pour la plupart des substances. Toutefois, il peut être préférable dans certains cas de prolonger la phase d'absorption (voir paragraphe 127). Durant cette phase d'absorption, la concentration de la substance dans les poissons peut ne pas atteindre l'état stationnaire si bien que le traitement des données et les résultats issus de cette méthode s'appuient en général sur une analyse cinétique des résidus présents dans les tissus. (Note : on peut appliquer ici les équations servant à estimer la durée nécessaire à l'établissement de l'état stationnaire comme lors de l'essai par exposition en milieu aquatique – voir annexe 5). La phase d'élimination commence au moment où l'on nourrit les poissons avec une alimentation non enrichie ; elle dure habituellement jusqu'à 28 jours ou, si cela prend moins de temps, jusqu'à ce que la substance d'essai ne soit plus quantifiable dans le poisson (entier). La phase d'élimination peut être raccourcie ou prolongée au-delà de 28 jours, selon les variations dans le temps des concentrations mesurées et de la taille des poissons.

23 Pour la plupart des substances d'essai, on ne devrait idéalement rien détecter dans l'eau témoin. Les concentrations naturelles s'expliquent uniquement par la présence logique de matériaux (certains métaux par exemple) et substances omniprésents dans le milieu.

106. Cette méthode permet de déterminer la demi-vie spécifique à la substance ($t_{1/2}$, d'après la constante cinétique d'élimination, k_2), le rendement d'assimilation (absorption par voie intestinale ; α), le facteur de bioamplification alimentaire cinétique (FBA_k), le facteur de bioamplification alimentaire cinétique corrigé de la croissance (FBA_{kg}) et le facteur de bioamplification alimentaire cinétique corrigé de la teneur en lipides²⁴ (FBA_{kL}) (et/ou le facteur de bioamplification alimentaire cinétique corrigé de la croissance et des lipides, FBA_{kgL}) pour la substance d'essai dans le poisson. S'agissant de la méthode d'exposition en milieu aquatique, la prise de poids des poissons durant l'essai provoquera chez eux une dilution de la substance d'essai. Le FBA (cinétique) sera donc sous-estimé s'il n'est pas corrigé en conséquence (voir paragraphes 162 et 163). En outre, si on estime que l'état stationnaire a été atteint en phase d'absorption il est possible de calculer un FBA à l'état stationnaire indicatif. Plusieurs méthodes permettent d'estimer un facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) à partir des données obtenues dans l'étude par voie alimentaire [par exemple (44) (45) (46) (47) (48)]. Les pour et les contre de ces approches sont analysés à l'annexe 8.

107. L'essai a été conçu en premier lieu pour les substances organiques non polaires peu hydrosolubles qui sont régies chez les poissons, pour l'essentiel, par des cinétiques d'absorption et d'élimination du premier ordre. Quand la substance testée n'est pas régie par des cinétiques d'absorption et d'élimination du premier ordre, il convient d'employer des modèles plus complexes (voir la bibliographie de l'annexe 5) et de demander conseil à un biostatisticien et/ou pharmacocinéticien.

108. Normalement, on détermine le FBA en utilisant l'analyse de la substance d'essai pour tout le poisson (poids frais). Si cela est pertinent au regard des objectifs de l'étude, il est possible de prélever des tissus déterminés (par exemple les muscles, le foie) si le poisson est divisé en fractions comestibles et non comestibles (voir paragraphe 21). Par ailleurs, le prélèvement et l'analyse distincte du tractus gastro-intestinal peuvent aider à déterminer la contribution aux concentrations dans l'ensemble du poisson à différents temps d'échantillonnage, à la fin de la phase d'absorption et vers le début de la phase d'élimination, ou dans le cadre d'une approche fondée sur le bilan massique.

109. La teneur en lipides des poissons (entiers) prélevés est mesurée pour que les concentrations puissent être corrigées en fonction de la teneur en lipides dans l'alimentation et dans le poisson (voir paragraphes 56 et 57, et annexe 7).

110. Chaque poisson prélevé est pesé, et ce poids est consigné (par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé) et relié à la concentration chimique analysée par individu, afin de calculer le développement du poisson en cours d'essai. Dans la mesure du possible, il convient aussi de mesurer la longueur totale du poisson²⁵. Les données sur le poids sont aussi nécessaires pour estimer le FBC à partir des données relatives à la phase d'élimination durant l'essai avec exposition par voie alimentaire.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

111. Il convient de disposer des informations sur la substance d'essai décrites aux paragraphes 3 et 22. Une méthode permettant d'analyser les concentrations de la substance d'essai dans l'eau n'est

(24) Le FBA étant défini comme le rapport entre la concentration d'une substance dans un organisme et la concentration de la substance dans l'alimentation de cet organisme à l'état stationnaire, les lipides sont pris en compte dans la mesure où l'on corrige les valeurs obtenues en fonction des lipides présents dans l'organisme et dans l'alimentation, d'où le terme plus précis de « correction ». Cette approche diffère de la « normalisation » par rapport à une teneur en lipides donnée dans l'organisme comme cela est fait pour l'essai de bioconcentration par exposition en milieu aquatique.

(25) La longueur totale est aussi être consignée durant l'essai, puisqu'elle constitue un bon indicateur des éventuels effets nocifs observés.

habituellement pas nécessaire ; il convient que les méthodes à appliquer présentent une sensibilité appropriée pour mesurer les concentrations dans l'alimentation et dans les tissus du poisson.

112. La méthode utilisée peut servir à tester plus d'une substance lors d'un même essai. Cependant, il convient que les substances d'essai soient compatibles entre elles : elles ne doivent ni interagir ni changer d'identité chimique une fois ajoutées à l'alimentation du poisson. L'objectif est que les résultats mesurés pour chaque substance lors d'essais groupés ne diffèrent pas ou à peine des résultats qui auraient été obtenus avec des essais individuels. Il convient qu'une analyse préliminaire établisse que chaque substance peut être isolée à partir d'un échantillon de poisson ou de nourriture enrichi de plusieurs substances, avec i) des isollements élevés (par exemple > 85 % à la valeur nominale) et ii) la sensibilité nécessaire au bon déroulement de l'essai. Il convient que la dose totale des substances testées simultanément soit inférieure à la concentration combinée susceptible d'entraîner des effets toxiques (voir paragraphe 51). De plus, il convient que le schéma expérimental prenne en compte les éventuels effets nocifs chez le poisson et les interactions possibles (effets métaboliques) associés à l'essai simultané de plusieurs substances. Il convient d'éviter de tester simultanément des substances ionisables. En termes d'exposition, la méthode se prête aussi à des mélanges complexes (voir paragraphe 13, bien que les limites de l'analyse seront les mêmes qu'avec une autre méthode).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

113. La validité de l'essai est subordonnée à la réalisation des conditions suivantes (voir paragraphe 24) :

- la variation de la température de l'eau est inférieure à ± 2 °C dans les groupes témoins et dans les groupes traités ;
- la concentration de l'oxygène dissous reste supérieure ou égale à 60 % de la valeur de saturation de l'air ;
- la concentration de la substance d'essai dans l'alimentation des poissons avant et à la fin de la phase d'absorption est comprise dans un intervalle de ± 20 % (sur la base d'au moins trois prélèvements réalisés à ces deux moments) ;
- la grande homogénéité de la substance dans l'alimentation est démontrée lors d'une analyse préliminaire de l'alimentation enrichie ; au moins trois concentrations de la substance mesurées sur des échantillons prélevés au début de l'essai ne varient pas de ± 15 % de la moyenne ;
- aucune concentration de la substance d'essai n'est détectée, ou uniquement à l'état de traces habituelles, dans l'alimentation non enrichie ou dans les tissus du poisson témoin ;
- la mortalité, les maladies ou d'autres effets nocifs chez les groupes de poissons témoins et testés sont inférieurs ou égaux à 10 % à la fin de l'essai ; si l'essai est prolongé pour quelque raison que ce soit, les effets nocifs dans les deux groupes sont inférieurs ou égaux à 5 % par mois, et à 30 % en tout. Des différences significatives de croissance moyenne entre les échantillons du groupe d'essai et du groupe témoin pourraient indiquer un effet toxique de la substance d'essai.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

114. Si un laboratoire n'a pas procédé à cet essai auparavant ou s'il a procédé à des modifications substantielles (changement de souche ou de fournisseur de poissons, espèce de poisson différente, changement notable de la taille ou de l'alimentation des poissons, ou de la méthode d'enrichissement,

etc.), il est conseillé d'éprouver les compétences techniques disponibles, en utilisant une substance de référence. La substance de référence est principalement utilisée pour établir si la technique d'enrichissement de l'alimentation permet de garantir une homogénéité et une biodisponibilité maximales des substances d'essai. Par exemple, la substance de référence utilisée pour les substances hydrophobes non polaires est l'hexachlorobenzène (HCB), mais en raison des propriétés dangereuses du HCB²⁶ il convient de considérer d'autres substances pour lesquelles les données d'absorption et de bioamplification sont fiables. Le cas échéant, les informations générales sur la substance de référence devront figurées dans le rapport d'essai, en particulier le nom, la pureté, le numéro du CAS, la structure, la toxicité (si disponible) comme pour les substances d'essai (voir paragraphes 3 et 22).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

115. Le matériel et l'appareillage sont utilisés comme décrit pour l'essai par exposition en milieu aquatique (voir paragraphe 26). Il convient d'utiliser un système de renouvellement dynamique ou statique qui fournisse un volume d'eau de dilution suffisant aux bassins d'essai. Il convient aussi de consigner les débits.

Eau

116. L'eau de l'essai est utilisée comme décrit pour l'essai par exposition en milieu aquatique (voir paragraphes 27 à 29). Il convient que le milieu d'essai présente les caractéristiques requises et que sa qualité reste constante pendant toute la durée de l'essai. La teneur naturelle en particules et en carbone organique total est aussi basse que possible (≤ 5 mg/L pour les matières particulaires ; ≤ 2 mg/L pour le carbone organique total) avant le début de l'essai. Le carbone organique total est mesuré uniquement avant l'essai au moment de la caractérisation de l'eau de l'essai (voir paragraphe 53).

Alimentation

117. Il est recommandé d'utiliser une nourriture pour poisson disponible dans le commerce (granulés flottant et/ou coulant lentement), caractérisée en termes au moins de protéines et riche en matières grasses. Il convient que les granulés présentent une taille uniforme pour accroître l'efficacité de l'exposition par voie alimentaire ; de cette façon, les poissons mangeront plus, puisqu'ils ne se contenteront pas de manger les plus gros morceaux, délaissant les plus petits. Il convient aussi que la taille des granulés soit appropriée à la taille des poissons au début de l'essai (diamètre avoisinant 0.6 à 0.85 mm pour les poissons d'une longueur totale comprise entre 3 et 7 cm, et 0.85 à 1.2 mm pour les poissons d'une longueur totale comprise en 6 et 12 cm). On peut ajuster la taille des granulés en fonction du développement des poissons au début de la phase d'élimination. L'annexe 7 donne un exemple d'une nourriture du commerce adaptée. L'alimentation utilisée pour mettre au point cette méthode totalisait en général une teneur en lipides comprise en 15 et 20 % (du poids frais). Il est possible que des aliments pour poisson présentant une teneur en lipides aussi élevée ne soient pas disponibles dans certaines régions. Le cas échéant, l'essai pourrait être réalisé avec une teneur en lipides plus faible et, si nécessaire, d'ajuster la ration alimentaire pour maintenir les poissons en bonne santé (en fonction de l'essai préliminaire). La teneur totale en lipides de l'alimentation du groupe d'essai et du groupe témoin est mesurée et consignée avant le début de l'essai et à la fin de la phase d'absorption. Le rapport d'essai précise les détails fournis par le fabricant des aliments pour poisson dans l'analyse des nutriments, de la teneur en eau, des fibres et de la teneur en cendres, et si possible des minéraux et des résidus de pesticides (polluants prioritaires standard par exemple).

(26) Le HCB figure dans les listes des annexes A et C à la Convention de Stockholm.

118. Au moment d'enrichir l'alimentation avec la substance d'essai, il convient de veiller autant que possible à l'homogénéité des aliments utilisés pendant l'essai. La concentration de la substance d'essai dans la nourriture du groupe testé est sélectionnée en fonction de la sensibilité de la technique d'analyse, de la toxicité de la substance d'essai (CSEO si connue) et des données physico-chimiques pertinentes. Le cas échéant, il est préférable d'incorporer la substance de référence suivant une concentration d'environ 10 % de celle de la substance d'essai (ou en tout cas aussi faible que possible), en fonction de la sensibilité de l'analyse (par exemple pour l'hexachlorobenzène, une concentration dans la nourriture de 1 à 100 µg/g est jugée acceptable ; voir (47) pour plus d'informations sur les rendements d'assimilation du HCB).

119. La substance d'essai peut être ajoutée à la nourriture pour poisson de différentes manières, selon ses caractéristiques physiques et sa solubilité (voir annexe 7 pour plus de détails sur les méthodes d'enrichissement) :

- si la substance est soluble et stable en triglycérides, dissoudre le produit chimique dans une petite quantité d'huile de poisson ou d'huile végétale comestible avant de le mélanger à la nourriture pour poisson. Dans ce cas de figure, il convient d'éviter soigneusement de produire une ration trop riche en lipides, en tenant compte de la teneur naturelle en lipides des aliments enrichis et donc en ajoutant la quantité d'huile minimum connue requise pour une répartition homogène de la substance d'essai dans la nourriture, ou ;
- enrichir la nourriture avec un solvant organique adapté tant que l'homogénéité et la biodisponibilité ne sont pas compromises [de (micro-)cristaux de la substance d'essai peuvent se former dans les aliments suite à l'évaporation du solvant, sachant qu'il est difficile de prouver que cette évaporation n'a pas eu lieu ; voir (49)], ou ;
- ajouter des liquides non visqueux directement à la nourriture pour poisson mais en les mélangeant bien pour assurer une répartition homogène et faciliter leur assimilation. Il convient que la technique de mélange garantisse l'homogénéité des aliments enrichis.

Dans certains cas, par exemple avec des substances d'essai moins hydrophobes plus susceptibles de se désorber des aliments, il peut être nécessaire d'enduire les granulés d'une petite quantité d'huile de poisson/germes de maïs (voir paragraphe 142). Il convient alors de traiter la nourriture témoin de même et de mesurer la teneur en lipides de la nourriture finale ainsi préparée.

120. Le cas échéant, les résultats concernant la substance de référence sont comparables aux données des analyses décrites dans la littérature et menées dans des conditions similaires avec une ration alimentaire comparable (voir paragraphe 45), et les paramètres spécifiques à la substance de référence correspondent aux critères pertinents énoncés au paragraphe 113 (3^e, 4^e et 5^e points).

121. Si une huile ou un solvant est utilisé comme véhicule pour la substance d'essai, on mélange une quantité équivalente de ce véhicule (en excluant la substance d'essai) à la nourriture témoin de façon à maintenir l'équivalence avec les aliments enrichis. Il est important que pendant les phases d'absorption et d'élimination, les groupes d'essai et témoin reçoivent une alimentation équivalente.

122. La nourriture enrichie est stockée dans des conditions qui maintiennent la stabilité de la substance d'essai au sein du mélange (par réfrigération par exemple) et ces conditions sont consignées.

Sélection des espèces de poissons

123. Cet essai peut être réalisé avec les espèces de poissons indiquées pour l'exposition en milieu aquatique (voir paragraphe 32 et annexe 3). Avant la publication de la présente LD, les études de bioaccumulation par la nourriture menées avec des substances organiques utilisaient habituellement la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), la carpe (*Cyprinus carpio*) et la tête-de-boule (*Pimephales promelas*). Il convient que les espèces testées aient un comportement alimentaire tel que la ration

administrée est consommée rapidement pour limiter au maximum l'influence potentielle d'un facteur quel qu'il soit sur la concentration de la substance d'essai dans l'alimentation (par exemple, lixiviation dans l'eau et exposition possible en milieu aquatique). La longueur et le poids des poissons utilisés sont compris dans les limites recommandées (voir annexe 3). Les poissons ne doivent pas être trop petits, ce qui gênerait les analyses par individu. Tester des espèces à une période où elles se développent rapidement peut compliquer l'interprétation des données, des taux de croissance élevés pouvant influencer sur le calcul du rendement d'assimilation²⁷.

Conditions de vie des poissons en laboratoire

124. Les critères relatifs à l'acclimatation, à la mortalité et à d'éventuelles maladies sont les mêmes pour la méthode d'exposition en milieu aquatique (voir paragraphes 33 à 35).

DÉROULEMENT DE L'ESSAI

Étude préliminaire et essai de détermination de l'ordre de grandeur

125. Une analyse préliminaire est nécessaire pour démontrer la possibilité d'isoler la substance de la nourriture enrichie ou des tissus du poisson. Il n'est pas toujours nécessaire de réaliser un essai de détermination de l'ordre de grandeur pour décider de la concentration appropriée du produit chimique. Afin de montrer qu'aucun effet nocif n'est observé, d'évaluer les qualités organoleptiques de l'alimentation enrichie, de déterminer la sensibilité de la méthode d'analyse des tissus du poisson et des aliments, et de définir la ration alimentaire et les temps d'échantillonnage appropriés durant la phase d'élimination, etc., on peut procéder à des essais d'alimentation préliminaires, mais ce n'est pas obligatoire. Une étude préliminaire peut être utile pour estimer le nombre de poissons nécessaires aux prélèvements durant la phase d'élimination. Elle peut permettre de réduire notablement le nombre de poissons utilisés, surtout pour les substances d'essai très sensibles au métabolisme.

Conditions d'exposition

Durée de la phase d'absorption

126. Une phase d'absorption de 7 à 14 jours est habituellement suffisante ; durant cette phase, un groupe de poissons reçoit la nourriture témoin et un autre groupe la nourriture testée. La ration alimentaire qui leur est administrée chaque jour dépend de l'espèce testée et des conditions de l'essai ; elle représentera par exemple entre 1 et 2 % du poids du poisson (poids frais) dans le cas de la truite. Cette ration devra être définie de façon à éviter un développement rapide et une augmentation importante de la teneur en lipides. Si besoin, il est possible de prolonger la phase d'absorption en fonction des enseignements tirés d'études antérieures ou des informations connues sur l'absorption ou l'élimination de la substance d'essai (ou analogue) chez le poisson. L'essai proprement dit commence avec la première administration de la nourriture enrichie. Un jour d'essai commence avec l'administration des aliments et se termine peu avant la ration suivante (par exemple une heure avant). Ainsi, en phase d'absorption, le premier jour de l'essai commence avec la première administration de la nourriture enrichie et se termine juste avant la deuxième ration enrichie. En pratique, la phase d'absorption prend fin juste avant (par exemple une heure avant) la première administration de la nourriture non enrichie avec la substance d'essai, sachant que le poisson continue à digérer les aliments enrichis et à absorber la substance d'essai au cours des 24 heures intermédiaires. Il est important de s'assurer que la charge corporelle de la substance d'essai est suffisamment élevée (non-toxique) au regard de la méthode d'analyse appliquée pour pouvoir mesurer une baisse d'au moins une puissance dix durant la phase d'élimination. Dans certains cas, on peut prolonger la phase d'absorption (jusqu'à 28 jours) en réalisant des prélèvements supplémentaires afin d'avoir une idée des cinétiques

(27) En cas de développement rapide durant la phase d'absorption, la ration alimentaire réelle descendra en-dessous de celle définie au début de l'exposition.

d'absorption. Pendant l'absorption, la concentration dans le poisson peut ne pas atteindre l'état stationnaire. Pour estimer le temps nécessaire avant atteinte de l'état stationnaire, et avoir ainsi une indication de la durée probable nécessaire avant atteinte de concentrations appréciables dans le poisson, il est possible d'appliquer les équations indiquées pour l'essai par exposition en milieu aquatique (voir annexe 5).

127. Il arrive que l'on sache à l'avance qu'une durée d'absorption de 7 à 14 jours de la substance chimique dans le poisson ne suffira pas pour que la concentration utilisée dans l'alimentation permette d'atteindre une concentration dans le poisson suffisamment élevée pour analyser une baisse d'au moins une puissance dix durant l'élimination, en raison soit d'une faible sensibilité de la méthode d'analyse soit d'un rendement d'assimilation trop bas. Le cas échéant, il peut être utile d'étendre la phase initiale d'alimentation à plus de 14 jours, ou, surtout s'agissant de substances très métabolisables, d'envisager une concentration dans l'alimentation supérieure. Il convient toutefois de veiller à maintenir la charge corporelle durant l'absorption en-dessous de la concentration sans effet observé (CSEO) chronique (estimée) dans les tissus du poisson (voir paragraphe 138).

Durée de la phase d'élimination

128. En règle générale, l'élimination dure jusqu'à 28 jours ; elle commence dès que l'on donne aux poissons du groupe d'essai une nourriture pure, non traitée, après la phase d'absorption. L'élimination commence avec l'administration de la première ration non enrichie, et non juste après l'administration de la dernière ration enrichie, puisque le poisson continue à digérer les aliments et à absorber la substance d'essai au cours des 24 heures intermédiaires, comme indiqué au paragraphe 126. C'est pourquoi le premier prélèvement de la phase d'élimination est réalisé juste avant la deuxième ration non enrichie. Cette période d'élimination vise à capturer les substances d'une demi-vie potentielle de 14 jours, ce qui correspond aux caractéristiques des substances bioaccumulables²⁸ ; un essai d'une durée de 28 jours couvre donc deux demi-vies de ces substances. Avec les substances fortement bioaccumulables, il peut être utile de prolonger la phase d'élimination (si indiqué par l'essai préliminaire).

129. Si une substance est éliminée très lentement au point qu'on ne peut pas atteindre une demi-vie exacte durant la phase d'élimination, les informations obtenues peuvent néanmoins suffire à indiquer un niveau élevé de bioaccumulation et permettre de réaliser les évaluations. À l'inverse, si une substance est éliminée très rapidement au point qu'on ne peut déduire ni aucune concentration fiable au temps 0 (concentration à la fin de l'absorption ou au début de l'élimination, $C_{0,d}$) ni k_2 , on procèdera à une estimation basse de k_2 (voir annexe 7).

130. Si les premières analyses des poissons prélevés (à 7 ou 14 jours par exemple) montrent que le produit chimique a été éliminé en-dessous des niveaux prévus avant la fin de la période complète de 28 jours, on peut annuler les prélèvements suivants et arrêter l'essai.

131. Dans certains cas, on ne constate aucune absorption mesurable de la substance d'essai à la fin de la période d'absorption (ou avec le deuxième prélèvement de l'élimination). Si l'on peut démontrer que i) les critères de validité énoncés au paragraphe 113 sont satisfaits, et que ii) cette faible absorption n'est pas due à un défaut de l'essai (par exemple durée d'absorption insuffisante, technique d'enrichissement inadéquate entraînant une faible biodisponibilité, sensibilité insuffisante de la méthode d'analyse, non ingestion des aliments par les poissons, etc.), alors il est possible d'arrêter l'étude sans avoir à renouveler l'essai avec une durée d'absorption plus longue. Si au vu de l'étude préliminaire cela semble être le cas, il peut être conseillé, si possible, d'analyser les excréments pour étudier la substance d'essai non digérée suivant une approche fondée sur le bilan massique.

(28) Dans le cadre d'une étude avec exposition via le milieu aquatique, une demi-vie de 14 jours correspondrait à un FBC d'environ 10 000 L/kg si on utilisait des poissons de 1 g avec une cinétique d'absorption avoisinant 500 L/kg/j [selon l'équation de Sijm *et al.* (46)].

Nombre de poissons testés

132. Comme pour l'essai par exposition via le milieu aquatique, il convient de sélectionner des poissons de poids et de longueurs similaires, le plus petit d'entre eux ne devant pas peser moins de deux tiers du poids du poisson le plus gros (voir paragraphes 40 à 42).

133. Le nombre total de poissons utilisés pour l'étude est établi en fonction du programme de prélèvement (au minimum un prélèvement à la fin de la phase d'absorption et entre quatre et six prélèvements pendant la phase d'élimination, selon la durée de chaque phase). Il convient également de prendre en compte la sensibilité de la technique d'analyse, la concentration susceptible d'être atteinte à l'issue de la phase d'absorption (selon les informations disponibles au préalable) et la durée de l'élimination (si les informations disponibles au préalable permettent de l'estimer). Il convient de prélever chaque fois entre cinq et dix poissons et d'en mesurer le développement (poids et longueur totale) avant l'analyse chimique ou lipidique.

134. En raison de la variabilité inévitable de la taille, du développement et de la physiologie des poissons et de la quantité probablement variable de nourriture ingérée par chacun, il est nécessaire de prélever à chaque temps d'échantillonnage au moins cinq poissons du groupe d'essai et cinq poissons du groupe témoin pour établir de façon appropriée la concentration moyenne et sa variabilité. La variabilité des paramètres à considérer chez les poissons est susceptible d'accroître plus la variabilité générale non maîtrisée de l'essai que la variabilité inhérente aux méthodes d'analyse appliquées, ce qui justifie l'utilisation dans certains cas de jusqu'à dix poissons par prélèvement. Toutefois, si les concentrations de référence de la substance d'essai dans les poissons témoins ne sont pas mesurables au début de l'élimination, l'analyse chimique de deux à trois poissons témoins au dernier temps d'échantillonnage suffira uniquement si l'on continue à prélever les poissons restants du groupe témoin en fonction de leur poids et de leur longueur totale (de façon à prélever chaque fois le même nombre dans les groupes d'essai et témoin pour tenir compte de leur développement). Les poissons sont stockés, pesés individuellement (même s'il s'avère finalement nécessaire de combiner les résultats des prélèvements) et mesurés (longueur totale).

135. Ainsi, un essai type prévoyant une phase d'élimination de 28 jours avec cinq prélèvements nécessitera au total entre 59 et 120 poissons dans le groupe d'essai et entre 50 et 110 poissons dans le groupe témoin, en supposant que la technique d'analyse de la substance permette d'analyser la teneur en lipides sur un même poisson. S'il n'est pas possible d'analyser la substance chimique et la teneur en lipides sur le même poisson et que l'utilisation d'un poisson témoin pour analyser la teneur en lipides n'est pas envisageable (voir paragraphe 56), on devra ajouter 15 poissons (trois du stock de poissons au début de l'essai, trois respectivement du groupe témoin et du groupe d'essai au début de l'élimination et trois respectivement du groupe témoin et du groupe d'essai à la fin de l'expérience). On trouvera un exemple de programme de prélèvement avec les nombres des poissons utilisés à l'annexe 4.

Taux de charge

136. Les ratios eau/poissons sont aussi élevés qu'avec la méthode d'exposition en milieu aquatique (voir paragraphes 43 et 44). Bien que les taux de charge poissons/eau n'influent pas sur les concentrations d'exposition dans cet essai, il est recommandé d'appliquer un taux de charge compris entre 0.1 et 1.0 g de poisson (poids frais) par litre d'eau et par jour pour maintenir des concentrations adéquates d'oxygène dissous et minimiser le stress de l'essai sur les organismes.

Nourriture testée et alimentation

137. Durant la période d'acclimatation, les poissons reçoivent une alimentation appropriée (voir paragraphe 117). Si l'essai est réalisé avec un système de renouvellement dynamique, il convient d'interrompre le renouvellement au moment de nourrir les poissons.

138. Durant l'essai, il convient que l'alimentation du groupe testé soit conforme aux critères décrits précédemment (voir paragraphes 116 à 121). En plus des caractéristiques de la substance testée, de la sensibilité de la méthode d'analyse, de la concentration attendue dans l'alimentation en fonction des conditions environnementales et des niveaux de toxicité chronique/charge corporelle, il convient de tenir compte, pour définir la concentration cible de la substance, des qualités organoleptiques des aliments (qui ne repoussent pas les poissons). La concentration nominale de la substance d'essai est consignée dans le rapport d'essai. D'expérience, les concentrations comprises en 1 et 1 000 µg/g fournissent une fourchette d'étude adéquate pour les substances qui ne présentent aucun mécanisme toxique spécifique. S'agissant des produits chimiques dont l'action obéit à un mécanisme non spécifique, les résidus présents dans les tissus n'excèdent pas 5 µmol/g de lipides, sinon ils risquent d'entraîner des effets chroniques (19) (48) (50)²⁹. Concernant les autres substances, il convient de s'assurer qu'aucun effet nocif ne résulte de l'exposition cumulée (voir paragraphe 127). Cela est d'autant plus vrai si plusieurs substances sont testées en même temps (voir paragraphe 112).

139. La quantité adéquate de la substance d'essai peut être ajoutée à la nourriture pour poisson de trois façons (voir paragraphe 119 et annexe 7). Les méthodes et procédures d'enrichissement utilisées sont spécifiées dans le rapport d'essai. Les aliments non traités sont donnés aux poissons témoins ; si une huile non enrichie ou un solvant est utilisé comme véhicule dans la nourriture enrichie durant la phase d'absorption, la nourriture non traitée devra contenir une quantité équivalente de cette huile ou être traitée avec ce solvant à l'état pur. Il est nécessaire d'analyser au moins trois échantillons de la concentration de la substance d'essai dans les aliments, traités et non traités, avant le début et à la fin de la phase d'absorption. Après exposition à la nourriture traitée (phase d'absorption), les poissons (des deux groupes) reçoivent de la nourriture non traitée (phase d'élimination).

140. Les poissons reçoivent une ration déterminée (en fonction de l'espèce ; d'environ 1 à 2 % du poids frais par jour dans le cas de la truite). Cette ration alimentaire est déterminée de façon à éviter un développement rapide des poissons et une hausse importante de la teneur en lipides. Il convient de spécifier dans le rapport les rations administrées tout au long de l'essai. La première ration s'appuie sur les poids mesurés dans le stock de poisson juste avant le début de l'essai. La quantité est ajustée en fonction du poids frais des poissons prélevés aux différents temps prévus, pour tenir compte de leur développement en cours d'essai. Les poids et les longueurs des poissons dans les bassins d'essai et témoins peuvent être estimés à partir des poids et des longueurs totales des poissons utilisés à chaque échantillonnage ; il ne faut pas peser ou mesurer le poisson restant dans les bassins d'essai et témoins. Il est important de respecter la ration alimentaire fixée tout au long de l'expérience.

141. Il convient d'observer l'alimentation des poissons pour s'assurer qu'ils consomment visiblement toute la nourriture présentée et donc que les taux d'ingestion utilisés dans les calculs sont justes. On considèrera la pertinence de réaliser des essais d'alimentation préliminaires ou de prendre en compte des expériences antérieures pour déterminer une ration alimentaire qui garantisse que toute la nourriture journalière administrée en une fois est consommée. Quand les poissons laissent systématiquement une partie de cette nourriture, il peut être judicieux de répartir la dose en ajoutant une prise par jour d'essai (même quantité journalière mais divisée par deux et administrée en deux fois au lieu d'une, par exemple). Au besoin, la seconde prise interviendra à un moment précis et sera chronométrée de façon à ce que le maximum de temps possible s'écoule avant le prélèvement des poissons (par exemple, cette seconde prise interviendra pendant la première moitié d'une journée d'essai).

142. Bien que les poissons consomment en général rapidement la nourriture administrée, il est important de s'assurer que le produit chimique reste adsorbé dans les aliments. On évitera donc que la substance d'essai ne se disperse dans l'eau, ce qui exposerait les poissons à des concentrations

(29) Les concentrations internes réelles ne pouvant être déterminées qu'à l'issue de l'essai, il est nécessaire d'estimer la concentration interne attendue (par exemple en s'appuyant sur le FBA attendu et sur la concentration dans la nourriture ; voir à l'annexe 5 l'équation A5.8).

aqueuses de la substance d'essai en plus de la voie alimentaire. Pour cela, il convient de retirer les aliments non consommés (et les excréments) des bassins d'essai et témoins dans l'heure voire, de préférence, dans les 30 minutes suivant l'administration. De plus, il est possible d'utiliser un système par lequel l'eau est nettoyée en continu au moyen d'un filtre à charbon actif, qui adsorbe tout contaminant dissous. Les systèmes de renouvellement dynamiques peuvent aider à évacuer rapidement les particules alimentaires et les substances dissoutes³⁰. Parfois, modifier la technique d'enrichissement des aliments peut contribuer à atténuer le problème (voir paragraphe 119).

Lumière et température

143. Concernant la méthode d'exposition via le milieu aquatique (voir paragraphe 48), une photopériode de 12 à 16 heures est recommandée et la température (± 2 °C) est adaptée à l'espèce testée (voir annexe 3). Il convient de connaître le type et les caractéristiques de l'illumination et de les spécifier dans le rapport.

Témoins

144. Il convient d'utiliser un groupe témoin auquel on donne la même ration qu'au groupe d'essai mais sans ajouter la substance d'essai à leur nourriture. Si une huile ou un solvant a été utilisé comme véhicule pour enrichir les aliments du groupe d'essai, il faudra traiter la nourriture du groupe témoin exactement de la même façon mais sans ajouter la substance d'essai de façon à ce que l'alimentation des groupes d'essai et témoin soit équivalente (voir paragraphes 121 et 139).

Fréquence des mesures de la qualité de l'eau

145. Les conditions décrites pour l'essai par exposition en milieu aquatique s'appliquent ici aussi, à l'exception du fait que le carbone organique total est mesuré uniquement avant l'essai au moment de la caractérisation de l'eau de l'essai (voir paragraphe 53).

Prélèvement et analyse des poissons et alimentation

Analyse des échantillons alimentaires

146. Au moins trois échantillons de la nourriture d'essai et témoin sont analysés pour déterminer la concentration de la substance d'essai et la teneur en lipides, au minimum avant le début et à la fin de la phase d'absorption. Les méthodes d'analyse et les procédures appliquées pour garantir l'homogénéité de l'alimentation sont spécifiées dans le rapport d'essai.

147. Il convient d'analyser la substance d'essai dans les échantillons suivant la méthode définie et validée. Une étude préliminaire est réalisée pour établir la limite de quantification, le pourcentage d'isolement, les interférences et la variabilité de l'analyse pour la matrice d'échantillon prévue. Si l'on teste du matériel radiomarké, on devra considérer les mêmes aspects qu'avec la méthode d'exposition en milieu aquatique, l'analyse des aliments remplaçant l'analyse de l'eau (voir paragraphe 65).

Analyse des poissons

148. À chaque temps de prélèvement, on prélève entre 5 et 10 individus dans chacun des groupes, témoin et d'essai (dans certains cas, le nombre de poissons témoins peut être réduit ; voir paragraphe 134).

(30) La présence de la substance d'essai dans le milieu de l'essai à travers les excréments du poisson ou par lixiviation de la nourriture ne peut pas être totalement évitée. Aussi est-il possible par exemple de mesurer la concentration de la substance présente dans l'eau à la fin de la phase d'absorption, surtout si on utilise un système semi-statique, afin d'établir si une exposition en milieu aquatique est intervenue.

149. Les prélèvements ont lieu, chaque jour de l'expérience, au même moment (en fonction du moment auquel les poissons sont nourris) et sont chronométrés pour réduire au maximum la probabilité que des aliments restent dans les intestins durant la phase d'absorption et au début de la phase d'élimination, et éviter ainsi de fausser les concentrations totales de la substance d'essai (il convient donc de prélever les poissons à la fin d'une journée d'essai, sachant qu'un jour d'essai commence avec l'administration des aliments et se termine juste avant la ration suivante, soit approximativement 24 heures plus tard). L'élimination commence avec la première ration de nourriture « non enrichie » (voir paragraphe 128). Le premier prélèvement de la phase d'élimination (réalisé juste avant la deuxième ration non enrichie) est important, puisqu'il sert à extrapoler la concentration au temps 0, un jour plus tôt, ($C_{0,d}$, la concentration dans le poisson à la fin de l'absorption/au début de l'élimination). En option, il est aussi possible de prélever et d'analyser séparément le tractus gastro-intestinal du poisson à la fin de l'absorption et aux jours 1 et 3 de l'élimination.

150. À chaque temps d'échantillonnage, il convient de prélever les poissons des groupes d'essai et témoin et de les traiter de la même façon qu'avec la méthode d'exposition en milieu aquatique (voir paragraphes 61 à 63).

151. On mesure les concentrations de la substance d'essai dans le poisson (poids frais) au moins à la fin de la phase d'absorption et pendant la phase d'élimination dans les groupes témoin et d'essai. Durant la phase d'élimination, quatre à six temps d'échantillonnage sont recommandés (par exemple aux jours 1, 3, 7, 14 et 28). En option, il est aussi possible d'inclure un temps d'échantillonnage supplémentaire après 1 à 3 jours d'absorption pour estimer le rendement d'assimilation à partir de la phase linéaire de l'absorption, puisqu'encore très proche du début de la période d'exposition. La méthode décrite tolère deux écarts : i) si on prolonge la phase d'absorption pour étudier les cinétiques d'absorption, il faudra prévoir un temps d'échantillonnage supplémentaire durant la phase d'absorption et donc inclure des poissons supplémentaires (voir paragraphe 126) ; ii) si aucune absorption mesurable n'intervient à la fin de la phase d'absorption, on devra mettre fin à l'essai (voir paragraphe 131). Chaque poisson prélevé est pesé (et sa longueur totale mesurée) pour permettre de déterminer les constantes cinétiques de croissance. On peut aussi mesurer les concentrations de la substance dans des tissus spécifiques du poisson (fractions comestibles et non comestibles) à la fin de l'absorption et à des moments précis de l'élimination. Si l'on teste du matériel radiomarké, il est nécessaire de considérer les mêmes aspects qu'avec la méthode d'exposition en milieu aquatique, l'analyse des aliments remplaçant l'analyse de l'eau (voir paragraphe 65).

152. En cas d'utilisation périodique d'une substance de référence (voir paragraphe 25), il est préférable de mesurer les concentrations dans le groupe d'essai à la fin de l'absorption et à tous les temps de l'élimination spécifiés pour la substance d'essai (poisson entier) ; il convient d'analyser uniquement les concentrations dans le groupe témoin à la fin de l'absorption (poisson entier). Parfois (par exemple quand les techniques d'analyse de la substance d'essai et de la substance de référence sont incompatibles au point qu'il est nécessaire d'utiliser des poissons supplémentaires pour respecter le programme de prélèvement), on pourra appliquer une autre approche pour minimiser le nombre de poissons supplémentaires nécessaires. Les concentrations de la substance de référence sont mesurées pendant l'élimination uniquement aux jours 1, 3 et lors de deux autres temps d'échantillonnage, sélectionnés de manière à obtenir des estimations fiables de la concentration au temps 0 ($C_{0,d}$) et de k_2 pour cette substance de référence.

153. Si possible, la teneur en lipides de chaque poisson est déterminée à chaque prélèvement, ou au moins au début et à la fin de la phase d'absorption et à la fin de la phase d'élimination (voir paragraphes 56 et 67). Selon la méthode d'analyse retenue (voir paragraphe 67 et annexe 4), il est possible d'utiliser les mêmes poissons pour déterminer la teneur en lipides et la concentration de la substance d'essai. Cela permet de minimiser le nombre de poissons nécessaires. Néanmoins, quand ce n'est pas possible, il convient d'appliquer l'approche décrite pour la méthode d'exposition en milieu

aquatique (voir paragraphe 56 les différentes options envisageables pour mesurer la teneur en lipides). La méthode appliquée pour quantifier la teneur en lipides est spécifiée dans le rapport.

Qualité de la méthode d'analyse

154. Il est nécessaire de mener des essais préliminaires pour s'assurer de la spécificité, de la précision et de la reproductibilité de la technique d'analyse spécifique à la substance, ainsi que de l'isolement de la substance d'essai à partir de l'alimentation et du poisson.

Mesure du développement des poissons

155. Au début de l'essai, il convient de peser et de mesurer un échantillon de poissons du stock. Ces poissons sont prélevés juste avant la première administration de l'alimentation enrichie (une heure avant par exemple) et assignés au jour d'essai 0. Il convient que le nombre de poissons prélevés soit égal ou supérieur à celui des poissons prélevés ultérieurement pendant l'essai. Il peut s'agir des mêmes poissons utilisés pour l'analyse lipidique réalisée avant le début de la phase d'absorption (voir paragraphe 153). À chaque temps d'échantillonnage, les poissons sont d'abord pesés puis mesurés. Pour chaque poisson, le poids (et la longueur) sont reliés à la concentration chimique analysée (et s'il y a lieu à la teneur en lipides), par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé. Ces mesures peuvent servir à estimer le poids (et la longueur) des poissons restant dans les bassins d'essai et témoins.

Évaluation de l'essai

156. Il convient de consigner chaque jour les observations relatives à la mortalité. On observera et enregistrera aussi tout effet nocif, par exemple un comportement anormal ou une pigmentation. Les poissons sont considérés morts en l'absence de mouvement respiratoire ou de réaction à un léger stimulus mécanique. Tout poisson mort ou visiblement moribond devra être retiré.

RAPPORT D'ESSAI ET RÉSULTATS

Traitement des résultats

157. Les résultats des essais sont utilisés pour calculer la constante cinétique d'élimination (k_2) en fonction du poids frais total du poisson. La constante cinétique de croissance, k_g , basée sur la progression moyenne du poids du poisson est calculée et utilisée pour produire la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance, k_{2g} , s'il y a lieu. Il convient en outre de consigner le rendement d'assimilation (α ; absorption par voie intestinale), le facteur de bioamplification cinétique (FBA_k) (si nécessaire corrigé de la croissance, FBA_{kg}), sa valeur corrigée des lipides (FBA_{kL} ou FBA_{kgL} , si corrigé de l'effet de dilution par la croissance) et la ration alimentaire. Par ailleurs, s'il est possible d'estimer le temps nécessaire à l'instauration de l'état stationnaire durant la phase d'absorption (par exemple 95 % de l'état stationnaire ou $t_{95} = 3.0/k_2$), on pourra inclure une estimation du FBA à l'état stationnaire (FBA_{ES}) (voir paragraphes 105 et 106 et annexe 5) si la valeur t_{95} indique que l'état stationnaire semble atteint. Il convient d'appliquer la même correction lipidique au FBA_{ES} qu'au FBA cinétique (FBA_k) pour obtenir une valeur corrigée de la teneur en lipides, FBA_{ESL} (il n'existe aucune procédure convenue pour corriger un FBA à l'état stationnaire de l'effet de la dilution par la croissance). Les formules et des exemples de calcul sont présentés à l'annexe 7. Plusieurs méthodes permettent d'estimer un facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) à partir des données obtenues dans l'étude par voie alimentaire. Elles sont discutées à l'annexe 8.

Poids et longueur des poissons

158. Le poids frais et la longueur de chaque poisson, à chaque temps d'échantillonnage, sont présentés séparément pour les groupes d'essai et les groupes témoins pendant la phase d'absorption

[poissons du stock au début de la période d'absorption ; groupe témoin et groupe d'essai à la fin de la période d'absorption et, le cas échéant, au début de la période (par exemple jours 1 à 3 de l'absorption) et pendant la phase d'élimination (par exemple jours 1, 2, 4, 7, 14, 28, pour le groupe d'essai et le groupe témoin)]. Le poids est la mesure du développement à privilégier afin de corriger les valeurs de l'effet de dilution par la croissance. Les paragraphes 162 et 163 et l'annexe 5 présentent la ou les méthode(s) utilisée(s) pour cette correction.

Concentration de la substance d'essai dans les poissons

159. Les mesures des résidus de la substance d'essai réalisées sur chaque poisson (ou sur des échantillons regroupés si des mesures individuelles ne sont pas possibles), exprimées en concentration du poids frais, sont présentées séparément selon les temps d'échantillonnage pour les groupes d'essai et témoins. Si une analyse lipidique a été réalisée sur chacun des poissons prélevés, on calculera et consignera les concentrations individuelles corrigées de la teneur en lipides, exprimées en teneur en lipides du poids frais.

- Les mesures des résidus de la substance d'essai réalisées sur chaque poisson (ou sur des échantillons regroupés si des mesures individuelles ne sont pas possibles, voir paragraphe 66) pour la période d'élimination sont converties dans leurs logarithmes naturels et portées sur un graphique en fonction du temps (jour). Si aucun point aberrant manifeste n'est observé sur le tracé, on pourra appliquer le test du point aberrant statistiquement valide pour supprimer les points parasites et on justifiera dûment leur omission.
- Une corrélation des moindres carrés linéaires est calculée pour $\ln(\text{concentration})$ en fonction du temps (jour) d'élimination. La pente et l'ordonnée à l'origine de la droite sont consignées comme la constante cinétique d'élimination globale (k_2) et le logarithme naturel de la concentration au temps 0 ($C_{0,d}$) obtenue (voir annexe 5 et annexe 7 pour plus de détails). Si cela n'est pas possible parce que les concentrations tombent sous la limite de quantification pour le deuxième prélèvement de l'élimination, on peut procéder à une estimation basse de k_2 (voir annexe 7).
- Les écarts de la pente et de l'ordonnée à l'origine de la droite sont calculés en utilisant les procédés statistiques standard, et les intervalles de confiance de 90 % (ou 95 %) autour de ces résultats sont évalués et présentés.
- La concentration moyenne mesurée dans le poisson au dernier jour de l'absorption (concentration mesurée au temps 0, $C_{0,m}$) est aussi calculée et comparée à la valeur déduite $C_{0,d}$. Quand la valeur déduite est inférieure à la valeur mesurée, l'écart entre les deux peut indiquer la présence, dans les intestins, d'aliments enrichis non digérés. Si la valeur déduite est nettement supérieure à la valeur mesurée, cela peut signifier que la valeur déduite de la régression linéaire des données d'élimination est erronée et devrait être réévaluée (voir annexe 7).

Vitesse d'élimination et facteur de bioamplification

160. Pour calculer le facteur de bioamplification, il convient tout d'abord d'obtenir le rendement d'assimilation (absorption de la substance d'essai par voie intestinale, α). Pour cela, il convient d'appliquer l'équation A7.1 à l'annexe 7, qui nécessite de connaître la concentration dans le poisson obtenue au temps 0 de la phase d'élimination ($C_{0,d}$), la constante cinétique d'élimination (globale) (k_2), la concentration dans les aliments (C_{alim}), la constante cinétique d'ingestion (I) et la durée de la phase d'absorption (t). La pente et l'ordonnée à l'origine de la relation linéaire entre $\ln(\text{concentration})$ et le temps d'élimination sont consignées comme la constante cinétique d'élimination globale ($k_2 = \text{pente}$) et la concentration au temps 0 ($C_{0,d} = e^{\text{ordonnée}}$), comme indiqué précédemment. Il convient de contrôler la plausibilité biologique des valeurs obtenues (par exemple, le rendement d'assimilation sous forme

de fraction n'est pas supérieur à 1). (I) est calculée en divisant la masse des aliments par la masse du poisson nourri chaque jour (s'il est nourri à 2 % de son poids, (I) sera égal à 0.02). Néanmoins, il peut s'avérer nécessaire d'ajuster la ration alimentaire utilisée dans les calculs en fonction du développement des poissons (en utilisant la constante cinétique de croissance connue pour estimer le poids du poisson à chaque temps de prélèvement durant la phase d'absorption ; voir annexe 7). Dans les cas où il n'est pas possible d'obtenir k_2 et $C_{0,d}$ parce que, par exemple, les concentrations ont chuté sous le seuil de détection au moment du deuxième prélèvement d'élimination, on peut procéder à une estimation basse de k_2 et borner FBA_k supérieurement (voir annexe 7).

161. Une fois le rendement d'assimilation (α) obtenu, on peut calculer le facteur de bioamplification en multipliant α par la constante cinétique d'ingestion (I) et en la divisant par la constante cinétique d'élimination (globale) (k_2). Le facteur de bioamplification corrigé de l'effet de dilution par la croissance est calculé de la même façon mais en utilisant la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (k_{2g} ; voir paragraphes 162 et 163). Il est aussi possible d'estimer le rendement d'assimilation si on a analysé les tissus des poissons prélevés lors de la phase initiale linéaire de l'absorption (voir paragraphe 151 et annexe 7). Cette valeur représente une estimation indépendante du rendement d'assimilation pour un organisme quasiment non exposé (à savoir le poisson prélevé au tout début de la phase d'absorption). Le rendement d'assimilation estimé à partir des données de l'élimination sert habituellement à obtenir le FBA.

Correction de la teneur en lipides et correction de la dilution par la croissance

162. La croissance des poissons pendant la phase d'élimination peut réduire les concentrations chimiques mesurées chez eux, ce qui augmente la constante cinétique d'élimination globale, k_2 , par rapport à ce que provoqueraient les processus d'élimination seuls (par exemple métabolisme, égestion) (voir paragraphe 72). La teneur en lipides des poissons d'essai (fortement associée à la bioaccumulation des produits chimiques hydrophobes) et la teneur en lipides des aliments peuvent suffisamment varier dans la pratique pour que leur correction soit nécessaire pour obtenir des facteurs de bioamplification qui aient un sens. Le facteur de bioamplification est corrigé de l'effet de dilution par la croissance (comme le FBC cinétique avec la méthode d'exposition en milieu aquatique) et corrigé de la teneur en lipides des aliments en fonction de celle du poisson (le facteur de correction en fonction des lipides). Les annexes 5 et 7 présentent les équations respectives et donnent des exemples de calculs de ce type.

163. Pour corriger de la dilution par la croissance, il convient de calculer la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (k_{2g}) (voir annexe 5 pour les équations). Cette constante cinétique d'élimination corrigée (k_{2g}) est utilisée pour calculer le facteur de bioamplification corrigé de la croissance, comme indiqué au paragraphe 73. Dans certains cas, cette méthode n'est pas possible. Une autre méthode contournant la nécessité d'une correction de la dilution par la croissance consiste à utiliser le poids du produit chimique par poisson (entier) lors de l'élimination plutôt que le poids du produit chimique par unité de masse du poisson (concentration). Ce calcul est facile à faire, car dans le cadre d'essais respectant la présente LD, on associe les concentrations tissulaires aux poids individuels des poissons. L'annexe 5 présente la procédure de calcul simple. Il convient de souligner que le recours à cette méthode alternative n'empêche pas qu'il faille estimer et consigner la valeur de k_2 .

164. Pour corriger la teneur en lipides des aliments et du poisson quand l'analyse lipidique n'a pas été réalisée sur tous les poissons prélevés, on déduit les fractions lipidiques moyennes (du poids frais) dans le poisson et dans les aliments³¹. Le facteur de correction de la teneur en lipides (L_c) est alors calculé en divisant la fraction lipidique moyenne du poisson par la fraction lipidique moyenne des

(31) Cette méthode est spécifique à l'étude fondée sur l'alimentation, et varie de la procédure appliquée pour l'exposition en milieu aquatique ; aussi employons-nous le terme « correction » au lieu de « normalisation » afin d'éviter toute confusion – voir aussi la note de bas de page (24).

aliments. Le facteur de bioamplification, corrigé de la croissance ou pas, est divisé par le facteur de correction de la teneur en lipides pour calculer le facteur de bioamplification corrigé des lipides.

165. Si l'analyse chimique et l'analyse lipidique ont été menées sur le même poisson au même temps d'échantillonnage, il convient d'utiliser ces données corrigées des lipides par poisson pour calculer directement un FBA corrigé des lipides [voir (37)]. La courbe de la concentration corrigée en fonction des lipides donne $C_{0,d}$ et k_2 . On peut ensuite procéder à une analyse mathématique en utilisant les équations à l'annexe 7, mais le rendement d'assimilation (α) est calculé en utilisant la constante cinétique d'ingestion normalisée par rapport aux lipides (I_{lipides}) et la concentration dans l'alimentation en fonction des lipides ($C_{\text{alim-lipides}}$). Les paramètres corrigés de la teneur en lipides sont alors utilisés de façon similaire pour calculer le FBA (pour calculer le FBA_{kgL} corrigé de la teneur en lipides et de la croissance, on applique aussi la correction de la constante cinétique de croissance à la fraction lipidique et non au poids frais du poisson).

Interprétation des résultats

166. La croissance moyenne dans le groupe d'essai et celle dans le groupe témoin en principe ne diffèrent pas beaucoup afin d'exclure les effets toxiques. Les constantes cinétiques de croissance ou les courbes de croissance des deux groupes sont comparées au moyen d'une procédure adaptée³².

Rapport d'essai

167. Une fois l'étude terminée, il convient de rédiger un rapport final présentant les informations sur la *substance d'essai*, l'*espèce testée* et les *conditions expérimentales* énumérées au paragraphe 81 (pour la méthode d'exposition en milieu aquatique). En outre, ce rapport devra aussi inclure les renseignements suivants :

Substance d'essai

- Toute information sur la stabilité de la substance d'essai dans la nourriture préparée.

Conditions expérimentales

- La concentration nominale de la substance dans les aliments, la technique d'enrichissement utilisée, la quantité de véhicule (lipides) utilisé pour cet enrichissement (le cas échéant), les concentrations mesurées de la substance d'essai dans l'alimentation enrichie pour chaque analyse (d'au moins trois échantillons, avant le début de l'étude et à la fin de la phase d'absorption) et les valeurs moyennes.
- Le cas échéant, le type et la qualité de l'huile ou du solvant (classe, fabricant, etc.) utilisé pour l'enrichissement.
- Le type de nourriture utilisée (analyse immédiate³³, classe ou qualité, fabricant, etc.), la ration alimentaire durant la phase d'absorption, la quantité de nourriture administrée et la fréquence (en incluant les ajustements réalisés en fonction du poids des poissons prélevés).

³²

On peut réaliser un test t sur les constantes cinétiques de croissance, pour tester si le développement entre les groupes témoins et d'essai varie, ou test F en cas d'analyse des écarts. Si besoin, on peut recourir à un test F ou à un essai fondé sur les rapports de probabilité pour faciliter le choix du modèle de croissance approprié [monographie OCDE n° 54 (32)].

(33) Technique d'analyse des aliments s'attachant à la teneur en protéines, en lipides, en cellulose brute et en cendres. Ces informations sont habituellement disponibles auprès du fabricant.

- Le moment auquel les poissons ont été prélevés et euthanasiés pour l'analyse chimique à chaque temps d'échantillonnage (par exemple une heure avant l'administration de la ration du jour suivant).

Résultats

- Résultats des études préliminaires.
- Informations sur les effets nocifs observés.
- Description complète de tous les procédés d'analyse chimique utilisés, y compris les seuils de détection et de quantification, la variabilité et l'isolement.
- Concentrations lipidiques mesurées dans la nourriture (témoin et enrichie), valeurs individuelles, moyennes et écarts-types.
- Tableau des poids (et longueurs) de chaque poisson des groupes témoin et d'essai (par exemple en attribuant un identifiant unique à chaque poisson prélevé) et calculs, constante(s) cinétique(s) de croissance obtenues et intervalle(s) de confiance de 95 %.
- Tableau des concentrations de la substance d'essai dans les poissons, concentrations moyennes mesurées à la fin de l'absorption ($C_{0,m}$), et constante cinétique d'élimination (globale) obtenue (k_2) et concentration dans le poisson au début de la phase d'élimination ($C_{0,d}$) ainsi que les écarts de ces valeurs (pente et ordonnée à l'origine).
- Tableau des teneurs en lipides par poisson (s'il y a lieu, liste des concentrations chimiques spécifiques), valeur moyennes pour les groupes témoin et d'essai au début de l'essai, à la fin de l'absorption et à la fin de l'élimination.
- Courbes (incluant toutes les données mesurées), montrant (s'il y a lieu, les concentrations peuvent être exprimées pour l'animal entier ou des tissus spécifiques) :
 - le développement (soit le poids (et la longueur) du poisson en fonction du temps) ou le poids transformé en logarithme naturel en fonction du temps ;
 - l'élimination de la substance chimique dans le poisson ; et
 - la concentration transformée en logarithme naturel (ln concentration) en fonction du temps d'élimination (y compris la constante cinétique d'élimination obtenue k_2 , et la concentration dans le poisson déduite du logarithme naturel au début de la phase d'élimination, $C_{0,d}$).
- Si aucun point aberrant manifeste n'est observé sur un tracé, on pourra appliquer le test du point aberrant statistiquement valide pour supprimer les points parasites et on justifiera dûment leur omission.
- Constante cinétique d'élimination et demi-vie calculées corrigées de la croissance.
- Rendement d'assimilation calculé (α).
- FBA alimentaire « brut », FBA cinétique corrigé des lipides et de la croissance (« brut » et corrigé des lipides selon le poids frais total du poisson), FBA spécifique à certains tissus s'il y a lieu.

- Toute information concernant les métabolites de la substance chimique radiomarquée et leur accumulation.
- Toute anomalie concernant l'essai, tout écart à ces modes opératoires et toute autre information pertinente.
- Un tableau synthétisant les données mesurées et calculées pertinentes, comme ci-après :

Constantes cinétiques d'élimination de la substance et facteurs de bioamplification (FBA_k)	
k_g (constante cinétique de croissance ; jour ⁻¹) :	Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾
k_2 (constante cinétique d'élimination globale, jour ⁻¹) :	Insérer la valeur (IC de 95 %)
k_{2g} (constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance ; jour ⁻¹) :	Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾
$C_{0,m}$ (concentration mesurée au temps 0, concentration dans le poisson à la fin de l'absorption) (µg/g) :	Insérer la valeur ± ET ⁽²⁾
$C_{0,d}$ (concentration obtenue au temps 0 de la phase d'élimination ; µg/g) :	Insérer la valeur ± ET ⁽²⁾
I (taux d'ingestion fixé ; g de nourriture/g de poisson/jour) :	Insérer la valeur
I_g (ration alimentaire effective, ajustée de la croissance ; g de nourriture/g poisson/jour) ⁽²⁾ :	Insérer la valeur ± ET ⁽²⁾
C_{alim} (concentration de la substance chimique dans les aliments ; µg/g) :	Insérer la valeur ± ET ⁽²⁾
α (rendement d'assimilation de la substance) :	Insérer la valeur ± ET ⁽²⁾
FBA _k (FBA alimentaire cinétique) :	Insérer la valeur (IC de 95%) ⁽¹⁾
FBA _{kg} (FBA alimentaire cinétique corrigé de la croissance) :	Insérer la valeur (IC de 95 %) ⁽¹⁾
$t_{1/2g}$ (demi-vie corrigée de la croissance, en jours) :	Insérer la valeur ± ET ⁽²⁾
Lc (facteur de correction de la teneur en lipides) :	Insérer la valeur
FBA _{kgL} (FBA cinétique corrigé de la croissance et des lipides) :	Insérer la valeur
FBA _{ES-L} (FBA à l'état stationnaire indicatif corrigé des lipides) ⁽²⁾ :	Insérer la valeur ± ET ⁽²⁾

(1) IC : intervalle de confiance (quand estimation possible)

(2) ET : écart-type (quand estimation possible)

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (1996), *Essai n° 305: Bioconcentration: Essai dynamique chez le poisson*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 3, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264070479-fr](https://doi.org/10.1787/9789264070479-fr).
- (2) OCDE (1995), *Essai n° 105: Solubilité dans l'eau*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 1, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264069596-fr](https://doi.org/10.1787/9789264069596-fr).
- (3) Li A., Doucette W.J. (1993). The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. *Environ Toxicol Chem* 12: 2031-2035
- (4) OCDE (1995), *Essai n° 107: Coefficient de partage (n-octanol/eau): méthode par agitation en flacon*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 1, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264069633-fr](https://doi.org/10.1787/9789264069633-fr).
- (5) OCDE (2004), *Essai n° 117: Coefficient de partage (n-octanol/eau), méthode HPLC*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 1, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264069831-fr](https://doi.org/10.1787/9789264069831-fr).
- (6) OCDE (2006), *Essai n° 123 : Coefficient de partage (1-octanol/eau) : méthode du brassage lent*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 1, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264015869-fr](https://doi.org/10.1787/9789264015869-fr).
- (7) OCDE (2004), *Essai n° 111: Hydrolyse en fonction du pH*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 1, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264069718-fr](https://doi.org/10.1787/9789264069718-fr).
- (8) OCDE (1997). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement - Série sur les essais et l'évaluation Numéro 7 : Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water [OCDE/GD\(97\)21](https://doi.org/10.1787/9789264069718-fr). Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris, France.
- (9) OCDE (1995), *Essai n° 115: Tension superficielle des solutions aqueuses*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 1, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264069794-fr](https://doi.org/10.1787/9789264069794-fr).
- (10) OCDE (2006), *Essai n° 104: Pression de vapeur*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 1, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264069572-fr](https://doi.org/10.1787/9789264069572-fr).
- (11) OCDE (1992), *Essai n° 301: Biodégradabilité Facile*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 3, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264070356-fr](https://doi.org/10.1787/9789264070356-fr).
- (12) OCDE (2006), *Essai n° 310 : Biodégradabilité facile - dégagement de CO₂ dans des flacons hermétiquement clos (essai de l'espace libre au-dessus du liquide)*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 3, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264016811-fr](https://doi.org/10.1787/9789264016811-fr).
- (13) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102: 117-156.
- (14) Bintein S., Devillers J. et Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.
- (15) OCDE (2011). QSAR Toolbox 2.1. Février 2011. Disponible à l'adresse : http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. et Klamer H.J.C. (2001). Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4097-4102.
- (17) Fernandez J.D., Denny J.S. et Tietge J.E. (1998). A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to commercially available pelletized fish food. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2058-2062.
- (18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. et Dawson T.D. (2004). A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2', 5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicol. Sci.* 77: 206-218.

- (19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. et Lampi M.A. (2008). Guidance for evaluating in vivo fish bioaccumulation data. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4: 139-155.
- (20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. et Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2436-2448.
- (21) Schlechtriem C., Fliedner A. et Schäfers C. (2012). Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of LD OCDE 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13, publié le 3 avril 2012.
- (22) OCDE (1992), *Essai n° 210: Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264070110-fr](https://doi.org/10.1787/9789264070110-fr).
- (23) OCDE (1998), *Essai n° 212: Poisson, essai de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264070158-fr](https://doi.org/10.1787/9789264070158-fr).
- (24) OCDE (2000), *Essai n° 215: Poisson, essai sur la croissance des juvéniles*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264070219-fr](https://doi.org/10.1787/9789264070219-fr).
- (25) OCDE (2000). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement - Série sur les essais et l'évaluation Numéro 23 : Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures [ENV/JM/MONO\(2000\)6](https://doi.org/10.1787/9789264070219-fr). Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris, France.
- (26) US-EPA (1994). Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, États-Unis.
- (27) US-FDA (1999). Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, États-Unis.
- (28) US-EPA (1974). Section 5, A(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, États-Unis.
- (29) Bligh E.G. et Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- (30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. et Parrish C.C. (1985). Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. *Limnol. Oceanogr.* 30: 1099-1105.
- (31) Smedes F. (1999). Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst.* 124: 1711-1718.
- (32) OCDE (2006). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement - Série sur les essais et l'évaluation Numéro 54 : Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. [ENV/JM/MONO\(2006\)18](https://doi.org/10.1787/9789264070219-fr). Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris, France.
- (33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. et Jaber M.J. (2008). Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.
- (34) Springer T.A. (2009). Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, États-Unis.
- (35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. et Boethling R.S. (2009). A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. et Peterson D. (2001). A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (présentation). Pour la 12^e Conférence scientifique annuelle de SETAC Europe, Madrid, Espagne.

- (37) Fisk A.T., Cymbalisky C.D., Bergman Å. et Muir D.C.G. (1996). Dietary accumulation of C₁₂- and C₁₆-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1775-1782.
- (38) Anonyme (2004). Fish, dietary bioaccumulation study - Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (39) Anonyme (2004). Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. et Hutzinger O. (1984). Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish. *Toxicol. Environ. Chem.* 7: 173-189.
- (41) Muir D.C.G., Marshall W.K. et Webster G.R.B. (1985). Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. *Chemosphere.* 14: 829-833.
- (42) Thomann R.V. (1989). Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
- (43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. et Whiteman F.W. (2004). A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. *Toxicol. Sci.* 77: 219-229.
- (44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. et Plotzke K. (2009). Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5: 624-637.
- (45) Sijm D.T.H.M. et van der Linde A. (1995). Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2769-2777.
- (46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. et Opperhuizen A. (1995). Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisky C.D. et Muir D.G.G. (1998). Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 951-961.
- (48) McGrath J.A., Parkerton T.F. et Di Toro D.M. (2004). Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2503-2517.
- (49) Poppendieck D.G. (2002). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, États-Unis.
- (50) McCarty L.S. et Mackay D. (1993). Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. *Environ. Sci. Technol.* 27: 1718-1728.
- (51) OCDE (2012). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement - Série sur les essais et l'évaluation Numéro 175 : Part I - Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II - Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris, France.

ANNEXE 1

DÉFINITIONS ET UNITÉS

Le rendement d'assimilation (α) est une mesure de la quantité relative de substance absorbée dans l'organisme par les intestins (α n'a pas d'unité, mais est exprimé plus souvent en pourcentage qu'en fraction).

La bioaccumulation renvoie généralement à un processus selon lequel la concentration de la substance chimique dans un organisme atteint un niveau qui excède celle mesurée dans le milieu environnant (par exemple, l'eau pour un poisson ou l'air pour un mammifère), dans la nourriture, ou les deux (1).

La bioconcentration est l'accroissement de la concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme (ou dans un tissu spécifié de ce dernier) par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant.

Le facteur de bioconcentration (FBC ou KB) à n'importe quel instant de la phase d'absorption de cet essai d'accumulation est la concentration de la substance d'essai dans ou sur le poisson ou dans un tissu spécifié de ce dernier (C_p en mg/kg) divisée par la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant (C_e en mg/L). Le FBC est exprimé en $L \cdot kg^{-1}$. Il convient de noter que les corrections de la croissance et/ou d'une teneur en lipides type ne sont pas prises en compte.

La bioamplification est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme (ou des tissus spécifiques de cet organisme) relative à la concentration de la substance d'essai dans les aliments.

Le facteur de bioamplification (FBA) est la concentration d'une substance chez un prédateur relative à la concentration chez la proie (ou l'alimentation) de ce prédateur à l'état stationnaire. La méthode décrite dans la LD évite soigneusement toute exposition par le milieu aquatique. En conséquence, un FBA obtenu à partir de cette méthode d'essai n'est pas directement comparable à un FBA obtenu avec une étude sur le terrain (qui permet de combiner exposition en milieu aquatique et par voie alimentaire).

Le facteur de bioamplification alimentaire (FBA alimentaire) est le terme utilisé dans cette LD pour décrire le résultat de l'essai avec exposition par voie alimentaire, dans lequel on évite soigneusement toute exposition par le milieu aquatique ; le FBA alimentaire obtenu avec cette méthode n'est pas directement comparable à un FBA obtenu avec une étude sur le terrain (qui permet de combiner exposition en milieu aquatique et par voie alimentaire).

La phase d'élimination ou de post-exposition (perte) est la période qui fait suite au transfert des poissons testés d'un milieu contenant la substance d'essai vers un milieu dépourvu de cette substance, période pendant laquelle on étudie l'élimination (ou la perte nette) de la substance par les poissons testés (ou par un tissu spécifié de ces derniers).

La constante cinétique d'élimination (de perte) (k_2) est la valeur numérique qui représente la vitesse de réduction de la concentration de la substance d'essai dans les poissons testés (ou dans un tissu spécifié de ces derniers) à la suite du transfert des poissons testés d'un milieu contenant la -1 substance d'essai vers un milieu dépourvu de cette substance (k_2 est exprimée en jour⁻¹).

Le carbone organique dissous (COD) est une mesure de la concentration de carbone provenant de sources organiques dissoutes dans les milieux d'essai.

La phase d'exposition ou d'absorption correspond au temps pendant lequel les poissons sont exposés à la substance d'essai.

Le taux d'ingestion des aliments (I) correspond à la quantité moyenne de nourriture consommée par chaque poisson chaque jour, relative au poids total moyen estimé du poisson (exprimé en g de nourriture/g de poisson/jour).

Le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k) est le rapport entre la constante cinétique d'absorption, k_1 , et la constante cinétique d'élimination, k_2 (soit k_1/k_2 – voir dans cette annexe les définitions correspondantes). En principe, la valeur doit être comparable au FBC_{ES} (voir la définition ci-dessus), mais des écarts sont possibles si l'état stationnaire est incertain ou si des corrections de la croissance ont été appliquées au FBC cinétique.

Le facteur de bioconcentration cinétique normalisé des lipides (FBC_{KL}) est normalisé par rapport à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 %.

Le facteur de bioconcentration cinétique normalisé des lipides, corrigé de la croissance (FBC_{kgL}) est normalisé par rapport à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 % et corrigé de la croissance en cours d'essai comme décrit à l'annexe 5.

Le facteur de bioconcentration à l'état stationnaire normalisé des lipides (FBC_{ESL}) est normalisé par rapport à un poisson présentant une teneur en lipides de 5 %.

Le coefficient de partage n-octanol/eau (K_{oe}) est le ratio de la solubilité d'un produit chimique dans le *n*-octanol et dans l'eau à l'équilibre [Lignes directrices de l'OCDE 107 (2), 117 (3), 123 (4)] ; il est aussi représenté par P_{oe} . Le logarithme de K_{oe} est utilisé comme indicateur du potentiel de bioaccumulation de la substance par les organismes aquatiques.

Le carbone organique particulaire (COP) est une mesure de la concentration de carbone provenant de sources organiques en suspension dans les milieux d'essai.

La microextraction en phase solide (MEPS) est une technique d'analyse réalisée sans solvant et développée pour les systèmes dilués. Avec cette méthode, une fibre polymère est exposée à la phase gazeuse ou liquide contenant la substance à analyser. En général, un temps d'analyse minimum est imposé de manière à ce que les conditions d'équilibre soient établies entre les phases solide et fluide, en fonction des espèces testées. Par la suite, la concentration de la substance à analyser peut être déterminée directement à partir de la fibre ou après l'avoir extraite de la fibre dans un solvant, en fonction de la technique de détermination utilisée.

Un état stationnaire est atteint sur la courbe représentant la concentration de la substance d'essai dans un poisson (C_p) par rapport au temps quand cette courbe devient parallèle à l'axe du temps et que les résultats de trois analyses successives de la C_p , réalisées sur des échantillons prélevés à au moins deux jours d'intervalle, ne s'écartent pas de plus de 20 % l'un de l'autre, et qu'on ne constate aucune augmentation notable de la C_p dans le temps entre la première et la dernière analyse successive. Les échantillons regroupés font l'objet d'au moins quatre analyses successives. Pour les substances d'essai qui sont absorbées lentement, il serait plus approprié de prendre des intervalles de sept jours.

La valeur du facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES}) ne varie pas de façon significative pendant une longue période, la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant étant constante pendant cette période (voir la définition de l'état stationnaire).

Le carbone organique total (TOC) est une mesure de la concentration de carbone provenant de toutes les sources organiques dans les milieux d'essai, y compris les sources particulières et dissoutes.

La constante cinétique d'absorption (k_1) est la valeur numérique qui représente la vitesse d'augmentation de la concentration de la substance d'essai dans ou sur les poissons testés (ou dans un tissu spécifié de ces derniers) lorsque les poissons sont exposés à cette substance (k_1 est exprimé en $L\ kg^{-1}\ jour^{-1}$).

Les substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexe et matières biologiques sont identifiés par l'abréviation UVCB.

Bibliographie

- (1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. et Plotzke K. (2009). Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5: 624-637.
- (2) OCDE (1995), *Essai n° 107: Coefficient de partage (n-octanol/eau): méthode par agitation en flacon*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 1, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264069633-fr](https://doi.org/10.1787/9789264069633-fr).
- (3) OCDE (2004), *Essai n° 117: Coefficient de partage (n-octanol/eau), méthode HPLC*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 1, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264069831-fr](https://doi.org/10.1787/9789264069831-fr).
- (4) OCDE (2006), *Essai n° 123 : Coefficient de partage (1-octanol/eau) : méthode du brassage lent*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 1, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264015869-fr](https://doi.org/10.1787/9789264015869-fr).

ANNEXE 2

**QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION
ADMISSIBLE**

Substance	Concentration maximale
Matières particulaires	5 mg/L
Carbone organique total	2 mg/L
Ammoniac non ionisé	1 µg/L
Chlore résiduel	10 µg/L
Pesticides organophosphorés totaux	50 ng/L
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	50 ng/L
Chlore organique total	25 ng/L
Aluminium	1 µg/L
Arsenic	1 µg/L
Chrome	1 µg/L
Cobalt	1 µg/L
Cuivre	1 µg/L
Fer	1 µg/L
Plomb	1 µg/L
Nickel	1 µg/L
Zinc	1 µg/L
Cadmium	100 ng/L
Mercure	100 ng/L
Argent	100 ng/L

ANNEXE 3

ESPÈCES DE POISSONS RECOMMANDÉES POUR L'ESSAI

Espèces recommandées	Gamme de températures recommandée durant l'essai (°C)	Longueur totale recommandée de l'animal testé (cm) ⁽²⁾
Danio rerio ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Danio zébré	20 – 25	3.0 ± 0.5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Tête-de-boule	20 – 25	5.0 ± 2.0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Carpe commune	20 – 25	8.0 ± 4.0 ⁽³⁾
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) Modaka	20 – 25	4.0 ± 1.0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20 – 25	3.0 ± 1.0
Lepomis macrochirus (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Crapet arlequin	20 – 25	5.0 ± 2.0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Truite arc-en-ciel	13 – 17	8.0 ± 4.0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Épinoche de rivière	18 – 20	3.0 ± 1.0

(1) Meyer *et al.* (1)

(2) Il est préférable durant l'essai proprement dit de privilégier le poids pour mesurer les écarts des constantes cinétiques de croissance. Néanmoins il est reconnu que la longueur est une mesure plus pratique si le poisson doit être sélectionné à vue au début d'une expérience (au sein du stock de poissons).

(3) Cette fourchette de longueurs est indiquée dans la loi japonaise sur les substances chimiques : Testing Methods for New Chemical Substances etc., based on the Japan's Chemical Substances Control Law (CSCL).

Plusieurs espèces estuariennes et marines ont été utilisées plus rarement, notamment :

Tambour croca	(<i>Leiostomus xanthurus</i>)
Fondule tête de mouton	(<i>Cyprinodon variegatus</i>)
Prêtre capucette	(<i>Menidia beryllina</i>)
Perche méné	(<i>Cymatogaster aggregata</i>)
Carlottin anglais	(<i>Parophrys vetulus</i>)
Chabot	(<i>Leptocottus armatus</i>)
Épinoche de rivière	(<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
Bar	(<i>Dicentracus labrax</i>)
Ablette	(<i>Alburnus alburnus</i>)

Les poissons d'eau douce mentionnés dans le tableau qui précède sont faciles à élever et/ou à se procurer tout au long de l'année, tandis que la disponibilité des espèces marines ou estuariennes est en partie limitée à leurs pays d'origine. Afin d'être en bonne santé et d'ascendance connue, les animaux à tester peuvent être élevés et se reproduire dans des fermes aquacoles ou en laboratoire, où ils sont protégés des maladies et des parasites. Ces poissons se trouvent dans beaucoup de parties du monde.

Bibliographie

- (1) Meyer A., Biermann C.H. et Orti G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method *Proc. R. Soc. Lond. B.* 252: 231-236.

ANNEXE 4

PROGRAMMES DE PRÉLÈVEMENT POUR LES ESSAIS D'EXPOSITION EN MILIEU AQUATIQUE ET PAR VOIE ALIMENTAIRE

1. Exemple théorique d'un programme de prélèvement pour un essai de bioconcentration avec exposition exclusivement en milieu aquatique pratiqué sur une substance dont le $\log K_{oc} = 4$.

Prélèvement de poissons	Programme de prélèvement		Nombre d'échantillons d'eau ⁽¹⁾	Nombre de poissons par échantillon ⁽¹⁾
	Fréquence minimale requise (jours) ⁽²⁾	Prélèvement supplémentaire (jours) ⁽²⁾		
Phase d'absorption				
1	-1 0		2 ⁽³⁾ (2)	4 ⁽⁴⁾ (3 ⁽⁶⁾)
2	0.3	0.4	2 (2)	4 (4)
3	0.6	0.9	2 (2)	4 (4)
4	1.2	1.7	2 (2)	4 (4)
5	2.4	3.3	2 (2)	4 (4)
6	4.7		2	4 – 8 ⁽⁵⁾ (3 ⁽⁶⁾)
Phase d'élimination				Transférer les poissons dans une eau dépourvue de la substance d'essai
7	5.0	5.3	2	4 (4)
8	5.9	7.0	2	4 (4)
9	9.3	11.2	2	4 (4)
10	14.0	17.5	2	4 – 8 ⁽⁵⁾ (4+3 ⁽⁶⁾)
TOTAL				40 – 72 (48 – 80) ⁽⁵⁾

- (1) Les valeurs entre parenthèses correspondent au nombre d'échantillons (eau, poissons) à prélever lors d'un éventuel prélèvement supplémentaire.
- (2) L'estimation avant l'essai du k_2 d'une substance dont le $\log K_{oe} = 4$ s'élève à 0,652 jours⁻¹. La durée totale de l'expérience est fixée à $3 \times t_{ES}$, soit $3 \times 4,6$ jours = 14 jours. L'estimation de t_{ES} est présentée à l'annexe 5.
- (3) Prélever un échantillon d'eau après que l'équivalent du volume d'au moins trois enceintes ait été versé.
- (4) Ces poissons sont prélevés dans le stock de poisson.
- (5) Si une précision accrue ou des études de métabolisme sont requises, nécessitant plus de poissons, ces poissons devront être prélevés en particulier à la fin des phases d'absorption et de dépuration (voir paragraphe 40).
- (6) Au moins trois poissons supplémentaires pourront être nécessaires pour analyser la teneur en lipides s'il n'est pas possible d'utiliser les poissons prélevés pour mesurer les concentrations de la substance au début de l'essai, à la fin de la phase d'absorption et à la fin de la phase d'élimination. Il convient de noter qu'il devrait être possible dans de nombreux cas d'utiliser seulement les trois poissons témoins (voir paragraphe 56).

2. Exemple théorique d'un programme de prélèvement pour un essai de bioaccumulation de la substance par voie alimentaire avec des phases d'absorption et d'élimination de respectivement 10 et 42 jours.

Prélèvement de poissons	Programme de prélèvement		Nombre d'échantillons de nourriture	Nombre de poissons par échantillon	
	Jour de la phase	Prélèvements supplémentaires ?		Groupe d'essai	Groupe témoin
Phase d'absorption					
1	0	Possible ⁽¹⁾⁽²⁾	3 – groupe d'essai 3 – groupe témoin ⁽¹⁾	0	5 – 10 (8 – 13) ⁽²⁾
1A ⁽³⁾	1-3			5 – 10	5 – 10
2	10	Oui ⁽⁴⁾	3 – groupe d'essai 3 – groupe témoin ⁽¹⁾	10 – 15 ⁽⁴⁾ (13 – 18) ⁽⁵⁾	5 – 10 (8 – 13) ⁽⁵⁾
Phase d'élimination					
3	1	Oui ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
4	2			5 – 10	5 – 10
5	4			5 – 10	5 – 10
6	7	Oui ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
7	14			5 – 10	5 – 10
8	28			5 – 10	5 – 10
9	42	Oui ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾ (13 – 18) ⁽⁵⁾	5 – 10 (8 – 13) ⁽⁵⁾
TOTAL				59 – 120 (63 – 126) ^(4,5)	50 – 110 (56 – 116) ^(4,5)

- (1) Trois échantillons de nourriture des groupes témoin et d'essai sont analysés pour mesurer les concentrations de la substance d'essai et la teneur en lipides.
- (2) Les poissons sont prélevés du stock le plus tard possible avant le début de l'étude ; au moins trois poissons du stock sont prélevés au début de l'essai pour mesurer la teneur en lipides.
- (3) Le prélèvement (facultatif) au début de la phase d'absorption fournit les données nécessaires pour calculer l'assimilation de la substance d'essai ingérée par voie alimentaire, que l'on peut comparer au rendement d'assimilation calculé à partir des données obtenues lors de la phase d'élimination.

- (4) On peut prélever cinq poissons supplémentaires pour l'analyse de tissus spécifiques.
- (5) Au moins trois poissons supplémentaires pourront être nécessaires pour analyser la teneur en lipides s'il n'est pas possible d'utiliser les poissons prélevés pour mesurer les concentrations de la substance au début de l'essai, à la fin de la phase d'absorption et à la fin de la phase d'élimination. Il convient de noter qu'il devrait être possible dans de nombreux cas d'utiliser seulement les trois poissons témoins (voir paragraphes 56 et 153).

Note concernant la durée des phases et les temps d'échantillonnage : la phase d'absorption commence avec l'administration de la première ration enrichie. Le premier jour de l'essai commence avec la première administration de nourriture et se termine juste avant la suivante, 24 heures plus tard. Le premier prélèvement (1 dans le tableau) devrait intervenir juste avant la première administration de nourriture (une heure avant par exemple). Idéalement, il faudrait chaque fois prélever les poissons juste avant la ration du jour suivant (soit environ 23 heures après la dernière ration). La phase d'absorption prend fin juste avant la première administration de la nourriture non enrichie, quand la phase d'élimination commence (il est probable que les poissons du groupe d'essai digèrent encore les aliments enrichis dans les 24 heures suivant la dernière administration de nourriture enrichie). Autrement dit, le dernier prélèvement de la phase d'absorption intervient juste avant la première ration non enrichie, et le premier prélèvement de la phase d'élimination intervient environ 23 heures après la première ration non enrichie.

ANNEXE 5

CALCULS GÉNÉRAUX

1. Introduction
2. Prédiction de la durée
- 3.
4. Méthode séquentielle : détermination de la constante cinétique d'élimination (de perte) k_2
5. Méthode séquentielle : détermination de la constante cinétique d'absorption k_1 (méthode d'exposition en milieu aquatique uniquement)
6. Méthode simultanée de calcul des constantes cinétiques d'absorption et d'élimination (perte) (méthode d'exposition en milieu aquatique uniquement)
7. Correction de l'effet de dilution par la croissance pour le FBC cinétique
8. Normalisation des lipides à 5 % de la teneur en lipides (méthode d'exposition en milieu aquatique uniquement)

1. Introduction

Le modèle général de bioaccumulation en milieu aquatique chez le poisson peut être décrit en termes de processus d'absorption et de perte, en ignorant l'absorption par voie alimentaire. L'équation différentielle (dC_p/dt) qui décrit la vitesse de modification de la concentration dans le poisson ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$) est donnée avec (1) :

$$\frac{dC_p}{dt} = k_1 \times C_e - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_p \quad [\text{Équation A5.1}]$$

Où k_1 = Constante cinétique du premier ordre pour l'absorption de la substance chez le poisson ($\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$).

k_2 = Constante cinétique du premier ordre pour l'élimination de la substance chez le poisson (jour^{-1}).

k_g = Constante cinétique du premier ordre pour la croissance du poisson (effet de dilution par la croissance) (jour^{-1})

k_m = Constante cinétique du premier ordre pour la transformation métabolique (jour^{-1})

k_e = Constante cinétique du premier ordre pour l'égestion des excréments (jour^{-1})

C_e = Concentration dans l'eau ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

C_p = Concentration dans le poisson ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de poids frais).

S'agissant de substances bioaccumulables, on peut s'attendre à ce qu'une moyenne pondérée par rapport au temps soit la concentration d'exposition dans l'eau (C_e) la plus pertinente au sein de la fourchette de fluctuations autorisée (voir paragraphe 24). Il est recommandé de calculer une moyenne pondérée par rapport au temps de la concentration dans l'eau en suivant les instructions données à l'annexe 6 de la LD 211 de l'OCDE (2). Notons que le ln-transformation de la concentration dans l'eau est approprié quand on s'attend à un déclin exponentiel entre les périodes de renouvellement, par exemple dans des conditions d'essai semi-statiques. Avec un système dynamique, le ln-transformation des concentrations d'exposition n'est pas forcément nécessaire. Si on obtient une moyenne pondérée par rapport au temps de la concentration dans l'eau, il convient de la consigner et de l'utiliser dans les calculs suivants.

Dans un essai FBC type réalisé chez des poissons, l'absorption et l'élimination peuvent être décrites en termes de deux processus cinétiques de premier ordre.

$$\text{Cinétique d'absorption} = k_1 \times C_e \quad [\text{Équation A5.2}]$$

$$\text{Cinétique d'élimination globale} = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_p \quad [\text{Équation A5.3}]$$

À l'état stationnaire, en supposant que le développement et le métabolisme sont négligeables (les valeurs pour k_g et k_m ne peuvent pas être distinguées de zéro), la cinétique d'absorption est égale à la cinétique d'élimination, et donc en combinant les équations A5.2 et A5.3 on obtient la relation suivante :

$$\text{FBC} = \frac{C_{p-ES}}{C_{e-ES}} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Équation A5.4}]$$

Où C_{p-ES} = Concentration dans le poisson à l'état stationnaire (mg kg^{-1} du poids frais).

C_{e-ES} = Concentration dans l'eau à l'état stationnaire (mg l^{-1}).

Le ratio de k_1/k_2 correspond au FBC cinétique (FBC_k) et devrait être égal au FBC à l'état stationnaire (FBC_{ES}) obtenu à partir du rapport entre la concentration à l'état stationnaire dans le poisson et la concentration à l'état stationnaire dans l'eau, mais des écarts sont possibles si l'état stationnaire est incertain ou si des corrections de la croissance ont été appliquées au FBC cinétique. Néanmoins, k_1 et k_2 étant des constantes, il n'est pas nécessaire que l'état stationnaire soit atteint pour obtenir un FBC_k .

Fondée sur ces équations du premier ordre, cette annexe 5 présente les calculs généraux nécessaires pour les deux méthodes de bioaccumulation, avec exposition en milieu aquatique et exposition par voie alimentaire. Les sections 5, 6 et 8 sont uniquement pertinentes pour la méthode d'exposition en milieu aquatique, mais ont été incluses ici parce qu'elles relèvent de techniques « générales ». Les méthodes en mode séquentiel (sections 4 et 5) et simultané (section 6) permettent de calculer les constantes d'absorption et d'élimination qui servent à obtenir les FBC cinétiques. Utilisée pour déterminer k_2 (section 4), la méthode séquentielle est importante pour l'exposition par voie alimentaire, puisqu'elle aide à calculer à la fois le rendement d'assimilation et le FBA. L'annexe 7 détaille les calculs spécifiques à la méthode d'exposition par voie alimentaire.

2. Prédiction de la durée de la phase d'absorption

Avant de commencer l'essai, on peut estimer k_2 et, par conséquent, un certain pourcentage du temps requis pour atteindre l'état stationnaire, à partir des relations empiriques entre k_2 et le coefficient de partage n-octanol/eau (K_{oe}) ou k_1 et le FBC. Il convient toutefois de tenir compte du fait que les

équations présentées dans cette section s'appliquent uniquement quand l'absorption et l'élimination sont régies par une cinétique du premier ordre. Si cela n'est manifestement pas le cas, il est conseillé de demander l'avis d'un biostatisticien et/ou d'un pharmacocinéticien, pour savoir si des prédictions de la durée de la phase d'absorption sont souhaitables.

Plusieurs méthodes permettent d'estimer k_2 (jour⁻¹). Par exemple, on pourra utiliser en premier lieu les relations empiriques suivantes³⁴ :

$$\log k_2 = 1.47 - 0.414 \log K_{oe} \quad (r^2=0.95) \quad [(3) ; \text{équation A5.5}]$$

ou

$$k_2 = \frac{k_1}{\text{FBC}} \quad [\text{Équation A5.6}]$$

$$\text{Où } k_1 = 520 \times P^{-0.32} \text{ (pour les substances de } \log K_{oe} > 3) \quad (r^2=0.85) \quad [(4) ; \text{équation A5.7}]$$

$$\text{Et FBC} = 10^{(0.910 \cdot \log K_{oe} - 1.975 \cdot \log(6.8 \cdot 10^{-7} K_{oe} + 1) - 0.786)} \quad (r^2=0.90) \quad [(5) ; \text{équation A5.8}]$$

P = poids moyen du poisson traité (en grammes de poids frais) à la fin de l'absorption/au début de l'élimination³⁵

Pour d'autres relations associées, voir (6). Il peut être avantageux d'employer des modèles plus complexes pour estimer k_2 si, par exemple, il est probable qu'un métabolisme notable intervienne (7) (8). Néanmoins, en raison de la complexité accrue du modèle, on veillera à accorder une attention particulière à l'interprétation des prédictions. Ainsi, la présence de groupes nitro pourrait indiquer un métabolisme rapide, mais ce n'est pas toujours le cas. Aussi l'utilisateur doit-il considérer les résultats de la méthode prédictive au regard de la structure chimique et de toute autre information pertinente (notamment des résultats des études préliminaires) pour programmer une étude.

Le temps nécessaire pour atteindre un certain pourcentage de l'état stationnaire peut être déduit, en appliquant l'estimation de k_2 , de l'équation cinétique générale qui décrit l'absorption et l'élimination (cinétique du premier ordre), en supposant que le développement et le métabolisme sont négligeables. En cas de développement substantiel durant l'étude, les estimations décrites ci-dessous ne seront pas fiables. Il est alors préférable d'utiliser la k_{2g} corrigée de la croissance (voir la section 7 de cette annexe) :

$$\frac{dC_p}{dt} = k_1 C_e - k_2 C_p \quad [\text{Équation A5.9}]$$

ou, si C_e est constante :

$$C_p = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_e (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Équation A5.10}]$$

Lorsqu'on se rapproche de l'état stationnaire ($t \rightarrow \infty$), l'équation A5.10 peut être réduite [voir (9) (10)] à :

$$C_p = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_e \quad [\text{Équation A5.11}]$$

(34) Comme pour toute relation empirique, il convient de vérifier que la substance d'essai tombe dans le domaine d'applicabilité de la relation.

(35) Le poids des poissons à la fin de la phase d'absorption peut être estimé en fonction des données d'une étude précédente ou des connaissances accumulées sur l'espèce d'essai, dont on sait qu'elle est susceptible de se développer à partir d'un poids au départ de l'essai habituel et sur une durée d'absorption habituelle (par exemple 28 jours).

ou

$$\frac{C_p}{C_e} = \frac{k_1}{k_2} = \text{FBC} \quad [\text{Équation A5.12}]$$

$\text{FBC} \times C_e$ est donc une approximation de la concentration dans le poisson à l'état stationnaire (C_{p-ES}). [Note : la même approche peut être utilisée pour estimer un FBA à l'état stationnaire lors d'un essai avec exposition par voie alimentaire. Dans ce cas, le FBC est remplacé par le FBA, et la C_e par la C_{alim} , la concentration dans les aliments, dans les équations ci-dessus.]

L'équation A5.10 peut être reformulée de la façon suivante :

$$C_p = C_{p-ES}(1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Équation A5.13}]$$

ou

$$\frac{C_p}{C_{p-ES}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Équation A5.14}]$$

En appliquant l'équation A5.14, le temps nécessaire à l'obtention d'un certain pourcentage de l'état stationnaire peut être prédit lorsque k_2 est estimée à l'avance à l'aide de l'équation A5.5 ou A5.6.

À titre d'orientation, la durée statistiquement optimale de la phase d'absorption, pour la production de données statistiquement acceptables (FBC_k), est la période requise pour que la courbe du logarithme de la concentration de la substance d'essai dans le poisson en fonction du temps atteigne au moins 50 % de l'état stationnaire (soit $0.69/k_2$), mais pas plus de 95 % de l'état stationnaire (soit $3.0/k_2$) (11). Si l'accumulation dépasse 95 % de l'état stationnaire, le calcul d'un FBC_{ES} devient faisable.

Le temps nécessaire pour atteindre 80 % de l'état stationnaire est égal à (en utilisant l'équation A5.14) :

$$0.80 = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Équation A5.15}]$$

ou

$$t_{80} = \frac{-\ln(0.20)}{k_2} = \frac{1.6}{k_2} \quad [\text{Équation A5.16}]$$

De même, le temps pour atteindre 95 % de l'état stationnaire est donné par :

$$t_{95} = \frac{-\ln(0.05)}{k_2} = \frac{3.0}{k_2} \quad [\text{Équation A5.17}]$$

À titre d'exemple, la durée de la phase d'absorption (soit le temps nécessaire à l'obtention d'un certain pourcentage de l'état stationnaire, par exemple t_{80} ou t_{95}) d'une substance d'essai dont le $\log K_{oe} = 4$ atteindrait (en appliquant les équations A5.5, A5.16 et A5.17) :

$$\log k_2 = 1.47 - 0.414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0.652 \text{ jour}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1.6}{0.652} = 2.45 \text{ jours (59 heures)}$$

ou $t_{95} = \frac{3.0}{0.652} = 4.60 \text{ jours (110 heures)}$

Sinon, la formule suivante

$$t_{eES} = 6.54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{oe} + 55.31 \text{ (heures)} \quad [\text{Équation A5.18}]$$

peut être utilisée pour calculer le temps nécessaire pour que l'état stationnaire réel (t_{eES}) soit atteint (12). Pour une substance d'essai dont le $\log K_{oe} = 4$ cela donne :

$$t_{eES} = 6.54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55.31 = 121 \text{ heures}$$

3. Prédiction de la durée de la phase d'élimination

Une prédiction du temps requis pour ramener la charge corporelle à un certain pourcentage de la concentration initiale peut aussi être obtenue à partir de l'équation générale qui décrit l'absorption et l'élimination (en supposant une cinétique du premier ordre, voir l'équation A5.9 (1) (13).

En ce qui concerne la phase d'élimination, C_e (ou C_{alim} pour l'essai avec exposition par voie alimentaire) est supposée être nulle. L'équation peut donc être réduite à :

$$\frac{dC_p}{dt} = k_2 C_p \quad [\text{Équation A5.19}]$$

ou

$$C_p = C_{p,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad [\text{Équation A5.20}]$$

où $C_{p,0}$ est la concentration au début de la période d'élimination.

t_{50} correspond au moment où l'élimination aura atteint 50 % :

$$\frac{C_p}{C_{p,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

ou

$$t_{50} = \frac{-\ln(0.50)}{k_2} = \frac{0.693}{k_2}$$

De même, l'élimination s'élèvera à 95 % à t_{95} :

$$t_{95} = \frac{-\ln(0.05)}{k_2} = \frac{3.0}{k_2}$$

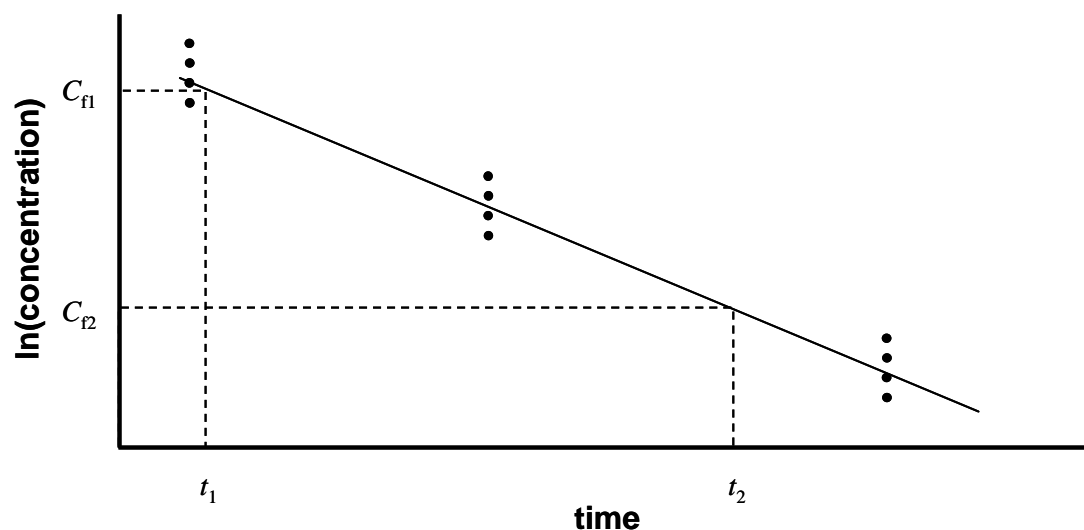
Si on adopte 80 % d'absorption pour la première phase ($1.6/k_2$) et une perte de 95 % pour la phase d'élimination ($3.0/k_2$), alors la phase d'élimination vaut approximativement le double de la phase d'absorption.

Il convient de noter que les estimations reposent sur l'hypothèse suivant laquelle les processus d'absorption et d'élimination sont régis par une cinétique du premier ordre. Si ces processus n'obéissent manifestement pas à une cinétique du premier ordre, ces estimations ne sont pas valides.

4. Méthode séquentielle : détermination de la constante cinétique d'élimination (de perte) k_2

On a fait l'hypothèse que la plupart des données concernant la bioconcentration étaient « raisonnablement » bien décrites par un modèle simple à deux compartiments/deux paramètres,

comme le montre la courbe rectiligne qui relie approximativement les points représentant la concentration dans le poisson (sur un graphique logarithmique), pendant la phase d'élimination.



Légende

ln(concentration)

C_{p1}

C_{p2}

temps

Remarquons que les écarts à la droite peuvent résulter d'un processus d'élimination plus complexe que celui régi par une cinétique du premier ordre. La méthode graphique peut être mise à profit pour traiter les processus d'élimination qui s'écartent d'une cinétique du premier ordre.

Pour calculer k_2 pour des temps de prélèvement multiples, il convient de réaliser une régression linéaire de ln(concentration) par rapport au temps. La pente de la droite de régression est une estimation de la constante cinétique d'élimination k_2 ³⁶. À partir de l'ordonnée à l'origine, la concentration moyenne dans le poisson au début de la phase d'élimination ($C_{0,d}$; qui est égale à la concentration moyenne dans le poisson à la fin de la phase d'absorption) peut être facilement calculée (y compris les marges d'erreur)⁽³⁶⁾ :

$$C_{0,d} = e^{\text{ordonn}} \quad [\text{Équation A5.21}]$$

Pour calculer k_2 quand seulement deux temps de prélèvement sont disponibles (comme dans le concept d'essai réduit), il convient de substituer les deux concentrations moyennes dans l'équation suivante :

$$k_2 = \frac{\ln(C_{p1}) - \ln(C_{p2})}{t_2 - t_1} \quad [\text{Équation A5.22}]$$

Où $\ln(C_{p1})$ et $\ln(C_{p2})$ sont les logarithmes naturels des concentrations aux temps t_1 et t_2 , respectivement, et t_2 et t_1 correspondent aux temps auxquels les deux prélèvements ont été réalisés par rapport au début de l'élimination³⁷.

(36) Dans la plupart des programmes qui permettent une régression linéaire, même les erreurs types et l'intervalle de confiance (IC) des estimations sont donnés, par exemple dans Microsoft Excel avec la commande Analyse des données.

(37) Contrairement à la méthode de régression linéaire, cette formule ne produira pas d'erreur type pour k_2 .

5. Méthode séquentielle : détermination de la constante cinétique d'absorption k_1 (méthode d'exposition en milieu aquatique uniquement)

Pour trouver une valeur pour k_1 d'après un ensemble de valeurs séquentielles de la concentration en fonction du temps pour la phase d'absorption, il est nécessaire d'utiliser un programme informatique qui corresponde au modèle suivant :

$$C_p(t) = C_e(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Équation A5.23}]$$

Où k_2 est donnée par le calcul précédent, $C_p(t)$ et $C_e(t)$ sont les concentrations dans le poisson et dans l'eau, respectivement, au temps t .

Pour calculer k_1 quand seulement deux temps de prélèvement sont disponibles (comme dans le concept d'essai réduit), il convient d'utiliser la formule suivante :

$$k_1 = \frac{C_p \cdot k_2}{C_e(1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{Équation A5.24}]$$

Où k_2 est donnée par le calcul précédent, C_p est la concentration dans le poisson au début de la phase d'élimination, et C_e est la concentration moyenne dans l'eau durant la phase d'absorption³⁸.

Pour évaluer la justesse de l'ajustement, on peut procéder à une inspection visuelle des pentes k_1 et k_2 par rapport aux données mesurées aux temps de prélèvement portées sur le graphique. S'il apparaît que la méthode séquentielle fournit une mauvaise estimation pour k_1 , il convient d'appliquer la méthode simultanée pour calculer k_1 et k_2 (voir la section 6 ci-après). Une nouvelle fois, pour évaluer la justesse de l'ajustement, il est nécessaire de comparer visuellement les pentes obtenues aux données mesurées portées sur le graphique. Si l'ajustement n'est toujours pas satisfaisant, cela peut signifier que la cinétique du premier ordre ne s'applique pas et qu'il convient d'utiliser des modèles plus complexes.

6. Méthode simultanée de calcul des constantes cinétiques d'absorption et d'élimination (perte) (méthode d'exposition en milieu aquatique uniquement)

Il est possible d'utiliser des programmes informatiques afin de calculer des valeurs pour k_1 et k_2 d'après un ensemble de valeurs séquentielles de la concentration en fonction du temps et le modèle :

$$C_p = C_e \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{Équation A5.25}]$$

$$C_p = C_e \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{Équation A5.26}]$$

où t_c représente le temps à la fin de la phase d'absorption.

Cette approche fournit directement des erreurs types pour les estimations de k_1 et k_2 . Si k_1/k_2 est substituée par le FBC (voir l'équation A5.4) dans les équations A5.25 et A5.26, il est possible d'estimer également l'erreur type et l'intervalle de confiance de 95 % du FBC. Cela est particulièrement utile pour comparer des estimations différentes résultant d'une évolution des données. La variable dépendante (concentration dans le poisson) peut être ajustée avec ou sans ln transformation, et l'incertitude quant au FBC obtenu peut être évaluée.

(38) Contrairement à une procédure d'ajustement linéaire, cette méthode ne produit habituellement aucune erreur type ni aucun intervalle de confiance pour la k_1 estimée.

En raison de la forte corrélation entre les deux paramètres k_1 et k_2 , s'ils ont été estimés simultanément, on conseille éventuellement de calculer d'abord k_2 à partir des seuls résultats de l'élimination (voir précédemment) ; dans la plupart des cas, k_2 peut être estimé à partir de la courbe d'élimination avec une précision relativement élevée. Par la suite, k_1 peut être calculée à partir des données d'absorption avec une régression non-linéaire³⁹. Il est conseillé de transformer les données de la même façon en cas d'ajustement séquentiel.

Pour évaluer la justesse de l'ajustement, on peut procéder à une inspection visuelle des pentes obtenues en portant sur un graphique les données mesurées aux temps de prélèvement. S'il apparaît que cette méthode fournit une mauvaise estimation pour k_1 , il convient d'appliquer l'autre méthode pour calculer k_1 et k_2 . Une nouvelle fois, pour évaluer la justesse de l'ajustement, il faudrait comparer visuellement le modèle ajusté aux données mesurées portées sur le graphique, et les estimations des paramètres pour k_1 , k_2 et le FBC obtenu ainsi que leurs erreurs types et/ou les intervalles de confiance doivent être comparés selon différents types d'ajustement.

Si l'ajustement n'est toujours pas satisfaisant, cela peut signifier que la cinétique du premier ordre ne s'applique pas et qu'il convient d'utiliser des modèles plus complexes. L'une des complications les plus fréquentes est le développement des poissons durant l'essai.

7. Correction de l'effet de dilution par la croissance pour le FBC cinétique et le FBA

Cette section décrit une méthode standard pour corriger les données en fonction du développement des poissons en cours d'essai (autrement dit en fonction de l'effet de dilution par la croissance) qui est uniquement valide quand la cinétique du premier ordre s'applique. Quand il apparaît que la cinétique du premier ordre ne s'applique pas, il est recommandé de demander conseil à un biostatisticien pour bien corriger les données de l'effet de dilution par la croissance ; on peut aussi appliquer la méthode fondée sur la masse décrite ci-après.

Dans certains cas, cette méthode de correction de l'effet de dilution par la croissance manque de précision ou ne fonctionne pas (par exemple, pour des substances s'éliminant très lentement testées chez des poissons à croissance rapide, la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance, k_{2g} , peut être très faible, aussi toute erreur commise dans les deux constantes cinétiques servant à la calculer est-elle cruciale, et dans certains cas la k_g estimée peut être supérieure à k_2). Il est alors possible d'utiliser une autre méthode (approche massique), qui évite d'apporter toute correction et fonctionne aussi en l'absence de cinétique du premier ordre. Cette méthode est présentée à la fin de cette section.

Méthode de correction de la croissance par soustraction de la constante cinétique de croissance

Selon la méthode standard, les poids et les longueurs individuels sont convertis en logarithmes naturels, et $\ln(\text{poids})$ ou $\ln(1/\text{poids})$ sont tracés sur deux graphiques distincts, pour le groupe témoin et le groupe d'essai, en fonction du temps (jour). On procède de même avec les données obtenues séparément pour les phases d'absorption et d'élimination. En général, pour corriger de l'effet de dilution par la croissance, il est plus approprié d'utiliser les poids de l'ensemble de l'étude pour obtenir la constante cinétique de croissance (k_g), mais des écarts notables sur un plan statistique entre les constantes cinétiques de croissance obtenues pour la phase d'absorption et la phase d'élimination peuvent indiquer qu'il convient d'employer la constante cinétique de la phase d'élimination. Les taux de croissance globaux observés lors des études avec exposition en milieu aquatique pour les groupes témoin et d'essai peuvent servir à contrôler les effets associés à tout traitement.

(39) Il convient de tenir compte du fait que l'incertitude quant à la k_2 estimée n'est pas utilisée convenablement dans le modèle de bioaccumulation alors qu'elle est surtout considérée comme constante quand on ajuste k_1 avec la méthode en mode séquentiel. L'incertitude quant au FBC obtenue sera donc différente selon qu'on appliqué la méthode d'ajustement simultanée ou séquentiel.

Une corrélation des moindres carrés linéaires est calculée pour $\ln(\text{poids des poissons})$ en fonction du temps (jour) (pour $\ln(1/\text{poids})$ en fonction du temps) pour chaque groupe (groupes d'essai et témoin, données individuelles, moyennes non journalières) pour l'ensemble de l'étude, les phases d'absorption et d'élimination en appliquant les méthodes statistiques standard. Les écarts des pentes des droites sont calculés et utilisés pour évaluer l'importance statistique ($p = 0.05$) de la différence entre les pentes (constantes cinétiques de croissance) à partir du test t (ou d'une ANOVA si plus d'une concentration est testée). On préfère en général utiliser les données sur le poids pour les corrections de la croissance. Les longueurs, traitées de la même façon, peuvent servir à comparer les effets du traitement sur les groupes témoin et d'essai. Si on ne constate aucune différence statistiquement notable lors de l'analyse des poids mesurés, on peut regrouper les données des groupes témoin et d'essai et calculer une constante cinétique de croissance du poisson globale pour l'étude (k_g) à savoir la pente globale de la corrélation linéaire. Si on observe des écarts statistiquement notables, on consignera séparément les constantes cinétiques de croissance pour chaque groupe de poissons, et/ou chaque phase de l'essai. La constante cinétique pour chaque groupe traité est alors utilisée pour les corrections de l'effet de dilution par la croissance pour ce groupe. Si on constate des différences statistiques entre les constantes cinétiques d'absorption et d'élimination, il convient d'utiliser les constantes cinétiques tirées de la phase d'élimination.

La constante cinétique de croissance calculée (k_g exprimée en fonction de jour^{-1}) peut être soustraite de la constante cinétique d'élimination globale (k_2) pour donner la constante cinétique d'élimination, k_{2g} .

$$k_{2g} = k_2 - k_g \quad [\text{Équation A5.27}]$$

On divise la constante cinétique d'absorption par la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance pour obtenir le FBC cinétique corrigé de l'effet de dilution par la croissance, représenté par FBC_{k_g} (ou FBA_{k_g}).

$$\text{FBC}_{k_g} = \frac{k_1}{k_{2g}} \quad [\text{Équation A5.28}]$$

La constante cinétique de croissance obtenue pour un essai avec exposition par voie alimentaire est utilisée dans l'équation A7.5 pour calculer le FBA_{k_g} corrigé de la croissance (voir annexe 7).

Méthode de correction de la croissance fondée sur la masse

Il est possible d'utiliser une autre méthode que celle par soustraction de la constante cinétique de croissance, décrite précédemment, pour contourner la nécessité d'une correction de la dilution par la croissance. Le principe consiste à utiliser les données relatives à l'élimination en fonction de la masse par poisson entier et non en fonction de la concentration.

- Convertir les concentrations observées dans les tissus lors de la phase d'élimination (masse de la substance d'essai/unité de masse du poisson) en masse de substance d'essai/poisson : mettre en parallèle, sous forme de tableau, les concentrations et les poids de chaque poisson (par exemple en utilisant un tableur informatique) et multiplier chaque concentration par le poids total du poisson pour que cette mesure donne un ensemble de masse de la substance d'essai/poisson pour tous les prélèvements de la phase d'élimination.
- Tracer le logarithme naturel obtenu avec les données de la masse de la substance chimique en fonction du temps (phase d'élimination) comme on le ferait normalement.
- Pour la méthode d'exposition en milieu aquatique, calculer la constante cinétique d'absorption comme d'habitude (voir sections 4 et 6 ; noter que la valeur k_2 « normale » est utilisée dans les équations d'ajustement de la courbe pour k_1) et déduire la constante cinétique d'élimination des données ci-dessus. La valeur obtenue pour la constante cinétique

d'élimination étant indépendante de la croissance, puisqu'elle découle d'une base massique par poisson entier, il convient de la représenter par k_{2g} et non par k_2 .

8. Normalisation des lipides à 5 % de la teneur en lipides (méthode d'exposition en milieu aquatique uniquement)

Les résultats du FBC (cinétique et à l'état stationnaire) des essais par exposition en milieu aquatique sont aussi consignés en fonction d'une teneur en lipides par défaut de 5 % du poids frais des poissons, sauf si l'on peut prouver que la substance d'essai ne s'accumule pas prioritairement dans les lipides (par exemple certaines substances perfluorées peuvent se lier aux protéines). Il convient de convertir les concentrations dans les poissons, ou le FBC, en une teneur en lipide de 5 % par rapport au poids frais. Si les mêmes poissons ont été utilisés pour mesurer les concentrations de la substance et les teneurs en lipides à tous les temps d'échantillonnage, il est nécessaire de corriger les concentrations mesurées individuellement en fonction de la teneur en lipides des poissons.

$$C_{p,L} = \frac{0.05}{L} \cdot C_p \quad [\text{Équation A5.29}]$$

Où $C_{p,L}$ = concentration dans le poisson normalisée par rapport aux lipides (mg kg⁻¹ du poids frais)

L = fraction lipidique (basée sur le poids frais)

C_p = concentration de la substance d'essai dans le poisson (mg kg⁻¹ du poids frais)

Si une analyse lipidique n'a pas été menée sur tous les poissons prélevés, on utilisera une valeur lipidique moyenne pour normaliser le FBC. S'agissant du FBC à l'état stationnaire, il convient d'utiliser la valeur moyenne enregistrée à la fin de la phase d'absorption dans le groupe testé. Quant à la normalisation du FBC cinétique il est parfois justifié d'appliquer une méthode différente, par exemple si la teneur en lipides a sensiblement changé pendant la phase d'absorption ou d'élimination. Cependant, il est conseillé de prévoir une ration alimentaire qui réduise au maximum tout changement spectaculaire de la teneur en lipides.

$$\text{FBC}_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot \text{FBC}_K \quad [\text{Équation A5.30}]$$

Où FBC_{KL} = FBC cinétique normalisé par rapport aux lipides (L kg⁻¹)

L_n = fraction lipidique moyenne (basée sur le poids frais)

FBC_K = FBC cinétique (L kg⁻¹)

Bibliographie

- (1) Arnot J.A. et Gobas F.A.P.C. (2004). A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343–2355.
- (2) OCDE (2008), *Essai n° 211: Daphnia magna, essai de reproduction*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, Éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264070134-fr](https://doi.org/10.1787/9789264070134-fr).
- (3) Spacie A. et Hamelink J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 309-320.
- (4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. et Opperhuizen A. (1995). Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (5) Bintein S., Devillers J. et Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.

- (6) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Danemark.
- (7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. et Boethling R.S. (2009). A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (8) OCDE (2011). QSAR Toolbox 2.1. Février 2011. Disponible à l'adresse : http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. et Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. *T. Am. Fish. Soc.* 104: 785-792.
- (10) Ernst W. (1985). Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., et al., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, États-Unis : 243-255.
- (11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. et Sauerhoff M.W. (1977). Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. *Can. J. Chem. Eng.* 55: 614-622.
- (12) Hawker D.W. et Connell D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
- (13) Konemann H. et van Leeuwen K. (1980). Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere.* 9: 3-19.

ANNEXE 6

ÉQUATIONS RELATIVES À L'ESSAI PAR EXPOSITION EN MILIEU AQUATIQUE :
CONCEPT D'ESSAI RÉDUIT

Les raisons de cette approche tiennent du fait que le facteur de bioconcentration dans un essai complet peut être déterminé comme un facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES}) en calculant le rapport de la concentration de la substance d'essai dans les tissus du poisson à la concentration de la substance d'essai dans l'eau, ou en calculant le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_k), à savoir le rapport de la constante cinétique d'absorption k_1 à la constante cinétique d'élimination k_2 . Le FBC_k est valide même si une concentration à l'état stationnaire d'une substance chimique n'est pas atteinte durant l'absorption, à condition qu'absorption et élimination soient régies pour l'essentiel par des processus cinétiques de premier ordre.

Si on mesure la concentration de la substance chimique dans les tissus (C_{p1}) à la fin de l'exposition (t_1) et qu'on mesure cette concentration dans les tissus (C_{p2}) à nouveau après un certain temps (t_2), il est possible d'estimer la constante cinétique d'élimination (k_2) avec l'équation A5.22 de l'annexe 5.

La constante cinétique d'absorption, k_1 , peut ensuite être déterminée de manière algébrique avec l'équation A5.23 de l'annexe 5 (où C_p est égale à C_{p1} et t est égal à t_1) (1). Le facteur de bioconcentration cinétique pour le concept d'essai réduit (désigné par FBC_{km} pour le distinguer des facteurs de bioconcentration cinétiques déterminés avec d'autres méthodes) correspond ainsi à :

$$FBC_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Équation A6.1}]$$

Il convient de corriger les concentrations ou les résultats de l'effet de dilution par la croissance et de les normaliser par rapport à des poissons présentant une teneur en lipides de 5 % (voir annexe 5).

Le FBC_{ES} minimisé correspond au FBC calculé à la fin de la phase d'absorption, en supposant que l'état stationnaire a été atteint. On ne peut que le supposer, puisque le nombre de temps d'échantillonnage ne suffit pas à le prouver.

$$FBC_{ES} = \frac{C_{p-minES}}{C_{e-minES}} \quad [\text{Équation A6.2}]$$

Où $C_{p-minES}$ = Concentration dans le poisson à un état supposé stationnaire à la fin de l'absorption (mg kg^{-1} du poids frais).

$C_{e-minES}$ = Concentration dans l'eau à un état supposé stationnaire à la fin de l'absorption (mg L^{-1}).

Bibliographie

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. et Jaber M.J. (2008). Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.

ANNEXE 7

ÉQUATIONS RELATIVES À L'ESSAI AVEC EXPOSITION PAR VOIE ALIMENTAIRE

- 1.
2. **Exemples de techniques d'enrichissement de l'alimentation**
3. **Calcul du rendement d'assimilation et du facteur de bioamplification**
4. **Correction en fonction de la teneur en lipides**
5. **Évaluation des différences entre la concentration mesurée au temps 0 ($C_{0,m}$) et la concentration déduite au temps 0 ($C_{0,d}$)**
6. **Orientations pour les substances d'essai**

1. **Exemple de composition d'une nourriture pour poisson du commerce adaptée**

Composant	Part de l'alimentation
Protéines brutes	$\leq 55.0 \%$
Matière grasse brute	$\leq 15.0 \%$ ⁽¹⁾
Cellulose brute	$\geq 2.0 \%$
Humidité	$\geq 12 \%$
Cendres	$\geq 8 \%$

(1) Dans certaines régions, il est possible qu'on ne puisse obtenir uniquement de la nourriture pour poisson dont la teneur en lipides est très inférieure à ce plafond. Le cas échéant, il convient de réaliser un essai avec cette teneur en lipides plus faible, et d'ajuster la ration alimentaire pour maintenir les poissons en bonne santé. Il est préférable de ne pas augmenter artificiellement la teneur en lipides de l'alimentation en ajoutant trop d'huile.

2. **Exemples de techniques d'enrichissement de l'alimentation**

Généralités

- La nourriture témoin est préparée exactement de la même façon que la nourriture enrichie, mais sans ajout de la substance d'essai.
- Pour connaître les concentrations dans les aliments traités, il convient d'extraire trois échantillons de la ration alimentaire selon une méthode d'extraction adaptée, puis de mesurer la radioactivité ou la concentration de la substance d'essai dans ces échantillons. La possibilité d'isoler la substance d'essai à analyser (>85 %) ainsi que la faible variation entre

les échantillons (trois concentrations de la substance mesurées sur des échantillons prélevés au début de l'essai ne varient pas de plus de $\pm 15\%$ de la moyenne) sont démontrées.

- Au cours de l'essai avec exposition par voie alimentaire, il convient de collecter trois échantillons de nourriture au jour 0 et à la fin de la phase d'absorption pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans les aliments.

Préparation de la nourriture pour poisson avec une matière expérimentale liquide (pure)

On fixe une concentration d'essai nominale cible dans la nourriture traitée, par exemple 500 μg de substance d'essai/g de nourriture. La quantité appropriée (en fonction de la masse molaire ou radioactivité spécifique) de la substance d'essai pure est ajoutée à une masse connue de nourriture pour poisson dans un bocal en verre ou un ballon évaporateur rotatif. Il convient que la masse de nourriture suffise pour toute la durée de la phase d'absorption (prendre en compte la nécessité d'augmenter chaque ration en raison du développement des poissons). La nourriture pour poisson et la substance d'essai sont mélangées lentement pendant la nuit (par exemple au moyen d'un mixeur Roto-Rack ou, en cas d'utilisation d'un ballon évaporateur rotatif, par rotation). La nourriture enrichie est stockée dans des conditions qui maintiennent la stabilité de la substance d'essai au sein du mélange (par réfrigération par exemple) jusqu'à son utilisation.

Préparation de la nourriture pour poisson avec un véhicule (huile de poisson/germes de maïs)

Les substances d'essai solides sont pilées dans un mortier en une fine poudre. Les substances d'essai liquides peuvent être ajoutées directement à l'huile de poisson ou de germes de maïs. La substance d'essai est dissoute dans une quantité connue d'huile de poisson ou de germes de maïs (par exemple entre 5 à 15 ml). L'huile dosée est transférée dans un ballon d'évaporation rotatif de taille appropriée. La fiole utilisée pour préparer l'huile dosée est nettoyée avec deux petites aliquotes d'huile qu'on ajoute ensuite dans le ballon pour veiller à ce que toute la substance d'essai dissoute soit bien transférée. Afin de garantir la dissolution/dispersion complète dans l'huile (ou si plus d'une substance d'essai est utilisée durant l'essai), on ajoute un micro-agitateur et on bouche la fiole pour que le mélange puisse être agité rapidement pendant la nuit. On ajoute une quantité appropriée de nourriture pour poisson (habituellement sous forme de granulés) dans le ballon, et le contenu du ballon de verre est mélangé de façon homogène par rotation continue du ballon pendant au moins 30 minutes, mais de préférence pendant toute la nuit. La nourriture enrichie est ensuite stockée de manière adéquate (réfrigérée par exemple) pour assurer la stabilité de la substance d'essai dans la nourriture jusqu'à son utilisation.

Préparation de la nourriture pour poisson avec un solvant organique

Une quantité appropriée de la substance d'essai (en fonction de la masse molaire ou radioactivité spécifique) suffisante pour atteindre la dose cible est dissoute dans un solvant organique adéquat (par exemple cyclohexane ou acétone ; de 10 à 40 ml, ou un volume plus important si nécessaire, selon la quantité de nourriture à enrichir). Une aliquote, voire la totalité (ajoutée en plusieurs fois), de cette solution est mélangée à la masse appropriée de nourriture pour poisson, de façon à atteindre la dose nominale requise pour l'essai. On peut mélanger la nourriture pour poisson et la substance d'essai dans un récipient en acier inoxydable et laisser la nourriture fraîchement dosée dans ce récipient dans une hotte de laboratoire pendant deux jours (en agitant de temps en temps) pour permettre à l'excès de solvant de s'évaporer ; on peut aussi effectuer ce mélange dans un ballon évaporateur à rotation continue. Si besoin, l'excès de solvant peut être retiré au moyen d'un courant d'air ou d'azote. Il convient de veiller à ce que la substance d'essai ne cristallise pas lors du retrait du solvant. Il convient que la nourriture enrichie soit stockée dans des conditions (par réfrigération par exemple) qui maintiennent la stabilité de la substance d'essai au sein du mélange jusqu'à son utilisation.

3. Calcul du rendement d'assimilation et du facteur de bioamplification

Pour calculer le rendement d'assimilation, il convient tout d'abord d'estimer la constante cinétique d'élimination globale comme indiqué à la section 4 de l'annexe 5 (avec la méthode séquentielle, c'est-à-dire avec une régression linéaire standard) à partir des concentrations moyennes mesurées dans les échantillons prélevés lors de la phase d'élimination. La constante de la ration alimentaire, I , et la durée d'absorption, t , sont des paramètres connus de l'étude. C_{alim} , la concentration mesurée moyenne de la substance d'essai dans la nourriture, est une variable mesurée lors de l'étude. $C_{0,d}$, la concentration de la substance d'essai dans le poisson à la fin de la phase d'absorption, est habituellement donnée par l'ordonnée à l'origine sur le tracé de $\ln(\text{concentration})$ en fonction du jour d'élimination.

Le rendement d'assimilation de la substance chimique (α , absorption de la substance d'essai par voie intestinale) est calculé comme suit :

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{\text{alim}}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{Équation A7.1}]$$

Où $C_{0,d}$ = concentration dans le poisson obtenue au temps 0 de la phase d'élimination (mg kg^{-1}) ;

k_2 = constante cinétique d'élimination (non corrigée de la croissance) globale (jour^{-1}), calculée avec les équations présentées à l'annexe 5, section 3 ;

I = constante cinétique d'ingestion ($\text{g de nourriture g}^{-1}$ de poisson jour^{-1}) ;

C_{alim} = concentration dans la nourriture (mg kg^{-1} de nourriture) ;

t = durée de la période d'alimentation (jour).

Néanmoins, il peut s'avérer nécessaire d'ajuster la ration alimentaire, I , utilisée dans les calculs en fonction du développement des poissons pour donner un rendement d'assimilation, α , précis. Dans un essai où les poissons se développent de façon notable pendant la phase d'absorption (durant laquelle on ne corrige jamais la quantité de nourriture afin de maintenir la ration alimentaire fixée), la ration alimentaire réelle à mesure que la phase d'absorption progresse sera inférieure à celle fixée, donnant lieu à un rendement d'assimilation « réel » supérieur. (Cet aspect n'est pas important pour les calculs généraux du FBA, puisque les termes I s'annulent entre les équations A7.1 et A7.4). La ration alimentaire moyenne corrigée de l'effet de dilution par la croissance, I_g , peut être déduite de plusieurs façons, mais une méthode simple et rigoureuse consiste à utiliser la constante cinétique de croissance (k_g) connue pour estimer les poids des poissons testés à certains temps de la phase d'absorption, soit :

$$P_p(t) = P_{p,0} \times e^{-k_g \cdot t} \quad [\text{Équation A7.2}]$$

où $P_p(t)$ = poids moyen des poissons au jour t de la phase d'absorption

$P_{p,0}$ = poids moyen des poissons au début de l'expérience

De cette manière (au moins), on peut estimer le poids moyen des poissons au dernier jour d'exposition ($P_{p,\text{fin-absorption}}$). La ration alimentaire ayant été fixée par rapport à $P_{p,0}$, la ration alimentaire réelle pour chaque jour d'absorption peut être calculée en utilisant ces deux valeurs relatives au poids. La ration alimentaire corrigée de la croissance, I_g ($\text{g de nourriture g}^{-1}$ de poisson jour^{-1}), qu'il convient d'utiliser à la place de I en cas de développement rapide durant la phase d'absorption, peut ensuite être calculée avec :

$$I_g = \frac{I \times P_{p,0}}{P_{p,\text{fin-absorption}}} \quad [\text{Équation A7.3}]$$

Une fois le rendement d'assimilation obtenu, on peut calculer le FBA en le multipliant par la constante de la ration alimentaire I (ou I_g , si cette dernière a servi à calculer α) et en divisant le produit par la constante cinétique d'élimination globale k_2 :

$$\text{FBA} = \frac{I \times \alpha}{k_2} \quad [\text{Équation A7.4}]$$

Le facteur de bioamplification corrigé de la croissance est calculé de la même façon, en utilisant la constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (obtenue comme indiquée à la section 7 de l'annexe 5). Une nouvelle fois, si I_g a servi à calculer α , il convient de l'utiliser à la place de I :

$$\text{FBA} = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \quad [\text{Équation A7.5}]$$

- Où α = rendement d'assimilation (absorption de la substance d'essai par voie intestinale) ;
 k_2 = constante cinétique d'élimination (non corrigée de la croissance) globale (jour⁻¹), calculée avec les équations présentées à l'annexe 5, section 3 ;
 k_{2g} = constante cinétique d'élimination corrigée de la croissance (jour⁻¹) ;
 I = constante cinétique d'ingestion (g de nourriture g⁻¹ de poisson jour⁻¹) ;

La demi-vie corrigée de la croissance ($t_{1/2}$) est calculée comme suit :

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_{2g}} \quad [\text{Équation A7.6}]$$

Le rendement d'assimilation de la substance chimique comprise dans la nourriture peut aussi être estimé si les résidus présents dans les tissus sont déterminés durant la phase linéaire de la phase d'absorption (entre les jours 1 et 3). On peut alors déterminer le rendement d'assimilation chimique (α) comme suit :

$$\alpha = \frac{C_p(t)}{I \times C_{\text{alim}} \times t} \quad [\text{Équation A7.7}]$$

- Où $C_p(t)$ = la concentration de la substance d'essai dans le poisson au temps t (mg kg⁻¹ de poids frais).

4. Correction en fonction de la teneur en lipides

Si la teneur en lipides a aussi été mesurée dans les poissons soumis à l'analyse chimique à tous les temps de prélèvement, alors il convient de corriger les concentrations individuelles en fonction des lipides et de tracer ln(concentration, corrigé de la teneur en lipides) par rapport à l'élimination (jour) pour obtenir $C_{0,d}$ et k_2 . Le rendement d'assimilation (équation A7.1) peut ensuite être calculé en fonction des lipides en utilisant C_{alim} (C_{alim} est multipliée par la fraction moyenne de lipides dans la nourriture). Des calculs complémentaires avec les équations A7.4 et A7.5 donneront le FBA corrigé de la teneur en lipides (et de l'effet de dilution par la croissance) directement.

Dans le cas contraire, les fractions lipidiques moyennes (poids frais) dans le poisson et dans les aliments sont déduites pour les deux groupes, témoin et traité (s'agissant de la nourriture et des poissons du groupe témoin, cette fraction est déduite à partir des mesures relevées au début et à la fin de l'exposition ; pour le groupe traité, elle découle habituellement des mesures relevées uniquement à la fin de l'exposition). Dans certaines études, la teneur en lipides du poisson peut augmenter sensiblement ; il est alors préférable d'appliquer une concentration moyenne des lipides dans le

poisson testé calculée à l'aide des valeurs mesurées à la fin de l'exposition et à la fin de l'élimination. En général, les données du groupe d'essai servent uniquement à obtenir les deux fractions lipidiques.

Le facteur de correction de la teneur en lipides (L_c) est calculé ainsi :

$$L_c = \frac{L_p}{L_{alim}} \quad [\text{Équation A7.8}]$$

Où L_p et L_{alim} sont les fractions lipidiques moyennes respectivement dans le poisson et dans la nourriture.

Le facteur de correction de la teneur en lipides sert à calculer le facteur de bioamplification corrigé par rapport aux lipides (FBA_L) :

$$FBA_L = \frac{FBA}{L_c} \quad [\text{Équation A7.9}]$$

5. Évaluation des différences entre la concentration mesurée au temps 0 ($C_{0,m}$) et la concentration déduite au temps 0 ($C_{0,d}$)

Il convient de comparer la concentration mesurée au temps 0 ($C_{0,m}$) et la concentration déduite au temps 0 ($C_{0,d}$). Si elles sont très similaires, le modèle du premier ordre utilisé pour obtenir les paramètres d'élimination semble approprié.

Dans certaines études, on observera une différence notable entre la valeur déduite au temps 0, $C_{0,d}$, et la concentration moyenne mesurée au temps 0, $C_{0,m}$ (voir le dernier point du paragraphe 159). Si $C_{0,d}$ est nettement inférieure à $C_{0,m}$ ($C_{0,d} \ll C_{0,m}$), cet écart peut indiquer la présence, dans les intestins, d'aliments enrichis non digérés. Pour le savoir, on peut analyser séparément des intestins excisés si des poissons (entiers) supplémentaires ont été prélevés et stockés à la fin de la phase d'absorption. Dans le cas contraire, s'il apparaît à l'issue d'un test du point aberrant statistiquement valide appliqué à la régression linéaire de la phase d'élimination que le premier temps d'échantillonnage de l'élimination est erronément élevé, il peut être pertinent de poursuivre la régression linéaire pour obtenir k_2 mais en omettant la concentration au premier temps de l'élimination. Si la régression linéaire semble nettement moins incertaine et que le processus d'élimination semble manifestement régi par une cinétique du premier ordre, il peut être approprié d'utiliser les valeurs $C_{0,d}$ et k_2 obtenues avec le calcul du rendement d'assimilation. Il faudra alors le justifier dûment dans le rapport d'essai. Il est également possible que la phase d'élimination ne soit pas régie par une cinétique du premier ordre. Si cette hypothèse est probable (le logarithme naturel formé à partir des données obtenues semble suivre une courbe par rapport à la droite de la régression linéaire), il est peu probable que les calculs de k_2 et $C_{0,d}$ soient valides, et il est recommandé de demander conseil à un biostatisticien.

Si $C_{0,d}$ est nettement supérieure à la valeur mesurée ($C_{0,d} \gg C_{0,m}$), cela peut signifier : que la substance a été éliminée très rapidement (le temps d'échantillonnage se rapproche très tôt de la limite de quantification de la méthode analytique lors de la phase d'élimination, voir la section 6 ci-après) ; que le processus d'élimination n'est pas régi par une cinétique du premier ordre ; que la régression linéaire pour obtenir k_2 et $C_{0,d}$ est erronée ; ou qu'un problème concernant les concentrations mesurées lors de l'étude est survenu à certains temps de prélèvement. Il est alors nécessaire d'examiner le tracé de la régression linéaire pour identifier les prélèvements sur ou près de la limite de quantification, les points aberrants et toute courbure manifeste (suggérant une élimination non régie par une cinétique du premier ordre), et de les indiquer clairement dans le rapport d'essai. Toute réévaluation ultérieure de la régression linéaire visant à améliorer les valeurs estimées devra être décrite et justifiée. Si on observe une déviation notable de la cinétique du premier ordre, il est peu probable que les calculs de k_2 et $C_{0,d}$ soient valides, et il est recommandé de demander conseil à un biostatisticien.

6. Orientations pour les substances d'essai s'éliminant très rapidement

Comme mentionné au paragraphe 129, certaines substances s'éliminent si vite qu'il n'est possible de déduire ni une concentration fiable au temps 0, $C_{0,d}$, ni k_2 parce que très tôt durant la phase d'élimination (dès le deuxième prélèvement de l'élimination) la substance n'est plus réellement mesurée (concentrations à la limite de quantification). Cette situation, observée lors de l'essai comparatif interlaboratoires avec du benzo[a]pyrène, a été consignée dans le rapport de validation de cette méthode d'essai. Dans ce cas de figure, il n'est pas possible de poursuivre la régression linéaire de manière fiable, car elle donnerait probablement une estimation exagérément élevée de $C_{0,d}$, d'où un rendement d'assimilation en apparence nettement supérieur à 1. On peut alors procéder à une estimation basse de k_2 et borner le FBA supérieurement.

En utilisant ces points de la phase d'élimination où une concentration a été mesurée, première concentration non détectée incluse (concentration fixée à la limite de quantification), une régression linéaire (fondée sur les concentrations transformées en logarithme naturel par rapport au temps) donnera une estimation de k_2 . Cela impliquera souvent uniquement deux points (par exemple les jours de prélèvement 1 et 2 de l'élimination) et k_2 pourra ensuite être estimée avec l'équation A5.22 présentée à l'annexe 5. Cette estimation de k_2 peut servir à estimer un rendement d'assimilation avec l'équation A7.1, en remplaçant dans cette équation la valeur $C_{0,d}$ par la concentration mesurée au temps 0 ($C_{0,m}$) quand d'après les estimations $C_{0,d}$ est nettement supérieure à ce que cet essai aurait permis d'atteindre. Si $C_{0,m}$ n'était pas mesurable, il convient d'utiliser le seuil de détection dans les tissus du poisson. Si, dans certains cas, cela donne une valeur $\alpha > 1$, alors un rendement d'assimilation de 1 est supposé être le « pire cas de figure ».

Le FBA_k maximum peut alors être estimé avec l'équation A7.4 et devra être indiqué comme une valeur « nettement inférieure à » (\ll). Par exemple, pour une étude menée avec une ration alimentaire de 3 % et une demi-vie d'élimination inférieure à 3 jours, et un « pire cas de figure » α de 1, le FBA_k risque d'être inférieur à environ 0.13. Étant donné l'objet de cette estimation et le fait que les valeurs seront basses par nature, il n'est pas nécessaire de les corriger de l'effet de dilution par la croissance ou de la teneur en lipides dans le poisson ou la nourriture.

ANNEXE 8

MÉTHODES POUR ESTIMER DES FBC PROVISOIRES À PARTIR DES DONNÉES COLLECTÉES DANS L'ÉTUDE AVEC EXPOSITION PAR VOIE ALIMENTAIRE

La méthode d'exposition par voie alimentaire est présentée dans la présente LD pour l'essai de bioaccumulation impliquant des substances impossibles à tester avec la méthode d'exposition via le milieu aquatique. La méthode d'exposition via le milieu aquatique donne un facteur de bioconcentration, alors que celle par voie alimentaire fournit directement des informations sur le potentiel de bioamplification de la nourriture. De nombreux plans relatifs à la sécurité des produits chimiques requièrent des informations sur la bioconcentration aquatique (par exemple pour le système d'évaluation des risques ou le Système général harmonisé de classification). Aussi est-il nécessaire d'utiliser les données obtenues avec une étude d'exposition par voie alimentaire pour estimer un facteur de bioconcentration qui soit comparable aux essais menés selon la méthode d'exposition via le milieu aquatique présentée dans cette LD⁴⁰. Cette section examine différentes approches en ce sens, tout en reconnaissant les limites inhérentes à ces estimations.

L'étude par voie alimentaire mesure l'élimination pour donner une constante cinétique d'élimination, k_2 . Si une constante cinétique d'absorption peut être estimée avec les données disponibles quand le poisson a été exposé à la substance d'essai dans l'eau, on pourra estimer un FBC cinétique.

L'estimation d'une constante cinétique d'absorption pour l'exposition via le milieu aquatique à une substance d'essai repose sur de nombreuses hypothèses, toutes contribuant à l'incertitude des estimations. De plus, cette méthode d'estimation d'un FBC suppose que la cinétique d'élimination globale (y compris les facteurs contributifs tels que la répartition dans le corps et les processus d'élimination individuels) est indépendante de la technique d'exposition utilisée pour produire une charge corporelle de la substance d'essai.

On peut résumer les principales hypothèses inhérentes à cette méthode d'estimation comme suit :

- L'élimination suivant l'absorption par voie alimentaire procède de même que suivant l'exposition via le milieu aquatique pour une substance donnée.
- L'absorption par exposition via le milieu aquatique est régie par une cinétique du premier ordre.
- Selon la méthode utilisée pour estimer l'absorption :
 - l'absorption peut être corrélée au seul poids du poisson ;

(40) Dans la nature, l'ingestion est probablement le meilleur moyen d'exposer au maximum des poissons à des substances très hydrophobes dans un milieu aquatique ; ainsi, un FBC estimé n'est pas strictement représentatif du potentiel de bioaccumulation d'une telle substance.

- l'absorption peut être corrélée au seul coefficient de partage octanol-eau de la substance ;
- l'absorption peut être corrélée à une combinaison du poids du poisson et du coefficient de partage octanol-eau de la substance ;
- les facteurs pouvant affecter l'absorption lors d'un essai par exposition en milieu aquatique tels que la biodisponibilité de la substance, l'adsorption vers l'appareillage, la taille moléculaire etc. ont peu d'impact ;

et, surtout :

- La base de données utilisée pour développer la méthode d'estimation de l'absorption est représentative de la substance considérée.

Plusieurs publications dans la littérature ont déduit des équations faisant le rapprochement entre l'absorption, depuis le milieu aquatique, de la substance par les branchies et un coefficient de partage octanol-eau de la substance, le poids du poisson (1) (2) (3) (4), le volume et/ou la teneur en lipides, l'imprégnation/diffusion par les membranes (5) (6), le volume de ventilation du poisson (7) et par une approche fugacité/bilan massique (8) (9) (10). Ces méthodes, appliquées dans ce contexte, sont évaluées en détail par Crookes et Brooke (11). Une publication de Barber (12), qui s'est attaché à modéliser la bioaccumulation associée à l'absorption par voie alimentaire, s'avère aussi utile dans ce contexte, puisqu'elle inclue les contributions de modèles de cinétique d'absorption par les branchies. Une section dans le document de référence du protocole de 2004 (13) est aussi consacrée à cet aspect.

Pour la plupart, ces modèles semblent dériver de bases de données limitées. S'agissant des modèles dont les bases de données sont présentées en détail, il semble que les types de substances utilisés présentent souvent une structure similaire ou relèvent de la même classe (en termes de fonctionnalité, par exemple les composés organochlorés). Cela ajoute à l'incertitude qu'il y a à utiliser un modèle dans le but de prédire une constante cinétique d'absorption pour un type de substance différent, sans parler des considérations spécifiques à l'essai comme l'espèce testée, les températures en présence, etc.

Une synthèse des techniques disponibles (11) montre qu'aucune méthode n'est « plus juste » que les autres. Aussi convient-il de justifier clairement le choix du modèle utilisé. Quand plusieurs méthodes sont justifiées, il est prudent de présenter plusieurs estimations de k_1 (et donc du FBC) ou une fourchette de valeurs pour k_1 (et pour le FBC) selon les différentes méthodes d'estimation d'absorption possibles. Néanmoins, étant donné les différences entre les types de modèle et les bases de données utilisées pour les développer, il ne serait pas approprié de prendre une moyenne des estimations obtenues avec ces différentes méthodes.

Certains chercheurs posent comme postulat que ces estimations du FBC exigent une correction en fonction de la biodisponibilité pour tenir compte de l'adsorption d'un produit chimique par rapport au carbone organique dissous (COD) dans un milieu aquatique, afin que l'estimation corresponde aux résultats des études d'exposition en milieu aquatique [par exemple (13) (14)]. Cette correction n'est toutefois pas forcément appropriée en raison des faibles niveaux de COD requis dans une étude avec exposition en milieu aquatique pour une estimation dans le « pire cas de figure » (à savoir le ratio entre la substance biodisponible et la substance mesurée dans la solution). Avec les substances très hydrophobes, l'absorption par les branchies peut être limitée par le taux de diffusion passive près des ouïes ; dans ce cas, il est possible que la correction tienne plus compte de cet effet que de son objet initial.

Il est conseillé de s'intéresser aux méthodes qui nécessitent des données facilement disponibles sur les substances testées dans l'étude avec exposition par voie alimentaire décrite ici (à savoir le log K_{oc} et le poids des poissons). D'autres méthodes nécessitant des informations plus complexes peuvent

s'appliquer, mais impliqueront de procéder à des mesures supplémentaires durant l'essai ou de disposer d'informations détaillées sur la substance d'essai ou sur l'espèce testée difficiles à obtenir. En outre, le choix du modèle peut être influencé par le niveau de validation et le domaine d'applicabilité (voir (11) pour une synthèse et une comparaison des différentes méthodes).

Il convient de garder à l'esprit que l'estimation de k_1 obtenue, et le FBC estimé, n'est pas sûre et peut nécessiter d'appliquer le poids de la preuve au FBA obtenu et aux paramètres relatifs à la substance (taille moléculaire par exemple) pour avoir une vue d'ensemble du potentiel de bioaccumulation d'une substance. L'interprétation et l'utilisation de ces paramètres peuvent varier en fonction du cadre réglementaire.

Bibliographie

- (1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. et Opperhuizen A. (1993). The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 25: 1-14.
- (2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. et Opperhuizen A. (1994). Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. *Aquat. Toxicol.* 30: 325-341.
- (3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. et Opperhuizen A. (1995). Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (4) Barber M.C. (2003). A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1963-1992.
- (5) Opperhuizen A. (1986). Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in *Aquatic Toxicology and Environmental Fate*, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA, États-Unis : 304-315.
- (6) Arnot J.A. et Gobas F.A.P.C. (2004). A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343-2355.
- (7) Thomann R.V. (1989). Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
- (8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. et Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1399-1420.
- (9) Campfens J. et Mackay D. (1997). Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environ. Sci. Technol.* 31: 577-583.
- (10) Arnot J.A. et Gobas F.A.P.C. (2003). A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. *QSAR Comb. Sci.* 22: 337-345.
- (11) Crookes M. et Brooke D. (2010). Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, Royaume-Uni.
- (12) Barber M.C. (2008). Dietary uptake models used for modeling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 755-777
- (13) Anonyme (2004). Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (14) Gobas F. et Morrison H. (2000). Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in *Handbook of property estimation methods for chemicals*, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, États-Unis : 189-231.