

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

Métabolisme dans les plantes cultivées

INTRODUCTION

1. L'objectif avoué d'une étude sur le métabolisme dans les plantes cultivées est l'identification et la caractérisation d'au moins 90 % des résidus radioactifs totaux dans chaque produit agricole brut (PAB) dérivé de la plante traitée. Dans de nombreux cas, il reste impossible d'identifier des parties importantes des résidus radioactifs totaux, en particulier lorsque le résidu est présent en faibles quantités totales, lorsqu'il est incorporé dans des biomolécules ou lorsque le métabolisme poussé de l'ingrédient actif donne de nombreux composants en faibles concentrations. Dans ce dernier cas, il est important que les demandeurs démontrent clairement la présence des composants et en mesurent les teneurs, et tentent, dans la mesure du possible, de les caractériser.

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

OBJECTIF

3. Les études sur le métabolisme dans les plantes cultivées ont pour vocation d'élucider la voie de dégradation de l'ingrédient actif, ce qui nécessite l'identification du métabolisme et/ou des produits de dégradation lorsqu'un pesticide est appliqué directement ou indirectement sur une plante cultivée.

4. Les études sur le métabolisme dans les plantes cultivées servent plusieurs objectifs principaux :

- Etablir une estimation des résidus totaux dans les divers produits agricoles bruts après traitement des plantes, pour ainsi déterminer la distribution des résidus au sein de la plante, par exemple, préciser si le pesticide est absorbé par les racines ou le feuillage, ou s'il y a translocation ;
- Identifier les composants majeurs du résidu terminal dans les divers produits agricoles bruts, afin de spécifier les composants qui doivent être analysés dans les études de quantification de résidus (c'est-à-dire la ou les définitions des résidus à des fins d'évaluation des risques et de respect des réglementations).
- Elucider la voie métabolique empruntée par l'ingrédient actif dans les plantes traitées.

CONDUITE DES ETUDES

Généralités

5. Les études sur le métabolisme dans les plantes cultivées visent à déterminer le devenir de l'ingrédient actif dans les végétaux. Les données obtenues *in vitro* peuvent également permettre de démontrer si l'ingrédient actif est susceptible de subir une hydrolyse (acide, alcaline ou enzymatique), une oxydation ou une réduction, une photolyse ou d'autres modifications. D'autres techniques encore, telles que des études sur le métabolisme de l'ingrédient actif dans des cultures de tissus, des plantes excisées, ou l'analyse de parties de la plante immatures ou non comestibles, telles que les feuilles de pommier, peuvent également contribuer à l'identification et à la caractérisation des résidus.

6. Il est toujours recommandé de solliciter l'avis des autorités réglementaires sur les particularités d'une étude sur le métabolisme dans les plantes cultivées ou lorsque des problèmes surgissent lors de l'utilisation de cette Ligne directrice. La consultation peut permettre d'arrêter certains points avant le début de l'étude, par exemple, sur le choix des plantes représentatives à utiliser ou sur le mode de traitement de plantes particulières qui n'entrent dans aucun groupe de plantes prédéfini. D'autres questions doivent parfois être réglées pendant le déroulement de l'étude, en particulier l'adéquation du degré de caractérisation ou d'identification.

7. Pour déterminer si le résidu a été suffisamment caractérisé et/ou identifié, il convient de prendre en compte la quantité de radioactivité résiduelle non identifiée, l'importance du produit végétal contenant le résidu non identifié dans l'alimentation humaine ou animale, la structure chimique de l'ingrédient actif et des métabolites identifiés, et la toxicité de produits chimiques de structure similaire à celle des métabolites potentiels. Si la structure d'un métabolite ou d'un produit dérivé d'une modification est identique à celle d'un autre produit chimique actif homologué et si l'information est tombée dans le domaine public, le demandeur doit la communiquer.

Groupes de plantes cultivées

8. Chaque type de groupe de plantes sur lesquels une utilisation est envisagée doit faire l'objet d'une étude sur le métabolisme dans les plantes cultivées. Dans le cadre des études sur le métabolisme dans les plantes cultivées, on peut considérer que les végétaux appartiennent à l'une des cinq catégories suivantes : légumes-racines, plantes à feuilles, fruits, plantes protéagineuses et oléagineuses, et céréales (voir annexe 1) ; une des plantes d'un groupe représente le groupe entier des plantes de ce groupe. Si les plantes n'appartiennent à aucune des cinq catégories, le demandeur doit consulter le cadre "divers" dans l'annexe 1 pour obtenir des instructions. L'extrapolation du métabolisme d'un pesticide à tous les ensembles de plantes exige au minimum des études de métabolisme sur trois plantes représentatives (issues des cinq catégories de plantes différentes). Si les résultats de ces trois études indiquent une voie métabolique comparable, aucune autre étude n'est nécessaire.

9. Les études doivent représenter le modèle d'utilisation prévue de l'ingrédient actif, par exemple, des applications sur les feuilles, le sol ou les semences, ou des traitements après récolte. Par exemple, si trois études ont été menées en utilisant une application foliaire et qu'une application sur le sol est proposée à une date ultérieure (par exemple traitement de semences, par granules, par pulvérisation du sol), une étude représentant cette application au sol doit être menée. Si les résultats de cette nouvelle étude sont similaires à ceux des résultats sur les feuilles, toute analyse supplémentaire est inutile. Toutefois, si des traitements simultanés des feuilles et du sol sont proposés, que deux études portent sur l'application foliaire et la troisième sur l'application au sol, et que ces trois études sur des plantes de trois catégories différentes donnent des résultats similaires, aucune autre étude n'est nécessaire.

10. L'observation de différences entre les quantités de métabolites relevant de la même voie n'impose pas la conduite d'études supplémentaires. En revanche, lorsque des études menées de manière similaire (par exemple, pulvérisation foliaire à des délais avant récolte similaires et à des stades de croissance similaires), mettent en évidence des voies métaboliques différentes selon les plantes représentatives, de nouvelles études doivent être entreprises pour permettre l'utilisation sur des plantes des autres catégories. Ce point est éclairci par quelques exemples.

Exemple 1

L'application foliaire d'un ingrédient actif à un légume feuillu, un fruit, et à une graine de céréales démontre que la seule voie métabolique implique l'hydroxylation d'un cycle phényle suivie d'une conjugaison au glucose. Chez la laitue, un légume feuillu, le métabolite hydroxylé et son conjugué représentent chacun environ 10 % des résidus radioactifs totaux. Dans les produits agricoles bruts de blé, le métabolite et son conjugué représentent respectivement 20 % et 30 % des résidus radioactifs totaux. Dans les pommes, le métabolite hydroxylé compte pour 10 % des résidus radioactifs totaux, et le conjugué pour 60 %. Dans ce scénario, il est inutile de mener des études de métabolisme supplémentaires sur les deux autres catégories de plantes, les légumes-racines et les protéagineux/ oléagineux, car la même voie métabolique est observée dans les trois plantes différentes. Les autorités réglementaires devront tenir compte des divergences en termes de concentrations du métabolite et de son conjugué lors de la définition du résidu visant à imposer une limite maximale de résidu et à évaluer les risques alimentaires. Les critères à prendre en compte dans ce processus sont décrits dans le « Guidance Document on Definition of the Residue » (1) de l'OCDE.

Exemple 2

L'application d'un herbicide au sol avant plantation indique que la voie métabolique dans les betteraves à sucre (légumes-racines) et les tomates (catégorie des fruits) est l'hydroxylation de plusieurs groupes alkyle. On n'observe pas de séparation d'un cycle aromatique du reste de la molécule dans ces deux plantes. En revanche, dans le blé (céréale), les résultats démontrent une perte généralisée du cycle aromatique de l'herbicide, caractérisant 30 à 70 % des résidus radioactifs totaux. Dans ce cas, des études de métabolisme complémentaires s'avèrent nécessaires si l'utilisation du pesticide sur les plantes des autres catégories, légumes à feuilles et protéagineux/oléagineux est envisagée.

11. Dans l'exemple 2, la dégradation particulière au blé représente de toute évidence une voie métabolique majeure. Dans le cas où un tel processus métabolique mis en évidence dans une seule plante représentative se révélerait mineur, c'est-à-dire qu'il ne produit que moins de 10 % des résidus radioactifs totaux ou de 0.05 ppm de résidus, en tenant compte de la valeur la plus élevée, aucune autre étude supplémentaire ne sera normalement entreprise à moins que les résidus produits ne soient considérés comme significativement plus toxiques que l'ingrédient actif. Il est impossible de décrire dans cette Ligne directrice toutes les situations de ce type susceptibles de se présenter.

12. Dans certains cas, l'utilisation prévue est spécifique, en termes de plantes, et/ou de conditions de croissance, et une étude de métabolisme doit alors s'ajouter à celles réalisées sur les trois plantes représentatives. Par exemple, si une utilisation sur du riz paddy est prévue, une étude de métabolisme sur cette plante doit être soumise, quelles que soient les autres études de métabolisme disponibles.

Utilisations après récolte

13. Les utilisations après récolte doivent faire l'objet d'au moins une étude, à moins de disposer d'une étude appropriée sur le métabolisme foliaire. Une étude foliaire peut remplacer une étude après récolte si le produit mature était présent et exposé au moment de l'application. Les utilisations après récolte proposées sur plusieurs produits dérivés de plantes appartenant à des catégories différentes (voir Annexe 1) nécessitent la mise en œuvre d'au plus trois études supplémentaires.

Plantes génétiquement modifiées (GM)

14. Il n'est pas nécessaire de mener des études de métabolisme supplémentaires sur des plantes génétiquement modifiées dans lesquelles l'insertion d'un gène ne confère pas une résistance médiée par le métabolisme. Toutefois, il conviendra de détailler les motifs portant à conclure que le gène ne modifie pas le métabolisme. Dans le cas de l'insertion d'un gène conférant une résistance à l'ingrédient actif par le biais du métabolisme du pesticide, une étude sur le métabolisme dans les plantes cultivées devra être réalisée pour chaque ensemble de plantes (annexe 1) auquel appartiennent les plantes génétiquement modifiées. Toutefois, si l'une de ces études démontre que le métabolisme est similaire à celui des plantes conventionnelles, aucune étude supplémentaire n'est exigée. Dans le cas d'une voie métabolique différente, deux études supplémentaires devront être menées.

DISCUSSION DE LA METHODE D'ESSAI**Marquage isotopique de l'ingrédient actif**

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

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

17. L'activité spécifique de l'ingrédient actif radiomarqué doit se conformer aux conditions imposées sur les données de l'étude sur le métabolisme dans les plantes cultivées (quantification de 0.01 mg/kg de résidus radioactifs totaux dans les matrices végétales). Une pureté radiochimique inférieure à 95 % au moment de l'application devra être justifiée.

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

Paramètres d'application

19. Lors de l'élaboration d'une étude sur le métabolisme dans les plantes cultivées, il faut tenir compte de la méthode d'application et de la dose d'application de l'ingrédient actif radiomarqué. Le principal objectif d'une étude de métabolisme est d'identifier les composants chimiques du résidu, et c'est pourquoi il faut utiliser la dose d'application maximale (le taux d'application conseillé par les bonnes pratiques agricoles) pour permettre la caractérisation ou l'identification du résidu. Lorsque le nombre d'applications de l'ingrédient actif proposé dans les bonnes pratiques agricoles est supérieur à 3, il est possible de réduire les applications à trois ou à un tiers du nombre total normal, en choisissant la valeur la plus élevée, sous réserve que 1) l'application saisonnière totale à la plante, à partir de l'application initiale, soit inférieure ou égale à trois mois avant l'application finale, et le délai avant récolte soit respecté, et 2) la dose de chaque application soit inférieure à trois fois la dose d'application individuelle proposée par les bonnes pratiques agricoles et/ou aucune phytotoxicité ne soit observée. Lorsque le laps de temps compris entre l'application initiale et l'application finale est supérieur à trois mois, les intervalles entre les dernières applications seront considérées comme plus significatifs que l'intervalle entre l'application initiale et l'application finale, toutes ces éventualités méritant d'être examinées au cas par cas.

20. Il est parfois nécessaire de procéder à des expériences à des doses excessives pour faciliter l'identification des métabolites lorsque l'on suppose que les concentrations de résidus dans les plantes seront faibles, même à la dose d'application maximale. La détermination de la dose excessive à utiliser dépend de plusieurs facteurs. Par exemple, dans le cas d'herbicides, la phytotoxicité peut stresser ou même détruire les plantes, et restreint l'intervalle des doses excessives utilisables.

21. Le facteur de multiplication d'une dose excessive utilisée comme seule concentration de l'étude, ne peut servir à calculer les "valeurs seuils" (voir paragraphe 30 et tableau 1). Par exemple, dans le cas du traitement d'une plante par une substance radiomarquée à une dose excessive (par exemple 5X), les valeurs de radioactivité obtenues ne devront pas être divisées par le facteur multiplicateur (c'est-à-dire 5) pour déterminer les valeurs seuils permettant l'identification et la caractérisation. En revanche, si les essais sont réalisés à 1X et à une dose excessive, la dose d'application 1X peut être utilisée pour estimer si les "valeurs seuils" pour l'identification et la caractérisation ont été dépassées.

22. La plante doit être traitée par l'ingrédient actif radiomarqué, associé de préférence aux ingrédients de formulation habituels du produit final tel qu'il est appliqué sur le terrain. Si les bonnes pratiques agricoles proposées mentionnent spécifiquement l'utilisation d'un adjuvant, il faut alors s'efforcer de l'utiliser dans la formulation de l'essai. Si l'ingrédient actif est appliqué en solution (solvant véhicule seulement), le demandeur doit s'assurer d'éviter l'utilisation du solvant ou de tout additif contenu dans le solvant s'il s'agit d'un photosensibilisateur, par exemple, l'acétone. L'application directe du pesticide radiomarqué en solution est acceptable si elle est raisonnablement justifiée ; par exemple, si l'ingrédient actif est soluble dans le réservoir de pulvérisation dans les conditions réelles d'utilisation commerciale et pour le moyen d'application, ou bien s'il est difficile à formuler en faibles quantités.

23. Le choix des plantes spécifiques et de modes d'utilisation conformes aux bonnes pratiques agricoles doit représenter le cas dans lequel peut être escomptée l'obtention de la quantité la plus élevée de radioactivité dérivée du métabolisme dans les parties comestibles de la plante à la récolte. La dose d'application la plus élevée et les intervalles de traitement les plus courts seront choisis (tout en respectant le paragraphe 19). Le délai après récolte doit correspondre au mode d'utilisation proposé. Le stade de

croissance des plantes au moment de l'application et du prélèvement des échantillons doit simuler l'utilisation prévue du pesticide sur le terrain.

Installations utilisées dans l'essai

24. Dans le cadre d'études de métabolisme, les plantes peuvent être cultivées dans des parcelles d'essai extérieures, à la serre ou dans des chambres de culture de plantes. Il convient de fournir une description du matériel (structure en verre totalement close avec ou sans témoins environnementaux, polytunnel, système clos avec recirculation de l'atmosphère) et un enregistrement des conditions environnementales pendant l'étude (par exemple, température, précipitations, éclairage), sur le site d'essai. Dans le cas d'une étude menée en chambre de croissance ou en serre, il faut tenir compte de la photodégradation du pesticide.

Prélèvement d'échantillons végétaux

25. Des échantillons de tous les produits agricoles bruts doivent être prélevés pour caractériser et/ou identifier les résidus. Des échantillons des produits dérivés de plantes parfois consommés au stade immature, comme le maïs doux ou les salades, seront prélevés pour analyse. L'analyse d'éléments végétaux immatures peut également contribuer à la caractérisation ou à l'identification de résidus dans les cas où les valeurs "seuils" sont dépassées, mais où les faibles teneurs en résidus ou la nature des métabolites posent des problèmes particuliers de caractérisation ou d'identification. Ces données peuvent fournir des informations adéquates desquelles seront tirées des conclusions sur l'identité des résidus dans les parties matures de la plante. [Voir l'annexe 3 "RACs to be Analyzed for Metabolism in Crops and Rotational Crop Studies" dans le document « Overview of Residue Chemistry Studies » (2)].

26. L'utilisation de parties de plantes matures mais non comestibles (par exemple, feuilles de pommiers, feuillage de pommes de terre) pour faciliter l'identification des résidus sur les PAB matures, doit s'accompagner de la démonstration de la similitude des profils chromatographiques des parties de plantes matures comestibles et non comestibles.

27. Si plusieurs modes d'utilisation sont envisagés, il faut prélever des échantillons supplémentaires pour prendre en compte, par exemple, les différents délais avant récolte. Des profils doivent être obtenus à partir des échantillons permettant de démontrer leur comparabilité. L'identification doit ensuite être réalisée sur les échantillons les mieux appropriés.

Analyses

28. Au cours des étapes initiales de la phase analytique d'une étude sur le métabolisme dans les plantes cultivées, les composants végétaux à analyser sont prélevés, hachés ou homogénéisés, et les résidus radioactifs totaux sont déterminés. Il faut s'assurer de recouvrir toute la radioactivité. Le lavage de la surface des échantillons avant leur préparation peut contribuer à l'estimation du degré de pénétration.

29. Il faut déterminer la répartition du résidu entre la peau et la pulpe dans les produits dont la peau est non comestible tels que les oranges, les melons et les bananes.

30. Les échantillons sont extraits par une série de solvants ou de mélanges de solvants dont les polarités et des autres caractéristiques dépendent de la nature des résidus attendus. Les extraits obtenus sont désignés par résidus extractibles. La caractérisation et/ou l'identification exigées des résidus extractibles et du marqueur radioactif non extrait sont respectivement résumées dans le tableau 1 et la figure 1.

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

32. En cas d'échec de l'identification des résidus radioactifs, le degré de caractérisation nécessaire pour une partie de la radioactivité totale dépend de plusieurs facteurs, notamment la quantité du résidu présent, la quantité des résidus radioactifs totaux déjà identifiés, l'importance de l'élément végétal en tant que produit destiné à l'alimentation humaine ou animale, des préoccupations d'ordre toxicologique liées à une classe de composés, l'importance escomptée du résidu évaluée par la caractérisation déjà réalisée et l'aptitude des procédés analytiques à détecter des résidus caractérisés mais non identifiés, plus précisément par conversion en un radical courant. La conversion en un radical courant est acceptable pour caractériser de nombreux composants présents à faible concentration. Toutefois, cette approche ne peut être adoptée pour s'affranchir de l'identification d'une proportion significative des résidus.

33. Habituellement, l'identification est réalisée en soumettant simultanément à une chromatographie le métabolite et des étalons connus, en utilisant deux systèmes différents, ou grâce à des techniques à même de fournir une identification structurale positive, par exemple SM, RMN, etc. Dans le cas d'une co-chromatographie, il faut éviter d'utiliser des techniques chromatographiques employant la même phase stationnaire avec deux systèmes de solvants différents pour vérifier l'identité de métabolites, car alors les méthodes ne sont pas indépendantes. L'identification par co-chromatographie doit faire usage de deux systèmes dissemblables, analytiquement indépendants, par exemple une chromatographie sur couche mince (CCM) à phase inversée et une CCM à phase normale ou une CCM et une chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Du moment que la qualité de la séparation chromatographique est acceptable, aucune confirmation supplémentaire par spectroscopie n'est requise. Les méthodes qui apportent des informations structurales telles que la chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse (CG-SM), la chromatographie liquide/spectrométrie de masse (CL-SM), ou la chromatographie liquide spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM), et la RMN peuvent également fournir une identification non ambiguë. Un métabolite dont on a déterminé qu'il était d'importance minime en raison de sa faible teneur absolue (<0.05 mg/kg) ou sa faible proportion dans les résidus radioactifs totaux (<10 pour cent des résidus radioactifs totaux), peut être identifié par co-élution avec des métabolites synthétiques putatifs jouant le rôle d'étalons de référence en n'utilisant qu'une seule technique chromatographique, par exemple une CLHP en phase inversée. Ces valeurs seuils n'ont qu'une finalité indicative large et ne s'appliquent pas forcément dans des cas où un métabolite soulève des inquiétudes au plan toxicologique, ou lorsque une valeur inférieure à 10 pour cent des résidus radioactifs totaux représente un seuil de résidu absolu élevé.

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

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

36. Lorsqu'ils mènent une étude sur le métabolisme dans des plantes cultivées, les demandeurs ne doivent pas perdre de vue les futurs problèmes susceptibles de surgir en matière de capacité des méthodes analytiques (respect de la réglementation et collecte des données) à extraire efficacement les résidus définis pour le calcul des limites maximales de résidus (LMR) ou l'évaluation des risques alimentaires. C'est pourquoi il faudra parfois conserver les échantillons radiomarqués à des fins d'analyse future par des méthodes encore à mettre au point (processus parfois désigné par "radiovalidation" des méthodes). Toutefois, si les protocoles d'extraction employés dans les méthodes analytiques correspondent précisément à ceux utilisés dans les études de radiomarqueurs, ce type de données sera généralement inutile. La radiovalidation du procédé d'extraction des méthodes analytiques sera intégrée au rapport sur la méthode analytique, ou fera l'objet d'un rapport séparé, ou sera incorporée dans le rapport sur le métabolisme. La lettre d'accompagnement ou le résumé de la somme des données doit permettre de la localiser.

Caractérisation et identification des résidus extractibles

37. Les valeurs seuils de radioactivité présentées dans le tableau 1 correspondent à la caractérisation ou à l'identification requise pour chaque produit agricole brut après application du composé d'essai radiomarqué à la dose d'application 1X. Pour une quantité inférieure ou égale à 0.01 mg/kg des résidus radioactifs totaux dans une partie d'une plante, aucune différenciation de radioactivité n'est nécessaire, sous réserve que les résidus ne soulèvent pas d'inquiétude au plan toxicologique à des concentrations plus basses.

38. Lorsque la concentration de résidus radioactifs totaux dépasse 0.01 mg/kg, l'élément végétal doit être extrait avec des solvants ou des mélanges de solvants de polarités diverses. La quantification par analyse chromatographique des composants de la radioactivité extractibles permettra alors de déterminer le degré de caractérisation nécessaire.

39. Si la radioactivité extractible représente 0.01 mg/kg ou moins, aucune analyse supplémentaire n'est requise. Si elle est supérieure à 0.01 mg/kg, le tableau 1 donne les valeurs seuils relatives à l'identification ou la caractérisation des résidus extractibles, à l'exception des cas où les résidus potentiels soulèvent des inquiétudes en matière de toxicologie qui peuvent concerner des valeurs plus faibles, y compris dans les fractions polaires. Toutefois, il n'est pas toujours nécessaire d'identifier les résidus individuels présents à faible teneur, que ce soit en mg/kg ou en pourcentage des résidus totaux, si les composants majeurs du résidu ont été identifiés. Par exemple, pour une concentration de radioactivité totale dans une partie de plante égale à 3 mg/kg dont 75 % ont été identifiés sans ambiguïté, il sera vraisemblablement inutile d'identifier plusieurs résidus individuels dont les concentrations sont comprises dans l'intervalle allant de 0.05 à 0.1 mg/kg. En revanche, il est recommandé de tout mettre en œuvre pour identifier des résidus à hauteur de 0.05-0.1 mg/kg lorsque la radioactivité totale ne s'élève qu'à 0.3 mg/kg.

40. Il convient de noter que les valeurs seuils exprimées en termes de concentration ne constituent pas des normes incontournables, mais de simples indicateurs du degré adéquat de caractérisation. Il arrive néanmoins dans de nombreux cas qu'un métabolite d'importance supposée se répartisse dans de nombreuses fractions en raison de ses caractéristiques de solubilité ou de la présence simultanée de formes libres et conjuguées. L'application des valeurs seuils exigera donc, en particulier dans les cas où les résidus radioactifs totaux sont répartis dans de nombreuses fractions, de démontrer par analyse chromatographique de chaque fraction que la concentration combinée (la somme des concentrations) d'un métabolite individuel distribué dans les diverses fractions ne dépasse pas significativement la valeur seuil.

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

Quantité relative (%)	Concentration (mg/kg)	Action requise
< 10	< 0.01	Pas d'action en l'absence d'inquiétudes au plan toxicologique
< 10	0.01 – 0.05	Caractériser. Ne tenter de confirmer l'identité que s'il existe des moyens directs, par exemple si un composé de référence est disponible, ou si l'identification a été réalisée dans une étude précédente.
< 10	> 0.05	La caractérisation/identification doit être décidée au cas par cas en tenant compte de la quantité identifiée.
> 10	< 0.01	Caractériser. Ne tenter de confirmer l'identité que s'il existe des moyens directs, par exemple si un composé de référence est disponible, ou si l'identification a été réalisée dans une étude précédente.
> 10	0.01 – 0.05	Des efforts significatifs doivent être consacrés à l'identification, en particulier s'il est nécessaire d'établir une voie, une caractérisation finale peut être acceptée.
> 10	> 0.05	Identification en utilisant tous les moyens possibles
> 10	> 0.05 Radiomarqueur non extrait	Radiomarqueur non extrait – Voir paragraphes 42-46 et Figure 1

Libération et caractérisation/identification du marqueur radioactif non extractible

41. Dans les trois cas suivants, des marqueurs radioactifs non extraits sont observés dans les plantes :

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

42. Comme il décrit dans la figure 1, le matériau végétal solide extrait doit être dosé, et si la radioactivité mesurée dans le radiomarqueur non extrait atteint la valeur seuil la plus élevée entre 0.05 mg/kg et 10 pour cent des résidus radioactifs totaux, on s'efforcera de libérer la radioactivité pour poursuivre l'identification. Toute tentative infructueuse consacrée à la libération de la radioactivité non

extraite et à la caractérisation et/ou l'identification des résidus radioactifs totaux doit être détaillée et rapportée.

43. A chaque étape de la figure 1, il convient de quantifier la radioactivité totale libérée. En matière de caractérisation, il est important de noter que le comportement chromatographique de la radioactivité libérée, en particulier des matériaux hydrosolubles, doit être comparée à celle de l'ingrédient actif et des composés de référence disponibles. Il est inutile de s'employer à libérer encore la radioactivité lorsque la concentration de radiomarqueur non extrait résiduel après un protocole donné est inférieure à 0.05 mg/kg ou inférieure à 10 pour cent des résidus radioactifs totaux.

44. Les traitements peuvent être mis en œuvre successivement ou en parallèle. L'addition d'acide et d'alcali dilués à 37 °C, l'utilisation de tensioactifs, d'enzymes, et d'acide 6 N et/ou d'alcali 10 N au reflux font partie des types de traitements possibles. Toutefois, il est indéniable que les modes opératoires les plus doux permettent d'attribuer le plus précisément les structures des métabolites libérés, et une extraction poussée, par exemple dans un reflux acide ou alcalin, risque de libérer des fragments sous forme de produits finaux d'hydrolyse, dont la structure peut être très éloignée de celle du marqueur radioactif non extrait originel.

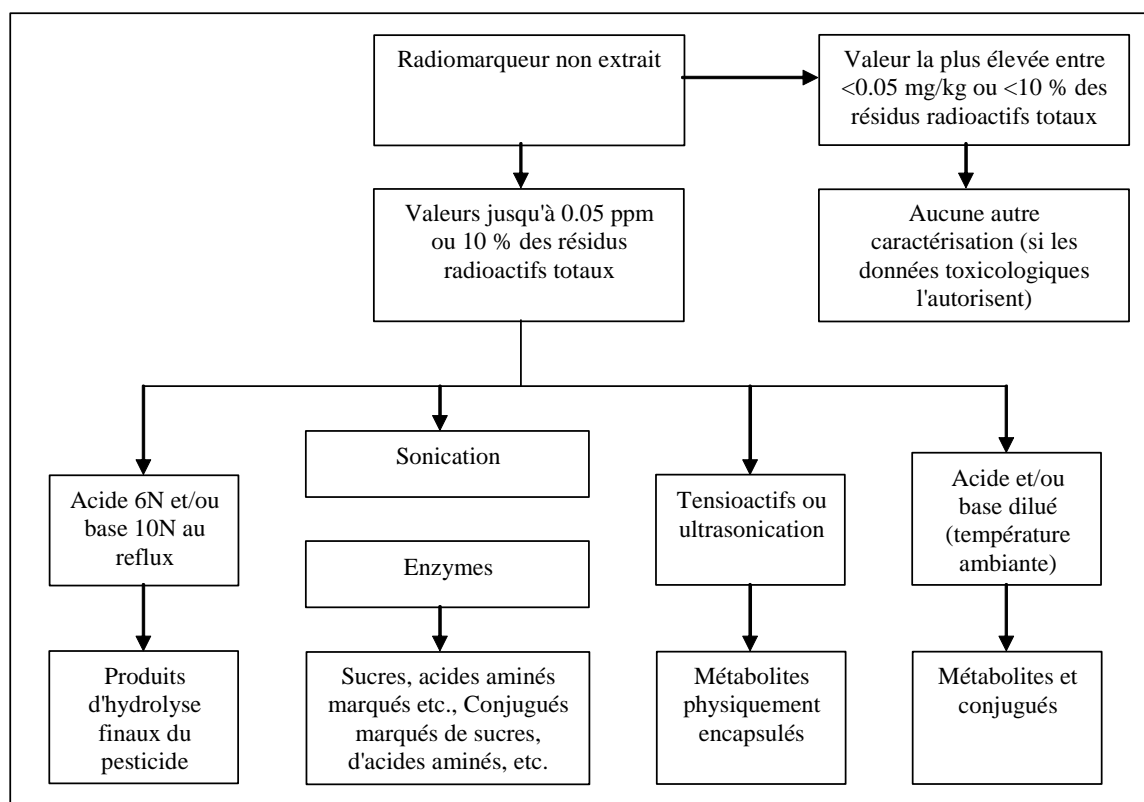
45. Un traitement acide ou alcalin doux peut hydrolyser des fragments conjugués, et libérer éventuellement toutes les biomolécules ayant incorporé la radioactivité. Les tensioactifs peuvent permettre de délivrer des résidus physiquement encapsulés ou liés à une membrane. Pour améliorer l'accessibilité du substrat à l'enzyme par rupture de la membrane ou de la paroi cellulaire, une étape de sonication peut précéder un traitement par une combinaison d'enzymes judicieusement choisies. En tous les cas, l'activité de chaque enzyme utilisée doit être confirmée. Ces étapes peuvent contribuer à libérer le radiomarqueur chimiquement lié, en particulier toutes les biomolécules ayant incorporé de la radioactivité.

46. Les étapes finales de libération peuvent mettre en œuvre une hydrolyse acide et alcaline au reflux, susceptible de solubiliser la matrice végétale. La radioactivité libérée par cette opération correspondra probablement aux acides aminés, sucres et composés encapsulés ou conjugués, liés ou non au radiomarqueur non extrait originel ou aux structures encapsulées. Toutefois, cette étape peut démontrer la possibilité de libérer des résidus de pesticide, et fournir des données sur la radioactivité incorporée ainsi que quelques informations sur la nature des métabolites. Les échantillons, les homogénats et les extraits doivent toujours être tamponnés et maintenus à basse température, sauf pendant les étapes d'hydrolyse, afin de réduire la dégradation et la formation d'artefacts.

47. L'identification d'acides aminés, de sucres, de composés phénoliques, de nucléotides, et d'autres composés radiomarqués peut modérer dans de nombreux cas la nécessité d'une caractérisation et/ou d'une identification plus détaillée du radiomarqueur non extrait, car elle prouve généralement la dégradation du pesticide en petites unités carbonées qui se sont intégrées dans le pool de carbone. Cette conclusion ne concerne pas les cas dans lesquels un seul métabolite libéré, qui constitue une proportion significative des résidus radioactifs totaux, à savoir plus de 10 pour cent ou plus de 0.05 mg/kg, n'a pas été identifié.

48. Les questions abordées ci-dessus n'ont qu'une valeur de description générale du type d'informations nécessaires pour déterminer l'acceptabilité d'une étude sur le métabolisme dans les plantes cultivées. Des protocoles et des méthodologies différentes peuvent être adoptées dans des circonstances particulières. Il conviendra toutefois, pour garantir l'adéquation de l'étude soumise, de respecter les concepts de base concernant les valeurs "seuils" d'identification de la radioactivité, les méthodologies de caractérisation et/ou d'identification de la radioactivité requises, et les étapes appropriées à la libération du radiomarqueur non extrait.

FIGURE. 1. Caractérisation et identification du radiomarqueur non extrait



Stabilité durant l'entreposage

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

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

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

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

CONSIDERATIONS SUR LE RAPPORT DES RESULTATS

Résultats

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

Résumé/Introduction

- (i) Stratégies d'essai employées et la justification de leur choix.
- (ii) Protocole expérimental général employé, en particulier discussion, s'il y a lieu, des problèmes expérimentaux inhabituels rencontrés, des tentatives visant à résoudre ces problèmes qui ont conduit à s'écarter du protocole d'essai envisagé et des effets, le cas échéant, de ces écarts sur les résultats de l'étude.
- (iii) Modes et voies du métabolisme observés, y compris la description complète de l'identité et de la quantité (radiomarqueur libre et non-extrait) de tous les composants majeurs des résidus radioactifs totaux. Ces dernières informations seront de préférence résumées sous forme d'un texte assorti de tableaux et/ou de figures.
- (iv) Conclusion à propos de la nature qualitative des résidus radioactifs totaux dans les PAB à la récolte ou lors de leur utilisation dans les aliments pour animaux.
- (v) Lorsqu'une méthodologie analytique visant à vérifier le respect de la réglementation ou une méthodologie analytique de collecte des données a été développée, elle doit être validée avec des échantillons dérivés de l'étude sur le métabolisme dans les plantes cultivées, accompagnés d'une notification évaluant sa capacité à extraire et à déterminer tous les composants des résidus radioactifs totaux, qu'il s'agisse de radiomarqueur libre ou non, extrait ou de substances conjuguées dans les PAB. La notification doit aussi indiquer les limites de détection, la précision et l'exactitude de la méthodologie employée. L'efficacité d'extraction doit lui être adjointe ou soumise comme élément du rapport sur la méthode analytique ou bien encore dans un rapport indépendant ou dans le rapport sur le métabolisme.

Matériels et Méthodes

a) Substance d'essai

- (i) Identification de l'ingrédient actif pesticide de l'essai, notamment, nom chimique ; nom commun, noms de l'American National Standards Institute (ANSI), de la British Standards Institution (BSI), ou de l'International Standards Organization (ISO) ; nom ou numéro utilisé pour le développement et l'expérimentation par l'entreprise ; et numéro CAS (Chemical Abstract Service) et nom chimique IUTAC.
- (ii) La ou les structures chimiques de l'ingrédient actif et des métabolites qui constituent les résidus doivent être fournies, et un renvoi pour chaque nom utilisé dans le développement ou l'expérimentation doit être proposé dans un document de synthèse ou une annexe de l'étude. Les

certificats d'analyse décrivant la pureté et l'identité des étalons utilisés dans le processus d'identification seront également joints, s'ils sont disponibles.

- (iii) Informations sur les paramètres de formulation pertinents (par exemple, nature du solvant, du véhicule, de l'appât, de l'additif ou de toute autre matrice sur laquelle a été appliqué le pesticide radiomarqué).
- (iv) Indication de la pureté et de la nature et de la source du marqueur radioactif employé dans le matériau d'essai radiomarqué. L'identité des impuretés radiomarquées présentes en quantités significatives (>5%), dérivées de la substance d'essai, doivent également être indiquées, le cas échéant, ainsi que le ou les site(s) de marquage dans la molécule de substance d'essai radiomarquée. Le choix de radiomarqueurs autres que le ^{14}C et du ou des sites de marquage dans la molécule sera justifié (la position de marquage sur le cycle sera particulièrement détaillée, dans la mesure du possible).
- (v) L'activité spécifique doit être notée en MBq/mg, avec un exemple de calcul expliquant comment l'analyste obtient les concentrations de radioactivité (mg/kg) à partir des données expérimentales. L'information sur les désintégrations doit permettre aux autorités réglementaires compétentes de vérifier la concentration exprimée en mg par kg de substance active rapportée pour les parties de la plante et dans les diverses fractions chromatographiques.
- (vi) Toute information supplémentaire estimée utile et pertinente par le demandeur pour parachever une description complète et détaillée du produit chimique d'essai, par exemple ses propriétés physico-chimiques (solubilité, etc.).

b) Site d'essai

- (i) Description du milieu d'essai dans son ensemble tel qu'il est utilisé pour l'étude (à savoir, parcelles d'essai extérieures, serre, ou chambres de culture), y compris, s'il y a lieu, l'enregistrement des conditions environnementales subies pendant la durée de l'étude (température, précipitations, ensoleillement) et une documentation sur les caractéristiques du sol (qui n'est pas exigée pour les substances appliquées au feuillage) sur le site de l'essai.
- (ii) Explication ou justification développée par le demandeur légitimant l'emploi dans l'étude d'un environnement d'essai décrit, en particulier, un milieu d'essai, qui n'est pas représentatif ou s'écarte significativement des pratiques culturelles habituelles ou des conditions environnementales dans lesquelles la plante d'essai sera normalement cultivée.

Détailler toutes les anomalies météorologiques susceptibles d'avoir affecté l'étude.

c) Plantes d'essai et récolte (prélèvement) des échantillons

- (iii) Identification de la culture d'essai, en particulier type et variété et classification dans un groupe de plantes.
- (iv) Justification ou déclaration établie par le demandeur expliquant le choix d'une plante d'essai différente de celles dont l'utilisation est proposée.
- (v) Identification de la ou des parties de plantes spécifiques récoltées et soumises à l'analyse des résidus ^{14}C pour déterminer les résidus radioactifs totaux.

- (vi) Stade(s) de développement, état général (immature/mature, vert/mûr, frais/sec, etc.) et taille de la culture d'essai au moment des applications de pesticide et à la récolte. Toute autre information considérée appropriée et pertinente par les demandeurs pour fournir une description complète et approfondie de la plante d'essai.
- (vii) Mode opératoire de la récolte (méthode de récolte ou de prélèvement (mécanique/manuelle, sur la plante, sur le sol, par flottation, etc.) ; type d'équipement employé ; nombre et poids des échantillons prélevés par répétition et nombre de répétitions par dose de traitement ; codage ou étiquetage des échantillons). Le protocole de prélèvement utilisé pour obtenir des échantillons représentatifs doit être clairement indiqué.
- (viii) Description détaillée des autres informations pertinentes sur la croissance de la plante d'essai, sur les applications des produits formulés de pesticides, et le prélèvement des échantillons.

d) Application du pesticide

- (i) Description du mode d'application du pesticide à la plante d'essai (à savoir incorporation dans le sol avant plantation, application foliaire après émergence par le dessus, application sur des appâts, etc.), y compris la formulation, c'est-à-dire le solvant, le véhicule, l'appât, l'adjuvant ou une autre matrice dans laquelle le pesticide radiomarké est appliqué, ainsi que la méthode d'application, par exemple pulvérisateur manuel, application topique, injection dans le sol, etc.
- (ii) Doses réelles d'application au sol utilisées dans l'étude, exprimées en kilogrammes d'ingrédient actif par hectare ou en livres d'ingrédient actif par acre.
- (iii) Nombre et calendrier des applications, intervalles entre les applications et entre le traitement et le prélèvement des échantillons ou délai avant récolte.
- (iv) Dates de plantation, de semis ou de repiquage, selon le cas, et autres dates significatives dans la croissance de la plante, par exemple, récolte d'une plante immature pour obtenir des parties de plantes spécifiques susceptibles d'être utilisées dans l'alimentation animale ; applications de pesticide ; et récolte de la plante mature.
- (v) Explication ou justification par les demandeurs de toute divergence significative en termes de dose ou de mode d'application à la culture d'essai par rapport au modèle d'utilisation prévu.

e) Manipulation des échantillons et stabilité durant l'entreposage

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

f) Méthodes analytiques utilisées pour les analyses des résidus radioactifs

- (i) Capacité des méthodes analytiques utilisées dans l'étude de métabolisme à déterminer les composants du résidu, qu'il se présente sous forme de radiomarqueur libres, conjugué ou non extrait.

- (ii) Méthode de quantification et de détermination de la distribution des résidus radioactifs totaux dans la plante cultivée pour toutes les parties végétales prélevées, notamment les fractions susceptibles d'être transformées en aliments pour l'homme ou l'animal, au moment habituel de la récolte ou à un stade de développement qui est normalement utilisé pour l'alimentation animale, proposée sous forme de texte rédigé, de tableau ou de figure.
- (iii) Description de la préparation de l'échantillon (broyage, lyophilisation, etc.) avant les analyses par combustion oxydante ou scintillation liquide.
- (iv) Démonstration quantitative de la récupération de la majeure partie de la radioactivité totale à partir de la plante traitée aux moments des prélèvements d'échantillons ou de la récolte grâce à des analyses d'échantillons combinées. Les pertes significatives devront être débattues.
- (v) Détails sur les paramètres des méthodes analytiques, notamment description de l'équipement utilisé pour déterminer la radioactivité totale dans chaque échantillon. Si une correction de l'extinction est utilisée dans les méthodes de dosage de radioactivité (automatique ou non), la méthodologie employée doit être décrite, ainsi que les méthodes appliquées pour réduire l'extinction.
- (vi) Détails sur les données de comptage radioactif sur des échantillons représentatifs sélectionnés, incluant les équivalents en mg/kg calculés, et la limite de détection accompagnée de calculs représentatifs.
- (vii) Efficacité d'extraction, en utilisant la méthodologie analytique de collecte des données et de vérification du respect de la réglementation avec des échantillons radiomarqués issus de l'étude de métabolisme, assortis d'une notification sur leur aptitude à déterminer (extraire) tous les composants intéressants des résidus radioactifs totaux, qu'ils soient libres ou liés/conjugués dans les produits agricoles bruts.

g) Extraction et fractionnement de la radioactivité

- (i) Description complète, de préférence assortie d'un schéma de procédé ou d'un diagramme dépeignant les stratégies générales d'extraction et de fractionnement employées pour chaque matrice d'échantillon analysée.
- (ii) Discussion et justification de la séquence d'extraction et du choix du solvant d'extraction (polaire ou non) et des protocoles d'extraction (mélange, macération, séparation, Soxhlet) employés, sans omettre les techniques supplémentaires utilisées (réactifs décomplexants, extraction ultrasonique ou aux micro-ondes, etc.).
- (iii) Description des conditions choisies pour l'hydrolyse acide, basique et/ou enzymatique du tissu végétal préalablement extrait (ou du gâteau de filtration ou du résidu qui subsiste) et/ou des extraits végétaux hydrosolubles, en vue de libérer les résidus conjugués de ces échantillons. Il convient également de détailler la source, la pureté, la spécificité et l'activité de toutes les préparations enzymatiques utilisées lors de l'hydrolyse.
- (iv) Méthodes de calcul permettant de quantifier le rapport ou les quantités de composé initial et/ou de métabolites libres par rapport aux formes conjuguées dans chaque matrice d'échantillon extrait.
- (v) Les demandeurs sont invités à présenter une estimation quantitative de la radioactivité résiduelle (à savoir le radiomarqueur non extrait) qui subsiste dans la matrice de l'échantillon extrait après

sa soumission à des extractions poussées par des solvants et des traitements hydrolytiques. La radioactivité résiduelle est exprimée en pourcentage et en mg/kg (équivalents du composé initial) de la radioactivité totale récupérée. Les démarches entreprises pour libérer le radiomarqueur non extrait par des protocoles rares ou différents, les extractions réalisées par des traitements répétés par des acides ou des bases concentrés à des températures élevées doivent également être signalées par le demandeur qui justifiera leur emploi.

- (vi) Calcul et notification des efficacités d'extraction des produits chimiques radioactifs pour tous les tissus végétaux récoltés ayant été analysés.
- (vii) Présentation des données permettant la mesure ou le suivi de la radioactivité perdue dans chaque étape successive du protocole de fractionnement et d'isolement et discussion des démarches entreprises pour réduire ces pertes.
- (viii) Exposition par les demandeurs des protocoles détaillés de fractionnement du radiomarqueur non extrait dans les tissus végétaux inclus dans les constituants naturels tels que protéines, amidon, lignine, cellulose, etc.
- (ix) Les demandeurs doivent signaler si des quantités significatives du résidu radioactif originel caractérisé comme radiomarqueur non extrait se sont incorporées dans les produits naturels.
- (x) Quantification et notification de la quantité de radioactivité dans chaque fraction d'échantillon en termes de radioactivité totale (Bq), et en pourcentage et en mg/kg (équivalents du composé initial) de la radioactivité totale recouvrée dans la matrice de l'échantillon original analysée. Pour les études dans lesquelles la radioactivité est mesurée dans toutes les parties de la plante, il peut être utile d'indiquer le pourcentage de radioactivité totale dans chaque partie, mais ce n'est pas obligatoire

h) Caractérisation et/ou identification de la radioactivité

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

tension, échange d'ions ou chromatographie d'exclusion, dérivation, etc.) ainsi que des méthodes de détermination (spectrométrie de masse en modes d'impact électronique (EI) et d'ionisation chimique (CI), RMN) appliquées à l'identification finale des métabolites.

- (v) Description de tous les instruments, de tous les matériels et de tous les réactifs employés, en particulier les conditions de fonctionnement des instruments utilisés pour la séparation, la caractérisation et l'identification des résidus radioactifs.
- (vi) Justification de toute perte ou absence de mesure de la radioactivité dans chaque extrait ou fraction de plante. La quantité signalée doit être exprimée en pourcentage et en mg/kg (en équivalents du composé initial) de la radioactivité totale récupérée dans une partie de plante ou une fraction particulière analysée ou utilisée comme aliment pour animaux.
- (vii) Indication de tous les composants métabolites majeurs, et si possible, informations sur la nature chimique des composants métabolites discrets (mineurs).
- (viii) Rapport contenant les données et les informations donnant un aperçu des démarches entreprises pour caractériser et identifier au plan chimique tout le radiomarqueur conjugué ou non extrait complexe provenant de l'ingrédient actif initial dans les parties de plantes comestibles utilisées dans l'alimentation humaine ou animale.

Résultats et Discussion

1. Stratégies d'essai

Discussion des écarts enregistrés par rapport aux protocoles ou aux stratégies d'essai prévus, attribuables à des conditions ou à des difficultés inhabituelles d'ordre expérimental rencontrées au cours des opérations de culture, de traitement ou de prélèvement des végétaux de l'essai, notamment les problèmes d'extraction, de fractionnement et de caractérisation des résidus et, s'il y a lieu, les stratégies spécifiques d'extraction et de caractérisation employées pour traiter le radiomarqueur non extrait. Une discussion sur l'impact ou les effets éventuels de ces écarts sur les résultats de l'étude doit également être proposée.

2. Voies métaboliques

Une discussion, assortie d'un schéma de fonctionnement, des voies de dégradation ou des voies métaboliques observées dans les PAB étudiés doit être présentée. Dans ce contexte, les voies métaboliques déterminées dans les PAB peuvent être comparées et différenciées des voies métaboliques connues et déjà décrites dans d'autres PAB ou relevées dans des études sur le métabolisme animal portant sur le composé chimique étudié. Il convient de proposer la définition chimique de la voie métabolique pour chaque type de plante en se fondant sur les résultats des études de caractérisation et/ou d'identification, assortie d'un tableau indiquant les structures et les noms chimiques associés (CAS et IUPAC lorsqu'ils existent). Tous les intermédiaires et métabolites supposés (mais non identifiés) doivent également être clairement indiqués dans la voie.

3. Caractérisation et/ou identification et distribution des résidus radioactifs totaux

- (i) Utiliser un format de tableau ou de graphique. Identifier tous les composants majeurs des résidus radioactifs totaux dans les PAB, les métabolites libres et conjugués, les constituants naturels, notamment par leur nom, leur structure et leur quantité (exprimée en pourcentage des résidus radioactifs totaux et en mg/kg en équivalents du produit initial), et indiquer leur distribution dans les parties de plantes qui sont des PAB.

- (ii) Lorsqu'un PAB (y compris les parties de plantes et leurs produits de transformation) est normalement utilisé à l'état immature dans l'alimentation animale, il faut aussi identifier et quantifier tous les composants importants des résidus présents à ce stade du développement de la plante.
- (iii) Les demandeurs doivent fournir le maximum d'informations sur tous les constituants non identifiables et/ou non caractérisables du résidu terminal, leurs quantités et leur répartition dans les PAB.
- (iv) Traitement(s) statistique(s). Inclure des exemples représentatifs de tous les tests statistiques appliqués aux données brutes obtenues sur les échantillons et par les analyses au cours de l'étude sur le métabolisme dans les plantes cultivées. Fournir la limite de quantification de la détermination de radioactivité et des séparations chromatographiques.
- (v) Ajouter toute information supplémentaire jugée appropriée et pertinente par les demandeurs à une description complète et approfondie de l'étude sur le métabolisme dans les plantes cultivées, en particulier les mesures de contrôle de qualité et les précautions prises pour garantir la validité de tous les aspects de l'étude.

Conclusion

- (i) Voies et mécanismes impliqués et importance ou degré du métabolisme observé lorsque le PAB sujet est cultivé jusqu'à maturité ou jusqu'à la récolte.
- (ii) Nature, quantité et répartition des résidus radioactifs totaux dans les PAB au moment de la récolte ou au moment de leur utilisation normale pour l'alimentation animale, liées à l'utilisation proposée du pesticide.
- (iii) Les résultats des études de validation menées sur les échantillons de plante radiomarqués doivent également être discutés, le cas échéant, notamment la capacité à déterminer les composants identifiés du résidu défini des méthodologies analytiques visant à vérifier le respect de la réglementation qui ont été mises au point ou qui sont disponibles.

Tableaux et Figures

a) Tableaux (par exemple) :

- (i) Données climatiques et environnementales.
- (ii) Répartition et intensité de la radioactivité dans les diverses parties de plantes récoltées.
- (iii) Nom, structure, pureté de tous les étalons et métabolites de référence utilisés dans l'étude.
- (iv) Temps de rétention en CLHP/GCL et valeurs de R_f en CCM de l'ingrédient actif, des métabolites, des composés apparentés et des composés modèles dans différentes conditions de colonne ou de solvant (élution).
- (v) Nom, structure, quantité et position dans les PAB de tous les principaux constituants identifiés du résidu final.
- (vi) Propriétés, caractéristiques, quantités et répartition dans les PAB de tous les composants importants non identifiés du résidu final.

b) Figures (par exemple) :

- (i) Discussion ou diagramme décrivant l'emplacement, la topographie et la superficie de la ou des parcelles d'essai extérieures.
- (ii) Stratégies ou schémas généraux d'extraction et de fractionnement appliqués à chaque matrice d'échantillon analysée.
- (iii) Répartition de la radioactivité dans diverses fractions de CLHP/CLG d'échange d'ions (d'exclusion) ou préparative.
- (iv) Diagrammes ou schémas des voies métaboliques.

Références**Annexes**

- (i) Chromatogrammes, spectres représentatifs, etc. (le cas échéant).
- (ii) Tirés à part, cités ou de référence, de documents publiés ou non publiés, rapports d'entreprises, lettres, méthodes d'analyses, etc., employés par les demandeurs (sous réserve que ces documents ne figurent pas ailleurs dans le dossier de données, auquel cas un renvoi suffira).
- (iii) Autres. Tout matériel pertinent qui n'entre dans aucune des autres sections de ce rapport doit être annexé.

Rapport d'étude

54. Le rapport d'étude doit contenir les informations suivantes :

- Identification de l'ingrédient actif de l'essai, en particulier, nom chimique ; nom commun, American National Standards Institute (ANSI), British Standards Institution (BSI), ou International Standards Organization (ISO) ; nom utilisé pour le développement et l'expérimentation par l'entreprise ; et nom et numéro CAS (Chemical Abstract Service) et nom chimique IUPAC.
- Description de la ou des substances d'essai radiomarquées et justification du ou des sites de radiomarquage, description de la pureté radioactive, nature du radiomarqueur, activité spécifique (en Mbq/Mg), source, identité des impuretés radiomarquées significatives, le cas échéant.
- Nom, structure, et pureté des étalons de références pour les métabolites utilisés dans l'étude.
- Description du milieu d'essai dans son ensemble tel qu'il est utilisé pour l'étude (à savoir, parcelles d'essai extérieures, serre, ou chambres de culture), y compris, s'il y a lieu, l'enregistrement des conditions environnementales subies pendant la durée de l'étude (température, précipitations, ensoleillement) et une documentation sur les caractéristiques du sol (inutile pour les substances appliquées sur le feuillage) sur le site d'essai.
- Identification de la plante d'essai, en particulier par son type ou sa variété et sa classification dans un groupe de plantes.

- Description détaillée des paramètres d'application : type(s) d'application de pesticide à la plante d'essai ; formulation dans laquelle le pesticide radiomarqué a été appliqué ; méthode d'application ; dose(s) d'application ; nombre et dates des applications (en particulier stade de croissance au moment de la ou des applications) ; délai(s) avant la récolte.
- Description de la récolte, notamment la technique utilisée, le stade de croissance des plantes et leur taille à la récolte, les parties de plantes récoltées et la manipulation, le transport et l'entreposage des parties de plantes récoltées.
- Description de la préparation et de l'analyse des parties de plantes pour les déterminations de résidus radioactifs totaux.
- Description complète et minutieuse de l'extraction et du fractionnement de la radioactivité dans les diverses matrices végétales, incluant des rapports sur la quantité de radioactivité dans chaque fraction d'échantillon, quantifiée en termes de radioactivité totale (Bq ou dpm) et en pourcentage et concentration (mg/kg en équivalents d'ingrédient actif) dans la matrice d'échantillon originelle analysée.
- Description complète de tous les instruments, de tout le matériel et de tous les réactifs utilisés, en particulier des conditions de fonctionnement des instruments utilisés pour la séparation, la caractérisation et l'identification des résidus radioactifs.
- Caractérisation et/ou identification des résidus radioactifs, notamment les données concernant tous les constituants majeurs, qu'il s'agisse de radiomarqueur libre, conjugué, non extrait ou d'un constituant naturel, de façon à représenter leur répartition dans les PAB, exprimée en pourcentage des résidus radioactifs totaux (% des RRT) et en concentration (mg/kg).
- Description du comportement chromatographique (par exemple temps de rétention en CLHP et/ou en CG, valeur de référence (Rf) en CCM) du composé initial, des métabolites, et des étalons de référence concernés et comparaison avec le comportement chromatographique des résidus radioactifs extraits des PAB. Il conviendra également d'inclure des radiochromatogrammes représentatifs des extraits d'échantillons et des chromatogrammes des étalons analytiques, ainsi que toutes les données spectrales confirmant l'identité des métabolites.
- Information sur la stabilité durant l'entreposage de tous les composants majeurs du résidu.
- Informations quantitatives sur la récupération du résidu radioactif par les procédés d'extraction utilisés, notamment ceux concernant les (probables) procédés analytiques liés à la réglementation.
- Discussion détaillée, à laquelle sera joint un schéma métabolique, des voies de dégradation ou du métabolisme du pesticide observés dans les PAB examinés.
- Conclusion sur les points suivants : (a) voies métaboliques et degré de métabolisme observés pour le PAB concerné à maturité ou à la récolte, (b) nature, quantité et répartition des résidus radioactifs totaux dans le PAB à la récolte ou utilisé comme aliment pour les animaux ; et (c) résultats des études de validation menées sur les échantillons végétaux de l'étude de métabolisme afin de démontrer dans quelle mesure la méthodologie analytique de vérification du respect de la réglementation est capable d'extraire ou de libérer les composants identifiés inclus dans la définition du résidu.

LITTERATURE

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

- (1) OECD Guidance Document on the Definition of Residue (2006)
- (2) OECD Guidance Document on Overview of Residue Chemistry Studies (2006)
- (3) U.S. Environmental Protection Agency (1996). OPPTS Test Guidelines Series 860, Residue Chemistry, Washington, D.C.
<http://www.epa.gov/oppts/>
- (4) European Commission (1997). Appendix A – Metabolism and Distribution in Plants, Document 7028/VI/95 rev. 3, 22/7/97, Directorate General for Agriculture VI B II-1. Draft Part B1, Metabolism in Plants, personal communication.
- (5) Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (1986). Directives sur les essais de pesticides pour l'obtention de données applicables aux fins d'homologation de pesticides et d'établissement de limites maximales de résidus – Etude de marquage radioactif (études de métabolisme), Rome.
- (6) Canada. Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire. Ligne directrice sur les caractéristiques chimiques des résidus de l'AMIFAC 98-02. <http://www.pmra-arla.gc.ca/>
- (7) Japan Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries (MAFF) (2000). Data Requirements for Supporting Registration of Pesticides, 2-4-1 Studies of metabolic fate in plants, Notification No. 12 – Noan – 8147, 24 November 2000.
- (8) Australia Pesticides and Veterinary Medicines Management Agency. Residue Guidelines. <http://www.apvma.gov.au/>

ANNEXE 1**Plantes et groupes de plantes définis pour les études sur le métabolisme dans les plantes cultivées**

Les études sur le métabolisme dans les plantes cultivées sont utiles pour certaines plantes d'intérêt ; par conséquent, chaque fois qu'une utilisation sur une plante particulière est proposée, une étude de métabolisme est nécessaire dans sa catégorie. Un maximum de trois catégories suffira, sous réserve d'obtenir un schéma métabolique cohérent à partir de ces trois études. Il est parfois nécessaire d'étudier des catégories supplémentaires lorsque l'on observe des différences de métabolismes entre les groupes.

Code	Catégorie	Plantes
F	Fruit	Agrumes Fruits à coque Fruits à pépins Fruits à noyau Baies Petits fruits Raisins Légumes à fruit Banane Kaki
R	Racines	Légumes-racines et tubercules Légumes à bulbe
L	Plantes à feuilles	Légumes du genre Brassica Légumes à feuilles Légumes tiges Houblons Tabac
C/G	Céréales/graminées	Céréales Graminées et fourrages
P/O	Plantes légumineuses et oléagineuses	Légumineuses Légumes secs Oléagineux Arachides Légumineuse pour fourrage Fèves de cacao Grains de café
-	Divers	En général, les plantes qui ne sont pas incluses dans les listes ci-dessus, ou n'entrent dans aucune catégorie, sont considérées comme diverses, et leur utilisation pour représenter l'un des trois groupes de plantes ne sera habituellement pas acceptée. Toutefois, dans le cas où les demandeurs se proposent d'utiliser l'une de ces plantes à la place d'une espèce végétale appartenant à l'un des trois groupes en raison de son importance nationale ou régionale, il leur est vivement conseillé d'en référer aux autorités réglementaires.