

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

Métabolisme dans les cultures en rotation

INTRODUCTION

1. L'utilisation sur le terrain de la plupart des pesticides implique un contact du pesticide avec le sol, soit par application intentionnelle au sol, par exemple pour lutter contre les mauvaises herbes avant émergence ou contre les insectes du sol, soit par inadvertance, par pulvérisation excessive du feuillage, égouttement des feuilles, etc. Les études sur les cultures en rotation permettent d'évaluer le potentiel d'accumulation du pesticide et de ses métabolites ou de ses produits de dégradation dans le sol dans des cultures en rotation. Les plantes cultivées en rotation destinées à l'alimentation humaine ou animale, également désignées par cultures subséquentes ou suivantes, sont définies toute culture de champ ou aquatique, susceptible d'être plantée après la récolte d'une culture primaire traitée par un pesticide ou bien à nouveau plantée après l'échec de la culture primaire traitée par le pesticide. Cette Ligne directrice décrit les méthodes d'essai visant à évaluer le degré d'accumulation d'un pesticide et les étapes nécessaires à l'identification ou à la caractérisation de tous les résidus significatifs accumulés dans les cultures alternées.

2. Les études sur le métabolisme dans les cultures en rotation 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 cultures en rotation ont le dessein de déterminer la nature et la quantité des résidus de pesticide absorbés dans les cultures alternées destinées à être utilisées dans les aliments pour l'homme ou l'animal. Plus précisément, ces études visent à atteindre les objectifs suivants :

- Estimer les résidus radioactifs totaux dans les divers produits agricoles bruts (PAB) par absorption dans le sol.
- Identifier les composants majeurs du résidu terminal dans les divers PAB, 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 de dégradation empruntée par l'ingrédient actif dans les plantes alternées.
- Obtenir des données permettant de déterminer les intervalles de rotation appropriés (durée écoulée entre l'application du pesticide et la plantation de la culture alternée) et/ou les restrictions qu'il faut imposer aux cultures alternées en se fondant sur les niveaux d'absorption des résidus.

- Obtenir des informations permettant de déterminer s'il faut procéder à des essais en conditions limitées sur le terrain sur les cultures en rotation.

CONDUITE DES ETUDES

Généralités

4. Il n'est habituellement pas nécessaire de mener des études sur le métabolisme des cultures en rotation pour les pesticides utilisés sur des cultures permanentes ou semi-permanentes qui comprennent, mais pas uniquement, les produits ou les groupes de plantes suivants : asperge, avocat, banane, groupe des baies, groupe des agrumes, noix de coco, canneberge, datte, figue, ginseng, artichaut, raisin, goyave, kiwi, mangue, champignons, olives, papaye, fruit de la passion, ananas, plantain, groupe des fruits à pépins, rhubarbe, groupe des fruits à noyau, groupe des fruits à coque.

5. Dans le cas d'une application du pesticide à une culture primaire de riz paddy, le demandeur est engagé à consulter les agences réglementaires compétentes afin de déterminer si un autre modèle d'étude, par exemple un modèle de vieillissement du pesticide dans des conditions de rizière avant la rotation, est éventuellement nécessaire.

6. L'objectif visé d'une étude sur le métabolisme est l'identification et la caractérisation d'au moins 90 % des résidus radioactifs totaux dans chaque produit agricole brut de la culture alternée. Il arrive souvent qu'il soit impossible d'identifier des fractions significatives des résidus radioactifs totaux, notamment lorsque le résidu est présent en quantités totales réduites, lorsqu'il est incorporé dans des produits naturels, ou lorsque le pesticide est largement métabolisé en de nombreux composants présents à faible teneur. Dans ce dernier cas, il est important que les demandeurs démontrent clairement la présence et les concentrations des composants, et tentent, si possible, de les caractériser.

7. Pour déterminer si le résidu a été suffisamment caractérisé et/ou identifié, il convient de prendre en compte le niveau de radioactivité résiduel non identifié, 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 au métabolite potentiel. 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 le notifier.

8. Lorsqu'ils mènent une étude sur le métabolisme dans des cultures en rotation, 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 la définition des résidus est identique à celle en vigueur pour les cultures primaires ou 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.

DISCUSSION DE LA METHODE D'ESSAI

Marquage isotopique de l'ingrédient actif

9. 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 impliquant 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.

10. 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.

11. 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 des résidus radioactifs totaux dans les matrices végétales). Une pureté radiochimique inférieure à 95 % au moment de l'application devra être justifiée.

12. 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

13. L'étude doit être menée en utilisant un sol de limon sableux préalablement traité par la substance d'essai radiomarquée appliquée à une dose équivalente à la dose saisonnière maximale (IX). Toutefois, si les instructions portées sur l'étiquette du pesticide restreignent son utilisation à un type de sol qui n'est pas le limon sableux, l'étude doit être menée sur le type de sol spécifié. Dans tous les cas, le sol ne doit pas être stérilisé. De plus, si la dose d'application saisonnière maximale ne peut être atteinte qu'en multipliant les traitements dans les conditions d'utilisation réelles, comme c'est le cas de nombreux insecticides et fongicides foliaires, la substance radiomarquée peut être appliquée au sol par ce mode opératoire ou en réduisant le nombre d'applications. Par exemple, si l'étiquetage préconise neuf applications de 1 kg d'ingrédient actif par hectare à des intervalles hebdomadaires, il est possible d'employer dans l'étude sur le métabolisme des cultures en rotation une application de 9 kg d'ingrédient actif par hectare ou 3 applications de 3 kg d'ingrédient actif par hectare ou bien tout autre modèle d'application qui respecte la dose saisonnière maximale. Quel que soit le cas, la période de vieillissement dans le sol est décomptée à partir de la dernière application.

14. Le sol doit être traité avec l'ingrédient actif pesticide radiomarqué, contenant de préférence des ingrédients de formulation habituellement présents dans le produit final appliqué au champ. Si le composé initial 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.

15. Si la pratique agricole habituelle consiste à incorporer le pesticide dans le sol après son application au sol, ce mode opératoire sera employé.

16. Le prélèvement de sol n'est pas obligatoire, sauf si le demandeur le juge nécessaire.

Intervalles de rotation des cultures

17. Il convient de planter des cultures alternées représentatives à trois intervalles de rotation appropriés, par exemple 7- 30 jours pour déterminer les circonstances responsables d'un échec de la culture ou des rotations courtes, 60-270 jours pour représenter une rotation normale après récolte de la culture primaire et 270-365 jours pour les cultures alternées l'année suivante. Le choix des intervalles de rotation devra se fonder sur l'utilisation agricole escomptée du pesticide et les pratiques d'assolement habituelles. Le demandeur devra justifier l'emploi d'un nombre inférieur à trois intervalles de rotation.

18. Dans les cas où l'application du pesticide (par exemple certains herbicides) se traduit par une phytotoxicité excessive pour des cultures en rotation de 7-30 jours, il convient d'étudier une autre séquence temporelle pour le premier intervalle de rotation. Les informations en matière de restrictions sur la plantation imposées par la phytotoxicité doivent être communiquées.

Groupes de cultures en rotation représentatives

19. Les cultures alternées doivent représenter chacune des catégories de plantes suivantes : légumes-racines et tubercules, par exemple : radis, betteraves ou carottes ; petits grains par exemple : blé, orge, avoine ou seigle ; et légumes à feuilles, par exemple épinard ou laitue. Dans la mesure du possible, les plantes cultivées comprendront celles appelées à entrer dans le programme de rotation indiqué sur l'étiquette, s'il est connu. Toutefois, les légumes à bulbe tels que les oignons ou l'ail sont exclus des plantes racines représentatives. L'importance des sojas dans certaines pratiques de rotation peut justifier leur utilisation pour remplacer un légume à feuilles. La culture de plantes témoins n'est pas obligatoire, mais leur plantation dans des sols non traités peut permettre de déterminer un éventuel bruit de fond ou d'autres interférences dans l'analyse.

Phase d'étude pendant le cycle de vie

20. L'étude peut être menée à la serre ou dans une parcelle ou un récipient extérieur ou peut combiner les deux modes opératoires, par exemple, les plantes de cultures alternées peuvent être cultivées dans des conditions de serre, mais dans des sols ayant été traités et vieillis en conditions extérieures ou de terrain. Il est possible de cultiver une plante primaire dans le sol pendant la période de vieillissement, sous réserve que le sol ait été traité avant la plantation. Dans ce cas, la culture doit être entretenue et récoltée conformément aux pratiques agronomiques habituelles. Un sol traité et planté de cultures alternées aux premiers intervalles de rotation peut également être à nouveau planté en cultures alternées aux intervalles de rotation plus longs, si nécessaire.

Prélèvement d'éléments végétaux

21. Les trois plantes de cultures en rotation doivent être récoltées et les produits agricoles bruts appropriés des éléments végétaux destinés à l'alimentation humaine et animale prélevés. Il convient également de collecter des échantillons sur des plantes sélectionnées à différents intervalles de temps dans le cas où des plantes immatures et matures sont habituellement récoltées dans le cadre des pratiques agricoles habituelles. Les échantillons prélevés comprendront le fourrage, le foin, la paille et le grain pour les céréales ; des échantillons de légumes à feuilles matures et immatures et la racine ou le tubercule ainsi que les parties aériennes (feuillues) d'une plante racine, même si la portion feuillue ne constitue pas un produit agricole brut de la racine effectivement plantée. En effet, les données recueillies à partir de la partie feuillue de la plante racine et du légume à feuilles immature sont nécessaires pour utiliser comme modèles les trois plantes de l'étude et les extrapoler à une gamme plus large de plantes alimentaires. De surcroît, l'augmentation de l'utilisation culinaire d'herbes potagères immatures justifie l'emploi d'échantillons de légumes à feuilles immatures. L'immaturité est définie comme l'étape dans la culture qui se situe à environ la moitié de la période normale nécessaire à la plante pour atteindre la maturité complète.

ANALYSES

22. Au cours des étapes initiales de la phase analytique d'une étude sur le métabolisme dans les cultures en rotation, les composants végétaux à analyser sont prélevés, hachés ou homogénéisés, et les résidus radioactifs totaux sont déterminés. Il faut s'assurer de recouvrer toute la radioactivité.

23. A ce stade, la mesure de concentrations de résidus radioactifs totaux supérieures à 0.01 mg/kg dans les parties comestibles (pour l'alimentation humaine ou animale) des trois plantes à tous les intervalles de rotation permet de s'affranchir de toute caractérisation supplémentaire, sauf dans les rares cas où les autorités réglementaires s'interrogent sur la nocivité d'un pesticide ou d'un métabolite présent à des teneurs inférieures à 0.01 mg/kg. Il peut alors être nécessaire de déterminer la présence (ou l'absence) de pesticide ou de métabolites spécifiques qui posent problème à des teneurs inférieures à 0.01 mg/kg. Lorsque la quantité des résidus radioactifs totaux est supérieure à la valeur seuil (0.01 mg/kg) dans un produit agricole brut de plusieurs plantes cultivées, il conviendra alors de définir la nature des résidus dans les plantes d'essai dans lesquelles cette concentration est inférieure à 0.01 mg/kg. Les critères de caractérisation et d'identification de ces résidus sont précisés ci-dessous. Il y a lieu de consacrer une attention particulière aux résidus d'importance toxicologique éventuellement présents dans le sol et absorbés par les plantes de cultures alternées.

24. 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.

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

26. 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 (c'est-à-dire 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.

27. 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 la spectrométrie de masse (SM), la résonance magnétique nucléaire (RMN), etc. Dans le cas d'une co-chromatographie, il faut éviter d'utiliser des techniques chromatographiques employant la même phase stationnaire avec deux systèmes de solvants différents pour vérifier l'identité de métabolites, car alors les méthodes ne sont pas indépendantes. L'identification par co-chromatographie doit faire usage de deux systèmes dissemblables, analytiquement indépendants, par exemple une chromatographie sur couche mince (CCM) à phase inversée et une CCM à phase normale ou une CCM et une chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Du moment que la qualité de la séparation chromatographique est acceptable, aucune confirmation supplémentaire par spectroscopie n'est requise. Les méthodes qui apportent des informations structurales telles que la chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse (CG-SM), la chromatographie liquide/spectrométrie de masse (CL-SM), ou la chromatographie liquide spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM), et la RMN peuvent également fournir une identification non ambiguë. Un métabolite dont on a déterminé qu'il était d'importance minimale en raison de sa faible teneur absolue (<0.05 mg/kg) ou sa faible proportion dans les résidus radioactifs totaux (<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.

28. 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.

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

Tableau 1. Stratégie d'identification et de caractérisation de résidus extractibles issus du métabolisme dans les études sur le métabolisme dans les cultures en rotation

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	Résidus non extractibles – Voir paragraphes 39-46 et Figure 1

Caractérisation et identification des résidus extractibles

30. 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'inquiétudes au plan toxicologique à des concentrations plus basses.

31. 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.

32. 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.

33. 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.

Libération et caractérisation/identification du marqueur radioactif non extractible

34. Dans les trois cas suivants, le marqueur radioactif non extrait peut être observé dans les plantes :

- Incorporation dans des biomolécules (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 résidus dans des biomolécules (telles que cellulose, hemicellulose, lignine) ou bien liaison physico-chimique étroite avec ces résidus, qui forment des marqueurs radioactifs "non extractibles" 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 le radiomarqueur non extrait, et l'utilisation de tensioactifs peut également convenir dans des conditions moins rigoureuses.

35. 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 (voir Figure 1). Toute tentative infructueuse consacrée à la libération du radiomarqueur non extrait et à la caractérisation et/ou l'identification des résidus radioactifs totaux doit être détaillée et rapportée comme preuve de persévérance.

36. 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.

37. 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 résidus sous forme de produits finaux d'hydrolyse, dont la structure peut être très éloignée de celle du marqueur radioactif non extrait originel.

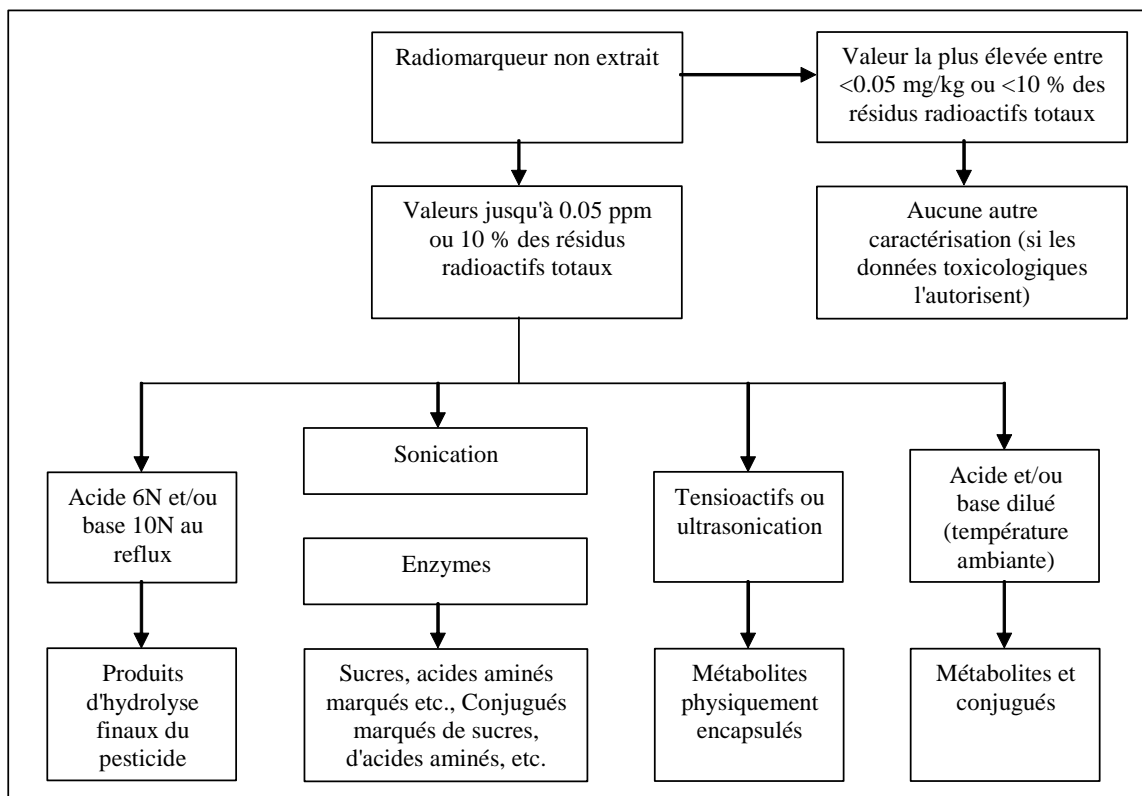
38. Un traitement acide ou alcalin doux peut hydrolyser des fragments conjugués, et libérer éventuellement toutes les biomolécules ayant incorporé la radioactivité. Les tensioactifs peuvent permettre de délivrer des résidus physiquement encapsulés ou liés à une membrane. Pour améliorer l'accessibilité 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 les résidus chimiquement liés, en particulier toutes les biomolécules ayant incorporé de la radioactivité.

39. 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.

40. 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 des résidus non-extractibles, car elle prouve généralement la dégradation du pesticide en petites unités carbonées qui se sont intégrées dans le pool de carbone. Cette conclusion ne concerne pas les 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.

41. 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 de 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 des résidus non-extractibles ou liés.

FIGURE. 1. Caractérisation/identification du radiomarqueur non extrait



STABILITE DURANT L'ENTREPOSAGE

42. 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.

43. 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.

44. 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.

45. 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

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

Résumé/Introduction

- (i) Objectif de l'étude, notamment les 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 terminaux et de leur distribution dans les produits agricoles bruts. Ces dernières informations seront de préférence résumées sous forme d'un texte assorti de tableaux et/ou de figures.
- (iv) Informations sur la voie métabolique empruntée par le pesticide dans le sol, en particulier relative aux résidus absorbés dans les plantes cultivées en rotation, le cas échéant.
- (v) Conclusion à propos de la nature qualitative des résidus terminaux dans les PAB à la récolte ou lors de leur utilisation dans les aliments pour animaux.
- (vi) Lorsque des études sur les résidus dans des cultures en rotation (études en conditions limitées sur le terrain) sont menées, il est parfois nécessaire de valider l'efficacité d'extraction à l'aide d'échantillons radiomarqués issus de l'étude sur la rotation des cultures en espace clos ou d'une étude de métabolisme végétal (dans le cas où les métabolites ou les analytes sont similaires). L'efficacité d'extraction peut être présentée dans ce même rapport, dans un rapport sur les résidus dans les cultures en rotation, en tant qu'élément d'un rapport sur la méthode analytique, ou à titre de rapport individuel.

Matériels et Méthodes

a) Substance d'essai

- (i) Identification de l'ingrédient actif pesticide de l'essai, notamment, nom chimique ; nom commun, American National Standards Institute (ANSI), British Standards Institution (BSI), ou International Standards Organization (ISO) ; nom ou numéro utilisé pour le développement et l'expérimentation par l'entreprise ; et numéro CAS et nom chimique IUPAC.
- (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 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 radioactive et de la nature et de la source du marqueur radioactif employé dans le matériau d'essai radiomarqué. L'identité des impuretés radiomarquées 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 mégabéquerels par milligramme (MBq/mg), avec un exemple de calcul expliquant comment l'analyste obtient les concentrations de radioactivité (mg de substance active par kg) à partir des données expérimentales. L'information sur les désintégrations doit permettre aux autorités réglementaires compétentes de vérifier la quantité de substance active en mg par kg 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

Description détaillée 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, (c'est-à-dire pourcentages de sable, de limon, d'argile, de matières organiques, pH, capacité d'échange de cations et capacité de rétention d'eau). Une description des moyens mis en œuvre pour confiner la substance d'essai dans les zones environnant les plantations d'essai doit également être proposée et toutes les anomalies météorologiques susceptibles d'affecter l'étude seront signalées.

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

- (i) Identification des cultures alternées de l'essai et de la culture primaire, s'il y a lieu, en particulier type et variété et classification dans un groupe de plantes.
- (ii) Justification ou déclaration établie par les demandeurs expliquant le choix des plantes d'essai n'appartenant pas aux groupes des plantes racines, des légumes à feuilles et des petits grains.
- (iii) Description du mode opératoire de plantation des cultures alternées, du nombre de jours séparant le traitement du sol par le pesticide et la plantation des cultures alternées, et description de tous les protocoles utilisés pour entretenir les cultures alternées. Dans le cas du traitement d'une culture primaire, l'entretien et le retrait de la culture primaire avant la plantation des cultures en rotation doivent être décrits.
- (iv) 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.

- (v) 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.
- (vi) 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.
- (vii) Description détaillée des autres informations pertinentes sur la croissance de la plante d'essai, sur les applications des pesticides d'entretien, et le prélèvement des échantillons. Tout signe de phytotoxicité sur les cultures en rotation doit également être rapporté.

d) Application du pesticide

- (i) Description de l'application du pesticide radiomarké sur le sol, notamment sa formulation (c'est-à-dire, solvant, véhicule, appât, additif ou autre matrice) et toute activité entreprise après l'application (incorporation dans le sol, labour, 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, indiqués en jours entre chaque application et en jours entre la dernière application et la plantation des cultures alternées.
- (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 d'entretien ; et récolte de la plante mature. Toutes les dates doivent être communiquées en nombre de jours à compter de la dernière application de pesticide radioactif.
- (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) Les demandeurs doivent préciser dans quelle mesure les méthodes analytiques utilisées dans l'étude de métabolisme sont capables de déterminer les composants des résidus, qu'ils se présentent sous forme de radiomarqueur libre, conjugué ou non extrait.

- (ii) Méthode de quantification et de détermination de la distribution des résidus radioactifs totaux dans les cultures alternées 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) 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.
- (v) Des 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 doivent être communiqués.
- (vi) 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 des résidus radioactifs totaux, qu'ils soient libres ou liés/conjugués dans les produits agricoles bruts, le cas échéant.

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 des 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 extractible 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) Indication de l'efficacité de séparation et de purification, sur un échantillon représentatif, de toutes les techniques de fractionnement et d'isolement employées dans l'étude (séparation dans des solvants, électrophorèse sous haute tension, d'échange d'ions, chromatographie sur colonne d'exclusion, CLHP sur gradient d'élution, autoradiographie sur couche mince bidimensionnelle dans des systèmes à plusieurs solvants).
- (viii) Présentation des données permettant la mesure ou le suivi de la radioactivité perdue dans chaque étape successive du protocole de fractionnement et discussion des démarches entreprises pour réduire ces pertes.
- (ix) 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.
- (x) Les demandeurs doivent signaler si des quantités significatives des résidus radioactifs originels caractérisés comme radiomarqueur non extrait se sont incorporées dans les produits naturels.
- (xi) 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 originel analysée.

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 (techniques chromatographiques

diverses, dérivation, etc.) ainsi que des méthodes de détermination (spectrométrie de masse, 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 provenant du pesticide initial dans les parties de plantes comestibles utilisées dans l'alimentation humaine ou animale.

Résultats et Discussion

a) Stratégies d'essai

Cette section du rapport doit inclure une discussion des écarts enregistrés par rapport aux protocoles ou aux stratégies d'essai prévus, attribuables à des conditions ou à des difficultés inhabituelles d'ordre expérimental 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.

b) Voies métaboliques

Dans la mesure du possible, il faut présenter une discussion détaillée, assortie d'un schéma de fonctionnement, des voies métaboliques observées dans les PAB étudiés. 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 de métabolisme animal portant sur le composé chimique étudié. Il n'est pas demandé dans cette étude de collecter des données sur les résidus dans le sol, mais il est toutefois possible d'inclure ici des informations sur le comportement métabolique du pesticide dans le sol si celui-ci affecte la nature et la quantité des résidus détectés dans les cultures en rotation. 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.

c) 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 et le radiomarqueur non extrait, notamment par leur nom, leur structure et leur quantité exprimée en

pourcentage des résidus radioactifs totaux et en mg/kg (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 comme aliment pour l'homme ou l'animal, 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 des résidus terminaux, 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 cultures alternées. 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'accumulation dans une étude sur cultures en rotation en milieu clos, en particulier les mesures de contrôle de qualité et les précautions prises pour garantir la validité de tous les aspects de l'étude.

Conclusion

Les sujets suivants doivent être discutés :

- (i) Potentiel d'accumulation des résidus radioactifs totaux provenant du sol dans les cultures alternées après l'utilisation envisagée du pesticide rapporté aux divers intervalles de rotation.
- (ii) Nature, quantité et distribution des résidus radioactifs totaux dans les produits destinés à l'alimentation humaine ou animale au moment de la récolte.
- (iii) Voies métaboliques, mécanismes impliqués et importance ou degré du métabolisme observé dans les PAB étudiés.

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 du composé initial, 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) Exemples de calcul et données brutes représentatives.
- (iii) 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).
- (iv) Autres. Tout matériel pertinent qui n'entre dans aucune des autres sections de ce rapport doit être annexé.

Rapport d'étude

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

- Identification de l'ingrédient actif pesticide de l'essai, en particulier, nom chimique ; nom commun, American National Standards Institute (ANSI), British Standards Institution (BSI), ou International Standards Organization (ISO) ; nom ou numéro utilisé pour le développement et l'expérimentation par l'entreprise ; et numéro CAS et nom chimique IUPAC.
- Description de la ou des substances d'essai radiomarqués et justification du ou des sites de radiomarquage, description de la pureté radioactive, nature du radiomarqueur, activité spécifique (en Mbq/Mg), source, identité des impuretés radiomarquées significatives, le cas échéant.
- Nom, structure, et pureté des étalons de références et des métabolites 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 (c'est-à-dire pourcentages de sable, de limon, d'argile, de matières organiques, pH, capacité d'échange de cations et humidité).

- Description des paramètres d'application : type(s) d'application des pesticides au sol ; formulation dans laquelle le pesticide radiomarqué est appliqué ; méthode d'application ; dose(s) d'application ; nombre et calendrier des applications.
- Description des moyens de confinement de la substance d'essai dans les zones entourant les plantations d'essai.
- Description des intervalles de rotation (en jours à partir de la dernière application de pesticide) et justification de leur choix.
- Description de la culture des plantes alternées, notamment les techniques de récolte, le stade de croissance et la taille des plantes à la récolte, les parties de plantes récoltées et la manipulation et le transport et l'entreposage des parties de plantes récoltées. Il conviendra également de mentionner toute phytotoxicité affectant les cultures alternées.
- 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 désintégration radioactives totales et en pourcentage et concentration (mg/kg par rapport au composé initial) dans la matrice d'échantillon originelle analysée.
- Description complète de tous les instruments, de tout le matériel et de tous les réactifs utilisés, en particulier des conditions de fonctionnement des instruments utilisés pour la séparation, la caractérisation et l'identification des résidus radioactifs.
- Caractérisation et/ou identification des résidus radioactifs, notamment les données concernant tous les constituants majeurs, qu'il s'agisse de 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.
- Discussion détaillée, à laquelle sera jointe une voie métabolique du pesticide observée dans les PAB examinés. Des renseignements sur la voie métabolique du pesticide dans le sol, en particulier en ce qui concerne les éventuels résidus absorbés dans les cultures alternées doivent être fournis.
- Conclusion débattant des points suivants : (1) le potentiel d'accumulation des résidus radioactifs totaux contenus dans le sol dans les cultures alternées après l'utilisation envisagée du pesticide, rapporté aux divers intervalles de rotation, (2) nature, quantité et répartition des résidus

radioactifs totaux dans les produits destinés à l'alimentation humaine ou animale au moment de la récolte ; et (3) voies, importance et degré de métabolisme observé dans les PAB étudiés.

LITTERATURE

- (1) U.S. Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS Harmonized Test Guideline 860.1850. Confined Accumulation in Rotational Crops. EPA Report No. 712-C-96-188, August 1996.
- (2) U.S. Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS Harmonized Test Guideline 860.1900. Field Accumulation in Rotational Crops. EPA Report No. 712-C-96-189, August 1996.
- (3) U.S. Environmental Protection Agency. (1996), OPPTS Harmonized Test Guideline 860.1300. Nature of the Residue – Plants, Livestock. EPA Report No. 712-C-96-172, August 1996.
- (4) Canada. Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire. Ligne directrice sur les caractéristiques chimiques des résidus de l'AMIFAC 98-02.
- (5) European Commission (1997), Appendix C – Testing of plant protection products in rotational crops. Document 7524/VI/95 rev. 2, 22/7/97, Directorate General for Agriculture VI B II-1. http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/publications_en.htm
- (6) 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.
- (7) Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO) (2002). Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed. Rome, 2002.