

**Non classifié**

**ENV/JM/MONO(2001)8**

Organisation de Coopération et de Développement Économiques  
Organisation for Economic Co-operation and Development

**08-Aug-2002**

**Français - Or. Anglais**

**DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT  
REUNION CONJOINTE DU COMITE SUR LES PRODUITS CHIMIQUES ET  
DU GROUPE DE TRAVAIL SUR LES PRODUITS CHIMIQUES, LES PESTICIDES ET  
LA BIOTECHNOLOGIE**

**SÉRIE DE L'OCDE SUR LES ESSAIS ET ÉVALUATIONS  
Numéro 27**

**DOCUMENT D'ORIENTATION POUR L'UTILISATION DU SYSTÈME HARMONISÉ DE  
CLASSIFICATION DES PRODUITS CHIMIQUES DANGEREUX POUR L'ENVIRONNEMENT  
AQUATIQUE**

**JT00130237**

Document complet disponible sur OLIS dans son format d'origine  
Complete document available on OLIS in its original format



**ENV/JM/MONO(2001)8  
Non classifié**

**Français - Or. Anglais**



**Publications de la Division Environnement, Santé et Sécurité de l'OCDE**

**Série sur les essais et les évaluations**

**N° 27**

**DOCUMENT D'ORIENTATION POUR L'UTILISATION DU SYSTÈME  
HARMONISÉ DE CLASSIFICATION DES PRODUITS CHIMIQUES  
DANGEREUX POUR L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE**

**Direction de l'environnement**

**Organisation de coopération et de développement économiques**

**August 2002**

**Titres déjà parus dans la Série sur les essais et les évaluations :**

- N° 1, *Guidance Document for the Development of OECD Guidelines for Testing of Chemicals (1993; reformatted 1995)*
- N° 2, *Detailed Review Paper on Biodegradability Testing (1995)*
- N° 3, *Guidance Document for Aquatic Effects Assessment (1995)*
- N° 4, *Report of the OECD Workshop on Environmental Hazard/Risk Assessment (1995)*
- N° 5, *Report of the SETAC/OECD Workshop on Avian Toxicity Testing (1996)*
- N° 6, *Report of the Final Ring-test of the Daphnia magna Reproduction Test (1997)*
- N° 7, *Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water (1997)*
- N° 8, *Report of the OECD Workshop on Sharing Information about New Industrial Chemicals Assessment (1997)*
- N° 9, *Guidance Document for the Conduct of Studies of Occupational Exposure to Pesticides During Agricultural Application (1997)*
- N° 10, *Report of the OECD Workshop on Statistical Analysis of Aquatic Toxicity Data (1998)*
- N° 11, *Detailed Review Paper on Aquatic Testing Methods for Pesticides and industrial Chemicals (1998)*
- N° 12, *Detailed Review Document on Classification Systems for Germ Cell Mutagenicity in OECD Member Countries (1998)*
- N° 13, *Detailed Review Document on Classification Systems for Sensitising Substances in OECD Member Countries (1998)*
- N° 14, *Detailed Review Document on Classification Systems for Eye Irritation/Corrosion in OECD Member Countries (1998)*
- N° 15, *Detailed Review Document on Classification Systems for Reproductive Toxicity in OECD Member Countries (1998)*
- N° 16, *Detailed Review Document on Classification Systems for Skin Irritation/Corrosion in OECD Member Countries (1998)*

N° 17, *Environmental Exposure Assessment Strategies for Existing Industrial Chemicals in OECD Member Countries (1999)*

N° 18, *Report of the OECD Workshop on Improving the Use of Monitoring Data in the Exposure Assessment of Industrial Chemicals (2000)*

N° 19, *Draft Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals used in Safety Evaluation (1999)*

N° 20, *Revised Draft Guidance Document for Neurotoxicity Testing (en préparation)*

N° 21, *Detailed Review Paper: Appraisal of Test Methods For Sex Hormone Disrupting Chemicals (2000)*

N° 22, *Guidance Document for the Performance of Out-door Monolith Lysimeter Studies (2000)*

N° 23, *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (2000)*

N° 24, *Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (2001)*

N° 25, *Detailed Review Document on Hazard Classification Systems for Specifics Target Organ Systemic Toxicity Repeated Exposure in OECD Member Countries (2001)*

N° 26, *Revised Analysis of Responses Received from Member Countries to the Questionnaire on Regulatory Acute Toxicity Data Needs (2001)*

## A propos de l'OCDE

L'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) est une organisation intergouvernementale au sein de laquelle des représentants de 30 pays industrialisés d'Amérique du Nord, d'Europe et du Pacifique ainsi que de la Commission européenne se réunissent afin de coordonner et d'harmoniser leurs politiques, d'examiner des questions d'intérêt commun et de coopérer à la résolution de problèmes internationaux. La majeure partie des travaux de l'OCDE sont menés à bien par plus de 200 comités spécialisés et groupes subsidiaires composés de délégués des pays Membres. Des observateurs de différents pays possédant un statut spécial auprès de l'OCDE, ainsi que d'organisations internationales intéressées, assistent à nombre d'ateliers et d'autres réunions de l'OCDE. Le Secrétariat de l'OCDE, qui a son siège à Paris (France), assiste les comités et les groupes subsidiaires et se compose de directions et de divisions.

Les travaux de l'OCDE touchant à la sécurité des produits chimiques se déroulent dans le cadre du **Programme sur l'hygiène et la sécurité de l'environnement**. S'agissant des essais de produits chimiques, l'OCDE a arrêté plusieurs Décisions et Recommandations du Conseil (les premières liant juridiquement les pays Membres), et publié de nombreux documents d'orientation et rapports techniques. La plus connue de ces publications, les **Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques**, est un recueil de méthodes utilisées pour évaluer les risques associés à des substances ou préparations chimiques. Les essais couverts par ces méthodes permettent de déterminer les caractéristiques physiques et chimiques, les effets sur la santé humaine et les espèces sauvages, ainsi que l'accumulation et la dégradation dans l'environnement. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques représentent un outil de référence reconnu dans le monde entier.

Le lecteur trouvera des informations complémentaires concernant le Programme sur l'hygiène et la sécurité de l'environnement et ses publications (notamment les lignes directrices pour les essais) sur le site Internet de l'OCDE (voir page 8).

Le Programme sur l'hygiène et la sécurité de l'environnement coopère étroitement avec d'autres organisations internationales. Le présent document a été élaboré dans le cadre du Programme inter-organisations pour la gestion écologiquement rationnelle des produits chimiques (IOMC).

**Le Programme inter-organisations pour la gestion écologiquement rationnelle des produits chimiques (IOMC) a été lancé en 1995 par le PNUE, l'OIT, la FAO, l'OMS, l'ONUDI et l'OCDE (organisations participantes), pour donner suite à la recommandation, formulée en 1992 par la Conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement (CNUED), de renforcer la coopération et d'accroître la coordination internationale dans le domaine de la sécurité chimique. Depuis 1997, l'IOMC compte une septième organisation participante, l'Institut des Nations Unies pour la formation et la recherche (UNITAR). L'objectif de l'IOMC est de promouvoir la coordination des politiques et des activités menées par les Organisations participantes, conjointement ou séparément, en vue d'instaurer une gestion rationnelle des produits chimiques du point de vue de la santé humaine et de l'environnement.**

**Cette publication est disponible gratuitement sous forme électronique.  
Pour en obtenir le texte complet ou celui d'autres publications  
du Programme sur l'hygiène et la sécurité de l'environnement,  
veuillez consulter le site Web de l'OCDE (<http://www.oecd.org/ehs/>)**

**ou contacter la**

**Direction de l'Environnement de l'OCDE,  
Division Environnement, Santé et Sécurité  
2 rue André-Pascal  
75775 Paris Cedex 16  
France**

**Fax : (33-1) 45 24 16 75**

**E-mail : [ehscont@oecd.org](mailto:ehscont@oecd.org)**

## Table des matières Partie 1

### Glossaire des principaux termes utilisés dans le document d'orientation ..... 12

1. INTRODUCTION.....	11
2. LE SCHÉMA DE CLASSIFICATION HARMONISE .....	16
2.1 Champ d'application.....	16
2.2 Catégories et critères de classification .....	16
2.2.1 Toxicité aiguë.....	16
2.2.2 Toxicité chronique .....	17
2.3 Justifications.....	17
2.4 Application.....	19
2.5 Disponibilité des données.....	20
2.6 Qualité des données.....	20
3. TOXICITÉ AQUATIQUE .....	22
3.1 Introduction.....	22
3.2 Description des essais.....	22
3.2.1 Essais sur les poissons.....	23
Essais de toxicité aiguë .....	23
Essais de toxicité chronique .....	23
3.2.2 Essais sur les crustacés.....	23
Essais de toxicité aiguë .....	23
Essais de toxicité chronique .....	24
3.2.3 Essais sur les algues/plantes.....	24
Essais sur les algues .....	24
Essais sur les macrophytes aquatiques .....	24
3.3 Concepts de toxicité aquatique .....	24
3.3.1 Toxicité aiguë.....	24
3.3.2 Toxicité chronique .....	25
3.3.3 Régimes d'exposition .....	26
3.3.4 Milieux d'essai pour les algues.....	26
3.3.5 Utilisation des relations quantitatives structure-activité (qsar) .....	26
3.4 Poids de la preuve .....	27
3.5 Substances difficiles a tester.....	27
3.6 Interprétation de la qualité des données .....	34
3.6.1 Normalisation.....	34
3.6.2 Hiérarchie des données .....	34
Annexe 3.I Lignes directrices pour les essais .....	36
Annexe 3.II Références.....	38
4. DÉGRADATION .....	39
4.1 Introduction .....	39
4.2 Interprétation des données de dégradabilité .....	39
4.2.1 Dégradabilité rapide .....	39
4.2.2 Biodégradabilité facile .....	40
Concentration de la substance d'essai .....	40
Intervalle de temps.....	40
4.2.3 DBO5/DCO .....	41
4.2.4 Autres preuves scientifiques convaincantes .....	41



	Essais de simulation aquatique.....	41
	Études sur le terrain .....	42
	Données de surveillance.....	42
	Essais de biodégradabilité intrinsèque .....	42
	Essais de simulation des stations d'épuration des eaux usées .....	43
	Données de dégradation dans le sol et les sédiments .....	43
	Données de dégradation anaérobie.....	43
	Hydrolyse.....	43
	Dégradation photochimique .....	44
	Estimation de la dégradation.....	44
	Volatilisation.....	44
4.2.5	Absence de données de dégradation .....	45
4.3	Problèmes généraux d'interprétation.....	45
4.3.1	Substances complexes.....	45
4.3.2	Disponibilité de la substance.....	45
4.3.3	Durée de l'essai inférieure à 28 jours .....	45
4.3.4	Biodégradation primaire .....	46
4.3.5	Résultats contradictoires provenant d'essais de "screening" .....	46
4.3.6	Variation des données d'essais de simulation.....	47
4.4	Schéma décisionnel .....	48
	Annexe 4.I Détermination de la dégradabilité des substances organiques .....	50
	Annexe 4.II Facteurs influant sur la dégradabilité dans l'environnement aquatique.....	56
	Annexe 4.III Lignes directrices pour les essais .....	61
	Annexe 4.IV Références.....	64

### Glossaire des principaux termes utilisés dans le document d'orientation <sup>1)</sup>

<b>Substance</b> <sup>2)</sup>	Éléments chimiques et leurs composés, à l'état naturel ou obtenus par un quelconque procédé de production, y compris tous les adjuvants nécessaires pour préserver la stabilité du produit et toutes les impuretés résultant du procédé utilisé, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé sans compromettre la stabilité de la substance ou modifier sa composition.
<b>Mélange</b> <sup>2)</sup>	Mélanges ou solutions composés de deux substances ou plus, dans lesquels ces substances ne réagissent pas.
<b>Substances multicomposants ou substances complexes</b> <sup>3)</sup>	Mélanges contenant une combinaison complexe de substances individuelles, présentant des solubilités et des propriétés physico-chimiques différentes. Dans la plupart des cas, ces substances peuvent être caractérisées comme une série homologue de substances, comportant une certaine plage de longueurs de la chaîne carbonée/nombres de substituants ou de degrés de substitution. Ces matières sont souvent appelées "mélanges complexes", mais dans le présent document d'orientation, elles seront désignées par l'expression "substances multicomposants".
<b>Moyenne géométrique des concentrations avec effet</b>	Antilogarithme de la moyenne de la transformée logarithmique des concentrations pour lesquelles on observe des effets.
<b>Disponibilité</b>	La disponibilité indique dans quelle mesure une substance devient une espèce soluble ou désagrégée. Pour les métaux, elle indique dans quelle mesure la partie ion métallique d'un composé métallique (M <sup>0</sup> ) peut se détacher du reste du composé (molécule).
<b>Biodisponibilité</b>	Mesure dans laquelle une substance est absorbée par un organisme et parvient dans une zone au sein de cet organisme. La biodisponibilité dépend des propriétés physico-chimiques de la substance, de l'anatomie et de la physiologie de l'organisme, de la pharmacocinétique et de la voie d'exposition. La disponibilité n'est pas une condition nécessaire de la biodisponibilité.
<b>Toxicité aiguë</b>	Propriété intrinsèque d'une substance résidant dans sa dangerosité pour un organisme dans le cadre d'une exposition de courte durée à cette substance.
<b>Toxicité chronique</b>	Propriétés potentielles ou réelles d'une substance, résidant dans la capacité de celle-ci de provoquer des effets néfastes sur des organismes aquatiques, au cours d'expositions déterminées en relation avec le cycle de vie de ces organismes.
<b>Dégradation</b>	Décomposition de molécules organiques en molécules plus petites et finalement en dioxyde de carbone, eau et sels.
<b>Bioaccumulation</b>	Résultat net de l'absorption, de la transformation et de l'élimination d'une substance dans un organisme, résultant de l'ensemble des voies d'exposition (via l'atmosphère, l'eau, les sédiments/le sol et l'alimentation).
<b>Bioconcentration</b>	Résultat net de l'absorption, de la transformation et de l'élimination d'une substance dans un organisme, résultant d'une exposition via l'eau.

Note 1. Il convient de considérer tous ces termes et leur description comme des définitions de travail aux seules fins du présent document d'orientation.

Note 2. Cette définition est extraite d'un article [ENV/JM/HCL(99)11] intitulé "Step 2 proposal for Harmonised Classification Criteria for Mixtures" et donc considérée comme une définition provisoire.

Note 3. Les auteurs ont veillé à la cohérence de cette définition avec celle des "substances multicomposants" (ou "substances complexes"), figurant dans le projet de document d'orientation sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges difficiles (*Draft Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*).

## 1. INTRODUCTION

1. Dans le cadre d'une vaste initiative internationale visant l'harmonisation mondiale des systèmes de classification des dangers, des groupes techniques de travail sont parvenus à un accord sur un ensemble de critères susceptible de constituer la base d'un dispositif mondial d'identification des substances dangereuses pour l'environnement aquatique. Ce dispositif fait partie intégrante d'un accord international sur la classification des substances en termes de danger. Les critères, qui ont été approuvés par la Réunion conjointe de l'OCDE de novembre 1998, font partie du Système mondial harmonisé de classification (GHS) dont la mise en place, sous l'égide du Conseil économique et social (ECOSOC), était prévue en 2001 (voir appendice). Lors de la mise au point de ces critères, il a été reconnu que les informations détaillées nécessaires à la définition correcte du danger pour l'environnement aboutissaient à un système complexe, dont l'exploitation nécessiterait des orientations appropriées. La proposition harmonisée fait plusieurs fois référence à un Document d'orientation afin d'expliquer de manière détaillée le dispositif. L'objectif de ce document est donc double :

- fournir une description du système et des orientations sur son fonctionnement ;
- fournir des orientations pour l'interprétation des données, utilisables dans l'application des critères de classification.

2. Le schéma de classification des dangers a été mis au point dans le but d'identifier les substances chimiques qui présentent, par leurs propriétés intrinsèques, un danger pour l'environnement aquatique. Dans ce contexte, l'environnement aquatique désigne les écosystèmes d'eau douce et marins, ainsi que les organismes qui y vivent. Pour la plupart des substances, la majorité des données disponibles concernent ce compartiment environnemental. Cette définition a une portée limitée dans la mesure où elle n'intègre encore ni les sédiments aquatiques, ni les organismes supérieurs situés au sommet de la chaîne alimentaire aquatique, bien que ceux-ci puissent être couverts, jusqu'à un certain point, par les critères sélectionnés.

3. Il est largement reconnu que, malgré sa portée limitée, ce compartiment de l'environnement est doublement vulnérable, du fait qu'il constitue le milieu récepteur final de nombreuses substances nocives et que les organismes qui y vivent sont sensibles. Il est également complexe, car tout système cherchant à identifier les dangers pour l'environnement doit s'efforcer de définir ces impacts en termes d'effets plus larges sur les écosystèmes, plutôt que sur des individus appartenant à une espèce ou à une population donnée. Comme on le décrira plus en détail dans les chapitres suivants, un ensemble limité de propriétés spécifiques des substances chimiques a été sélectionné pour décrire au mieux le danger : toxicité aquatique, absence de dégradabilité, et bioaccumulation potentielle ou réelle. Les raisons ayant motivé le choix de ces données comme moyens de définir le danger pour le milieu aquatique seront exposées plus en détail dans le chapitre 2.

4. A ce stade, l'application des critères est également limitée aux substances chimiques. Le terme substance couvre une large palette de produits chimiques, dont un grand nombre est très difficile à classer selon un système reposant sur des critères rigides. Les chapitres suivants fourniront donc un certain nombre d'indications sur la manière de faire face à ces difficultés, en s'appuyant à la fois sur l'expérience pratique et sur des arguments scientifiques clairs. Dans ce contexte, les substances sont définies dans le document *Step 2 Proposal for Harmonised Classification Criteria for Mixtures* [ENV/JM/HCL(99)11] comme "des éléments chimiques et leurs composés, à l'état naturel ou obtenus par un quelconque procédé de production, y compris tous les adjuvants nécessaires pour préserver la stabilité du produit et toutes les impuretés résultant du procédé utilisé, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé sans compromettre la stabilité de la substance ou modifier sa composition". Bien que les critères harmonisés s'appliquent plus facilement à la classification de substances individuelles de structure définie, certaines matières relevant de cette définition sont souvent appelées "mélanges complexes". Dans la plupart des cas, elles peuvent être caractérisées comme une série homologue de substances comportant une certaine plage

de longueurs de la chaîne carbonée, de nombres de substituants ou de degrés de substitution. On a mis au point des méthodologies d'essai spéciales, qui fournissent des données permettant d'évaluer le danger intrinsèque pour les organismes aquatiques, la bioaccumulation et la dégradation. Des orientations plus précises sont formulées dans les différents chapitres consacrés à ces caractéristiques. Aux fins du présent Document d'orientation, ces matières seront appelées "substances complexes" ou "substances multicomposants".

5. Si certains aspects des critères peuvent s'appliquer aux mélanges chimiques, l'interprétation des données d'essai est souvent complexe et ambiguë, et il est possible qu'une autre méthode de classification, telle qu'un calcul reposant sur les composants, soit préférée. Les bases d'une stratégie harmonisée de classification des mélanges sont encore à l'étude et, bien que les critères soient destinés à étayer les décisions futures, il ne semble pas actuellement possible ou souhaitable de les appliquer directement aux mélanges.

6. Chacune de ces propriétés (à savoir toxicité aquatique, dégradabilité et bioaccumulation) peut présenter des problèmes d'interprétation complexes, même pour des experts. S'il existe des lignes directrices pour les essais acceptées au niveau international, qui devraient être appliquées à la totalité des nouvelles données produites, nombre des données utilisables dans la classification n'auront pas été générées selon de tels essais normalisés. Même dans les cas où l'on a procédé à des essais normalisés, certaines substances comme les substances complexes, les substances instables en solution aqueuse, les polymères, etc., posent de délicats problèmes d'interprétation lors de l'exploitation des résultats dans le cadre d'un schéma de classification. On dispose ainsi de données pour une grande variété d'organismes d'essai normalisés et non normalisés, d'origine marine ou d'eau douce, et pour des durées et des objectifs d'essai variables. Les données de dégradation peuvent être biotiques ou abiotiques et peuvent être diversement pertinentes pour l'environnement. Pour de nombreuses substances chimiques organiques, le potentiel de bioaccumulation peut être indiqué par le coefficient de partage octanol-eau. Ce potentiel peut cependant être affecté par beaucoup d'autres facteurs, qui devront aussi être pris en compte.

7. L'objet d'un système mondial harmonisé est à l'évidence, après être convenu d'un jeu commun de critères, d'utiliser également un ensemble commun de données de manière à ce qu'une fois réalisée, la classification soit universellement acceptée. Pour ce faire, il faut d'abord parvenir à une compréhension commune du type de données pouvant être utilisé pour appliquer les critères (nature et qualité) et, ultérieurement, à une interprétation commune des données lors de leur évaluation en fonction de ces critères. De ce fait, on a ressenti la nécessité d'élaborer un document d'orientation transparent, visant à étendre et à expliquer les critères de telle sorte qu'il soit possible d'aboutir à une convergence de vues sur leur raison d'être et à une méthode commune d'interprétation des données. Cet aspect est particulièrement important dans la mesure où tout système harmonisé appliqué à "l'univers des produits chimiques" reposera dans une large mesure sur des classifications établies par les fabricants et les fournisseurs eux-mêmes, classifications qui devront être acceptées au niveau international, sans avoir toujours fait l'objet d'un examen rigoureux par les instances réglementaires. Le présent document d'orientation vise donc à informer le lecteur dans un certain nombre de domaines clés, et par conséquent à le guider de manière cohérente vers la classification, garantissant ainsi un système véritablement harmonisé et autonome.

8. En premier lieu, ce document fournira une description détaillée des critères, une justification de leur sélection et une vue d'ensemble du fonctionnement pratique du système (chapitre 2). Ce chapitre traitera des sources communes de données, de la nécessité d'appliquer un critère de qualité, de la façon de procéder au classement lorsque le jeu de données est incomplet ou lorsqu'un jeu de données volumineux conduit à une classification ambiguë, et d'autres problèmes de classification couramment rencontrés.

9. En second lieu, le document d'orientation fournira des conseils techniques détaillés sur l'interprétation des données obtenues à partir des bases de données disponibles, y compris sur la façon

d'exploiter les données non normalisées et sur les critères de qualité spécifiques pouvant s'appliquer aux différentes propriétés. Il décrira les problèmes d'interprétation des données pour les "substances difficiles", c'est-à-dire les substances pour lesquelles les méthodes d'essai normalisées sont inapplicables ou donnent lieu à des difficultés d'interprétation, et apportera des conseils quant aux solutions appropriées. L'accent sera mis sur l'interprétation des données, plutôt que sur les essais, car le système fera appel, dans la mesure du possible, aux meilleures données disponibles et aux données requises par la réglementation. Les trois propriétés principales, à savoir toxicité aquatique (chapitre 3), dégradabilité (chapitre 4) et bioaccumulation (chapitre 5), seront examinées séparément.

10. L'éventail des problèmes d'interprétation peut être large, aussi l'interprétation dépendra-t-elle toujours de l'aptitude et des compétences des individus responsables de la classification. Cependant, il est possible de recenser certaines difficultés courantes et de donner des indications correspondant à un jugement d'expert accepté et susceptible de faciliter l'obtention d'un résultat fiable et cohérent. Ces difficultés peuvent être regroupées dans un certain nombre de catégories qui se recoupent :

- a) difficultés pour appliquer les procédures d'essai actuelles certains types de substances ;
- b) difficultés pour interpréter les données obtenues tant pour ces substances "difficiles à tester" que pour d'autres ;
- c) difficultés pour interpréter divers jeux de données provenant d'une grande variété de sources.

11. Pour nombre de substances organiques, les essais et l'interprétation des données ne présentent aucun problème lorsqu'on applique à la fois les lignes directrices de l'OCDE pertinentes et les critères de classification. Divers problèmes d'interprétation typiques peuvent cependant être caractérisés par le type de substance examiné. Ces substances sont couramment appelées "substances difficiles".

- substances peu solubles : ces substances sont difficiles à tester car elles présentent des problèmes de préparation des solutions, ainsi que de maintien et de vérification des concentrations lors des essais de toxicité aquatique. En outre, bon nombre des données disponibles pour ces substances ont été obtenues en utilisant des "solutions" de concentration supérieure à la solubilité dans l'eau, d'où d'importants problèmes d'interprétation pour définir la véritable CL(E)<sub>50</sub> à des fins de classification. L'interprétation de la façon dont s'effectue le partage peut aussi être problématique dans les cas où la faible solubilité dans l'eau et l'octanol est associée à une sensibilité insuffisante de la méthode d'analyse. Il peut être difficile de déterminer la solubilité dans l'eau, qui est souvent indiquée simplement comme inférieure à la limite de détection, ce qui crée des problèmes dans l'interprétation des études de toxicité aquatique et de bioaccumulation. Dans les études de biodégradation, une solubilité réduite peut entraîner une faible biodisponibilité et par conséquent des vitesses de biodégradation plus faibles que prévu. La méthode d'essai particulière ou le choix des procédures appliquées peuvent donc revêtir une importance déterminante.
- substances instables : les substances qui se dégradent (ou réagissent) rapidement dans le système d'essai posent encore une fois des problèmes tant d'essai que d'interprétation. Il sera nécessaire de déterminer si la bonne méthodologie a été utilisée, si c'est la substance ou le produit de dégradation/réaction qui a été testé, et si les données obtenues sont pertinentes pour la classification de la substance mère.
- substances volatiles : de telles substances, qui peuvent à l'évidence présenter des problèmes lors des essais quand elles sont utilisées dans des systèmes ouverts, doivent faire l'objet d'une évaluation visant à garantir un maintien adéquat des concentrations d'exposition. Les pertes de matériau d'essai au cours des essais de biodégradation sont inévitables avec certaines méthodes et conduiront à une mauvaise interprétation des résultats.

- substances complexes ou multicomposants : il est fréquent que de telles substances, par exemple des mélanges d'hydrocarbures, ne puissent être dissoutes pour former une solution homogène et la multiplicité des composants rend la surveillance impossible. Il faut donc veiller à se servir de données provenant d'essais de toxicité aquatique portant sur des fractions adaptées à l'eau (FAE) et à utiliser ces données dans le schéma de classification. Les caractéristiques de biodégradation, de bioaccumulation, de comportement en matière de partage et de solubilité dans l'eau posent toutes des problèmes d'interprétation, dans la mesure où chaque composant du mélange peut se comporter différemment.
- polymères : de telles substances présentent souvent une gamme étendue de masses moléculaires, dont une partie seulement est soluble dans l'eau. On dispose de méthodes spéciales pour déterminer la fraction hydrosoluble et cette information devra être utilisée pour interpréter les données d'essai en fonction des critères de classification.
- composés inorganiques et métaux : de telles substances, susceptibles d'interagir avec le milieu, peuvent produire des toxicités aquatiques variables en fonction de facteurs tels que le pH, la dureté de l'eau, etc. Des problèmes d'interprétation peuvent se présenter concernant les essais d'éléments essentiels bénéfiques à certaines concentrations. Pour les métaux et les composés métalliques inorganiques, le concept de biodégradabilité, tel qu'appliqué aux composés organiques, n'a que peu ou pas de signification. De même, il convient de faire preuve de prudence dans l'utilisation des données de bioaccumulation.
- substances tensioactives : de telles substances peuvent former des émulsions, dans lesquelles la biodisponibilité est difficile à déterminer, même avec une préparation soignée des solutions. Une formation de micelles peut résulter de la surestimation de la fraction biodisponible, même lorsque des "solutions" sont apparemment formées. Ce phénomène pose des problèmes d'interprétation importants pour chacune des caractéristiques : solubilité dans l'eau, coefficient de partage, bioaccumulation et toxicité aquatique.
- substances ionisables : de telles substances peuvent modifier le degré d'ionisation en fonction de la quantité de contre-ions dans le milieu. Les acides et les bases, par exemple, manifesteront un comportement en matière de partage radicalement différent selon le pH.
- substances colorées : de telles substances peuvent entraîner des problèmes lors des essais sur les algues ou les plantes aquatiques, en bloquant la lumière incidente.
- impuretés : certaines substances peuvent contenir des impuretés dont la proportion et la nature chimique peuvent varier d'un lot de production à un autre. Des problèmes d'interprétation peuvent intervenir lorsque la toxicité ou la solubilité dans l'eau, ou ces deux caractéristiques, sont plus élevées pour les impuretés que pour la substance mère, ce qui est susceptible d'influer de manière importante sur les données de toxicité.

12. Cette énumération représente certains des problèmes rencontrés pour établir l'adéquation des données, les interpréter et les appliquer au schéma de classification. Des indications détaillées sur la façon d'aborder ces problèmes, et sur d'autres aspects connexes, seront présentées dans les chapitres suivants. L'interprétation des données de toxicité aquatique sera examinée dans le chapitre 3. Ce chapitre traite des problèmes d'interprétation spécifiques aux "substances difficiles" précédemment mentionnées, et contient également des conseils sur le moment et la manière d'utiliser ces données dans le schéma de classification. Il présente aussi une description générale des données d'essai utilisées et des méthodologies d'essai adaptées à l'obtention de ces données.

13. On dispose d'une gamme étendue de données de dégradation, qui doivent être interprétées selon les critères de dégradabilité rapide. Des indications sont donc nécessaires sur la façon d'employer les données de ce type obtenues à l'aide de méthodes d'essai non normalisées, notamment sur l'utilisation des demi-vies lorsqu'elles sont disponibles, de la dégradation primaire, des vitesses de dégradation dans le sol et des vitesses de dégradation dans l'environnement, ainsi que sur la possibilité d'extrapoler les vitesses de dégradation dans le sol à la dégradation aquatique. Une description succincte des techniques d'évaluation de la dégradabilité en fonction des critères de classification est aussi présentée. Ces indications figurent au chapitre 4.

14. Le chapitre 5 décrit des méthodes permettant de déterminer le potentiel de bioaccumulation. Il présente la relation entre les critères relatifs au coefficient de partage et le facteur de bioconcentration (FBC), fournit des orientations sur l'interprétation des données existantes, sur la façon d'estimer le coefficient de partage à partir des relations quantitatives structure-activité (QSAR) en l'absence de données expérimentales, et en particulier sur les problèmes spécifiques identifiés précédemment pour les substances difficiles. Les problèmes rencontrés dans le traitement des substances de masse moléculaire élevée sont également couverts.

15. Un chapitre est également consacré aux questions générales portant sur l'utilisation des QSAR dans le système : quand et comment peut-on employer ces relations pour chacune des trois propriétés examinées. En tant qu'approche générale, il est largement reconnu que les données expérimentales, lorsqu'elles sont disponibles, doivent être utilisées de préférence aux données de type QSAR. L'utilisation des QSAR sera ainsi limitée aux situations dans lesquelles on ne dispose pas de données fiables. Cependant, toutes les substances ne se prêtent pas à l'application des estimations de type QSAR et les orientations fournies au chapitre 6 traiteront cette question.

16. Enfin, un chapitre est consacré aux problèmes particuliers que pose la classification des métaux et de leurs composés. Il est évident que pour ces composés, un certain nombre de critères spécifiques tels que la biodégradabilité et le coefficient de partage octanol-eau sont inapplicables, même si l'absence de destruction par dégradation et la bioaccumulation restent des concepts importants. Il est donc nécessaire d'adopter une approche différente. Les métaux et les composés métalliques peuvent subir des interactions avec le milieu qui influent sur la solubilité de l'ion métallique, le partage à partir de la colonne d'eau et l'espèce d'ion métallique présente dans cette colonne. Dans la colonne d'eau, ce sont généralement les ions métalliques dissous qui interviennent dans la toxicité. L'interaction de la substance avec le milieu peut accroître ou diminuer la quantité d'ions et par conséquent la toxicité. Il est donc nécessaire de déterminer si des ions métalliques sont susceptibles de se former à partir de la substance et, dans l'affirmative, si leur formation est suffisamment rapide pour être préoccupante. Le chapitre 7 présente un schéma d'interprétation pour les résultats de ce type d'étude.

17. Bien que ce document d'orientation donne des informations utiles sur la façon d'appliquer les critères à une large palette de situations, il n'a qu'un caractère indicatif. Il ne saurait prétendre couvrir toutes les situations qui se présentent lors de la classification. Il doit donc être considéré comme un document évolutif qui décrit les principes fondamentaux du système, en se fondant par exemple sur les dangers plutôt que sur les risques, ainsi que les critères fixés. Il doit également constituer un recueil de l'expérience acquise dans l'utilisation du schéma, de manière à présenter les interprétations permettant d'appliquer les critères apparemment fixes à une grande variété de situations "non-standard".

## 2. LE SCHÉMA DE CLASSIFICATION HARMONISE

### 2.1 CHAMP D'APPLICATION

18. Des critères ont été mis au point en tenant compte de systèmes existants de classification des dangers, tels que le système européen applicable à la fourniture et à l'utilisation des substances chimiques, les systèmes canadien et américain de classification des pesticides, la procédure d'évaluation des risques du GESAMP, le dispositif de l'OMI applicable aux polluants marins, le Schéma européen de transport routier et ferroviaire (RID/ADR) et le *Land Transport Scheme* des Etats-Unis. Ces systèmes couvrent la fourniture et l'utilisation ultérieure des produits chimiques, le transport maritime de substances chimiques, ainsi que le transport routier et ferroviaire de telles substances. Les critères harmonisés sont par conséquent destinés à identifier d'une façon commune les produits chimiques dangereux, en vue d'une utilisation dans l'ensemble de ces systèmes. Pour répondre aux besoins des différents secteurs (transport, approvisionnement et utilisation), il était nécessaire de créer deux catégories de classification distinctes : l'une correspondant aux dangers aigus et regroupant trois sous-catégories, l'autre concernant les dangers chroniques et comprenant quatre sous-catégories. La catégorie des dangers aigus comprend deux sous-catégories (aigu II et III) qui ne sont normalement pas utilisées lorsqu'il s'agit de marchandises emballées. Pour les substances transportées en vrac, un certain nombre de décisions réglementaires n'interviennent que parce qu'il s'agit de grandes quantités. Dans ce type de situation, par exemple lorsqu'il faut décider du type de bateau à utiliser, la prise en compte de toutes les catégories de danger aigu et des catégories de danger chronique est considérée comme importante. Les paragraphes suivants décrivent de manière détaillée les critères à utiliser pour définir chacune de ces catégories de danger.

### 2.2 CATÉGORIES ET CRITÈRES DE CLASSIFICATION

19. Les catégories de danger ont été définies en fonction des critères exposés ci-après.

#### 2.2.1 Toxicité aiguë

##### **Catégorie : danger aigu I**

Toxicité aiguë :

CL <sub>50</sub> à 96 h (pour les poissons)	≤ 1 mg/L et/ou
CE <sub>50</sub> à 48 h (pour les crustacés)	≤ 1 mg/L et/ou
CEr <sub>50</sub> à 72 ou 96 h (pour les algues et autres végétaux aquatiques)	≤ 1 mg/L.

La catégorie danger aigu I peut être subdivisée pour certains systèmes réglementaires de manière à intégrer une plage inférieure correspondant à CL(E)<sub>50</sub> ≤ 0.1 mg/L.

##### **Catégorie : danger aigu II**

Toxicité aiguë :

CL <sub>50</sub> à 96 h (pour les poissons)	1 < - ≤ 10 mg/L et/ou
CE <sub>50</sub> à 48 h (pour les crustacés)	1 < - ≤ 10 mg/L et/ou
CEr <sub>50</sub> à 72 ou 96 h (pour les algues et autres végétaux aquatiques)	1 < - ≤ 10 mg/L.

##### **Catégorie : danger aigu III**

Toxicité aiguë :

CL <sub>50</sub> à 96 h (pour les poissons)	10 < - ≤ 100 mg/L et/ou
CE <sub>50</sub> à 48 h (pour les crustacés)	10 < - ≤ 100 mg/L et/ou
CEr <sub>50</sub> à 72 ou 96 h (pour les algues et autres végétaux aquatiques)	10 < - ≤ 100 mg/L.

Certains systèmes réglementaires peuvent prévoir une extension de la plage de CL(E)<sub>50</sub> au-delà de 100 mg/L en introduisant une autre catégorie.



## 2.2.2 Toxicité chronique

### **Catégorie : danger chronique I**

Toxicité aiguë :

CL<sub>50</sub> à 96 h (pour les poissons) ≤ 1 mg/L et/ou

CE<sub>50</sub> à 48 h (pour les crustacés) ≤ 1 mg/L et/ou

CEr<sub>50</sub> à 72 ou 96 h (pour les algues et autres végétaux aquatiques) ≤ 1 mg/l

et la substance n'est pas rapidement dégradable et/ou le log K<sub>oc</sub> est ≥ 4 (à moins que le FBC déterminé expérimentalement ne soit < 500).

### **Catégorie : danger chronique II**

Toxicité aiguë

CL<sub>50</sub> à 96 h (pour les poissons) 1 < - ≤ 10 mg/L et/ou

CE<sub>50</sub> à 48 h (pour les crustacés) 1 < - ≤ 10 mg/L et/ou

CEr<sub>50</sub> à 72 ou 96 h (pour les algues et autres végétaux aquatiques) 1 < - ≤ 10 mg/l

et la substance n'est pas rapidement dégradable et/ou le log K<sub>oc</sub> est ≥ 4 (à moins que le FBC déterminé expérimentalement ne soit < 500), sauf si la CSEO pour la toxicité chronique est > 1 mg/L.

### **Catégorie : danger chronique III**

Toxicité aiguë :

CL<sub>50</sub> à 96 h (pour les poissons) 10 < - ≤ 100 mg/L et/ou

CE<sub>50</sub> à 48 h (pour les crustacés) 10 < - ≤ 100 mg/L et/ou

CEr<sub>50</sub> à 72 ou 96 h (pour les algues et autres végétaux aquatiques) 10 < - ≤ 100 mg/l

et la substance n'est pas rapidement dégradable et/ou le log K<sub>oc</sub> est ≥ 4 (à moins que le FBC déterminé expérimentalement ne soit < 500), sauf si la CSEO pour la toxicité chronique est > 1 mg/L.

### **Catégorie : danger chronique IV**

Les substances peu solubles pour lesquelles on n'enregistre aucune toxicité aiguë jusqu'au niveau de la solubilité dans l'eau, qui ne sont pas rapidement dégradables et qui présentent une valeur de log K<sub>oc</sub> ≥ 4, indiquant un potentiel de bioaccumulation, seront classées dans cette catégorie, à moins qu'il existe une autre preuve scientifique de l'inutilité de ce classement. Cette preuve pourrait être notamment un FBC déterminé expérimentalement comme < 500, une CSEO pour la toxicité chronique > 1 mg/L ou la mise en évidence d'une dégradation rapide dans l'environnement.

## 2.3 JUSTIFICATIONS

20. Le système harmonisé de classification tient compte du fait que le danger intrinsèque pour les organismes aquatiques est représenté à la fois par la toxicité aiguë et par la toxicité chronique ou à long terme d'une substance, leur importance relative étant déterminée par les régimes réglementaires spécifiques en vigueur. Il est possible d'opérer une distinction entre danger aigu et danger chronique, et donc de définir des catégories de danger séparées pour ces deux propriétés, qui représentent une gradation du niveau de danger identifié. Il est clair que le danger défini par la catégorie chronique I est plus grave que celui représenté par la catégorie chronique II. Les dangers chroniques et aigus représentant des types de danger distincts, ils ne peuvent être comparés sous l'angle de leur gravité relative. Pour établir une base destinée à l'ensemble des systèmes réglementaires, il convient d'appliquer de manière indépendante les deux classes de danger aux fins de la classification des substances.

21. Les principales plages de danger définies par les critères concernent dans une large mesure le potentiel de danger chronique. Cette situation reflète la préoccupation majeure à l'égard des produits chimiques dans l'environnement, à savoir que les effets provoqués sont habituellement des effets sublétaux,

par exemple des effets sur la reproduction, dus à des expositions à long terme. Tout en reconnaissant que les dangers chroniques représentent la principale préoccupation, en particulier pour les marchandises emballées, pour lesquelles les rejets dans l'environnement sont d'une ampleur limitée, il faut également admettre que les données relatives à la toxicité chronique sont coûteuses à obtenir et ne sont généralement pas aisément accessibles pour la plupart des substances. En revanche, les données de toxicité aiguë sont souvent aisément disponibles ou peuvent être obtenues selon des protocoles hautement normalisés. C'est donc cette toxicité aiguë qui a été utilisée comme caractéristique principale pour définir à la fois le danger aigu et le danger chronique. Il est néanmoins admis que lorsqu'on dispose de données sur la toxicité chronique, celles-ci devraient pouvoir être utilisées pour définir la plage de danger appropriée. La mise au point de critères spécifiques faisant appel à ces données constitue donc une priorité majeure dans l'évolution future du schéma de classification.

22. Tout en reconnaissant que la toxicité aiguë elle-même n'est pas un moyen de prédiction suffisamment précis de la toxicité chronique pour être utilisée seule et directement en vue de définir le danger, on considère qu'elle peut être employée, en association avec un potentiel de bioaccumulation (c'est-à-dire, un  $\log K_{oc} \geq 4$  à moins que le FBC ne soit  $< 500$ ) ou une exposition à long terme potentielle (c'est-à-dire une absence de dégradation rapide), comme substitut approprié à des fins de classification. Les substances qui présentent une toxicité aiguë et qui s'accumulent dans les milieux biologiques à un degré important manifesteront généralement une toxicité chronique à des concentrations sensiblement plus faibles. Les rapports précis entre les toxicités chronique et aiguë sont difficiles à prédire et les données de substitution sont donc généralement prudentes. De même, des substances qui ne se dégradent pas rapidement sont davantage susceptibles de donner lieu à des expositions prolongées, lesquelles peuvent, à leur tour, entraîner une toxicité à long terme. Ainsi, une substance sera classée dans la catégorie de danger chronique I, si l'un ou l'autre des critères suivants est satisfait :

i)  $CL(E)_{50}$  pour n'importe quelle espèce aquatique appropriée  $\leq 1$  mg/L et potentiel de bioaccumulation ( $\log K_{oc} \geq 4$ , à moins que le FBC ne soit  $< 500$ ).

ii)  $CL(E)_{50}$  pour n'importe quelle espèce aquatique appropriée  $\leq 1$  mg/L et absence de dégradation rapide.

23. Les définitions précises de la toxicité aiguë d'une espèce appropriée, de l'absence de dégradation rapide et du potentiel de bioaccumulation figurent dans les chapitres 3, 4 et 5, respectivement.

24. Pour certaines substances peu solubles, normalement considérées comme celles présentant une hydrosolubilité  $< 1$  mg/L, aucune toxicité aiguë ne s'exprime dans les essais de toxicité réalisés à la limite de solubilité. Cependant, si le FBC est  $\geq 500$  ou absent, si le  $\log K_{oc}$  est  $\geq 4$  (ce qui indique un potentiel de bioaccumulation) et si la substance n'est pas rapidement dégradable, on applique une classification constituant un "filet de sécurité", la catégorie de danger chronique IV. Pour les substances de ce type, la durée d'exposition lors des essais de courte durée peut être trop brève pour que la concentration de la substance dans les organismes d'essai atteigne une valeur correspondant au régime permanent. C'est pourquoi, même si aucune toxicité aiguë n'a été mesurée dans un essai à court terme (aigu), il demeure réellement possible que de telles substances, non rapidement dégradables et sujettes à une bioaccumulation, exercent des effets chroniques, sachant notamment qu'une telle dégradabilité réduite peut entraîner une durée d'exposition prolongée dans le milieu aquatique.

25. Lors de la définition de la toxicité aiguë pour le milieu aquatique, il est impossible de tester toutes les espèces présentes dans l'écosystème aquatique. On choisit donc des espèces représentatives qui couvrent un éventail de niveaux trophiques et de groupements taxonomiques. Les taxons retenus (poissons, crustacés et plantes aquatiques) pour constituer le "jeu de base" dans la plupart des profils de danger représentent un ensemble de données minimal pour une validation complète du danger. On utilisera

normalement la plus faible des valeurs de toxicité disponibles pour définir la catégorie de danger. Compte tenu de la grande diversité des espèces présentes dans l'environnement, les trois testées ne peuvent constituer qu'une représentation approximative, et par prudence on prend donc la valeur la plus faible pour définir la plage de danger. Ce faisant, on reconnaît que la sensibilité des espèces peut se répartir sur plusieurs ordres de grandeur et qu'il y aura donc des espèces plus sensibles et des espèces moins sensibles dans l'environnement. Ainsi, lorsqu'on dispose de données limitées, l'utilisation des espèces les plus sensibles donne une définition prudente, mais acceptable du danger. Dans certaines circonstances, il peut être inopportun d'employer la valeur de toxicité la plus faible comme base de la classification. Ces circonstances se limiteront habituellement aux cas où l'on peut définir la distribution de sensibilité avec une plus grande précision qu'à l'habitude, notamment lorsqu'on dispose d'ensembles de données importants. De tels ensembles de données doivent être évalués avec les précautions de rigueur.

## 2.4 APPLICATION

26. D'une manière générale, pour décider du classement d'une substance, il convient de rechercher des bases de données et d'autres sources de données appropriées pour obtenir les éléments d'information suivants :

- solubilité dans l'eau
- coefficient de partage octanol-eau ( $\log K_{oe}$ )
- facteur de bioconcentration chez les poissons (FBC)
- toxicité aquatique aiguë [ $C(E)E_{50}$ ]
- toxicité aquatique chronique (CSEO)
- dégradation disponible (et preuve spécifique d'une biodégradabilité facile)
- données de stabilité dans l'eau.

Bien qu'elles ne soient pas directement utilisées dans les critères, les données de solubilité et de stabilité dans l'eau sont néanmoins importantes car elles apportent une aide utile dans l'interprétation des données relatives aux autres propriétés (voir paragraphe 11).

27. Pour procéder à la classification, il convient d'abord d'examiner les données de toxicité aquatique disponibles. Il sera nécessaire de prendre en compte toutes les données disponibles et de choisir celles qui répondent aux critères de qualité requis pour la classification. Si l'on ne dispose d'aucune donnée satisfaisant aux critères de qualité imposés par les méthodes normalisées à l'échelle internationale, il faudra examiner toutes les données disponibles afin de déterminer si une classification peut être effectuée. Si les données indiquent une toxicité aquatique aiguë  $CL(E)_{50}$  supérieure à 100 mg/L pour une substance soluble, cette substance ne sera pas classée comme dangereuse. Dans un certain nombre de cas, on n'observe aucun effet au cours de l'essai et l'on mentionne alors une toxicité aquatique supérieure à la valeur de solubilité dans l'eau, c'est-à-dire une absence de toxicité aiguë dans la plage de concentrations allant jusqu'à la solubilité dans l'eau dans le milieu d'essai. Dans un tel cas, et lorsque la solubilité dans le milieu d'essai est  $\geq 1$  mg/L, encore une fois, aucune classification n'est appliquée.

28. Lorsque les données de toxicité aquatique les plus faibles sont inférieures à 100 mg/L, il convient premièrement de décider dans quelle plage de danger s'inscrit la toxicité, puis de déterminer si la substance relève d'une catégorie de danger chronique et/ou aigu. Cette décision se prend simplement en examinant les données disponibles concernant le coefficient de partage, le  $\log K_{oe}$  et la dégradation. Si le  $\log K_{oe}$  est  $\geq 4$  ou si la substance ne peut être considérée comme rapidement dégradable, on applique la catégorie de danger chronique appropriée et la catégorie aiguë correspondante de manière indépendante. Bien que le  $\log K_{oe}$  constitue l'indication la plus facile à obtenir d'un potentiel de bioaccumulation, il convient de noter qu'un FBC déterminé expérimentalement est préférable. Lorsque cette valeur est disponible, elle doit être utilisée de préférence au coefficient de partage. Dans ces conditions, un  $FBC \geq 500$  indiquerait une

bioaccumulation suffisante pour classer la substance dans la catégorie de danger chronique appropriée. Si la substance est rapidement dégradable et présente un faible potentiel de bioaccumulation ( $FBC < 500$  ou, en l'absence du FBC,  $\log K_{oc} < 4$ ), la substance ne doit pas être classée dans une plage de danger chronique, seules les plages de danger aigu devant être appliquées (voir paragraphe 18).

29. Dans le cas de substances peu solubles, généralement celles présentant une hydrosolubilité dans le milieu d'essai  $< 1 \text{ mg/L}$ , et qui ne manifestent aucune toxicité aquatique, il convient de poursuivre l'examen afin de déterminer s'il faut les classer dans la catégorie de danger chronique IV. Ainsi, si la substance ne se dégrade pas rapidement et présente un potentiel de bioaccumulation ( $FBC \geq 500$  ou, en l'absence de FBC,  $\log K_{oc} \geq 4$ ), elle entre dans la catégorie de danger chronique IV.

## 2.5 DISPONIBILITÉ DES DONNÉES

30. Les données utilisées pour la classification des substances peuvent être tirées des informations requises à des fins réglementaires et des publications pertinentes, encore qu'un certain nombre de bases de données internationalement reconnues puissent constituer un bon point de départ. Ces bases de données présentent une qualité et une exhaustivité variables, et il est peu probable qu'une seule d'entre elles contienne toutes les informations nécessaires au classement à effectuer. Certaines bases de données sont spécialisées dans la toxicité aquatique et d'autres dans le devenir environnemental. Le fournisseur du produit chimique a l'obligation de procéder aux recherches et aux contrôles nécessaires pour déterminer l'étendue et la qualité des données disponibles, et de les utiliser dans l'affectation de la plage de danger appropriée.

## 2.6 QUALITÉ DES DONNÉES

31. L'utilisation précise qui doit être faite des données disponibles sera décrite dans le chapitre concerné, mais en règle générale, les données obtenues selon des lignes directrices internationales normalisées et dans le respect des Bonnes pratiques de laboratoire (BPL) doivent être préférées à d'autres types de données. De même, il importe de comprendre que la classification peut être réalisée sur la base des meilleures données disponibles. C'est pourquoi, si l'on ne dispose pas de données conformes aux critères de qualité décrits ci-dessus, il est encore possible de procéder à la classification à condition que les données utilisées ne soient pas considérées comme non valides. Pour faciliter cette opération, un guide d'évaluation de la qualité a été mis au point et largement utilisé dans un certain nombre d'enceintes. D'une manière générale, ce guide distingue les catégories suivantes :

1. Données provenant de sources officielles, validées par des autorités réglementaires, telles que les monographies de l'UE sur la qualité de l'eau et les critères de qualité de l'eau de l'USEPA (*Water Quality Criteria*). Ces données peuvent être considérées comme valides à des fins de classification. Cependant, il ne faut pas supposer que ces données sont les seules disponibles et la date du rapport concerné doit être dûment contrôlée. Des données plus récentes peuvent ne pas avoir été prises en compte.
2. Données provenant d'essais conformes à des lignes directrices internationalement reconnues (comme les Lignes directrices de l'OCDE) ou des lignes directrices nationales de qualité équivalente. Sous réserve des problèmes d'interprétation soulevés dans les chapitres suivants, ces données peuvent être utilisées pour la classification.
3. Données provenant d'essais qui, même s'ils ne sont pas strictement conformes à une ligne directrice mentionnée plus haut, respectent des principes et des procédures acceptés et/ou ont fait l'objet d'une procédure d'examen par les pairs avant la publication. Lorsque tous les détails expérimentaux n'ont pas été consignés, une appréciation subjective peut devoir être portée pour

déterminer la validité de ces données. Normalement, elles peuvent être utilisées dans le cadre du schéma de classification.

4. Données obtenues selon des procédures d'essai qui s'écartent sensiblement des lignes directrices normalisées et sont considérées comme peu fiables. Ces données ne doivent pas être utilisées dans la classification.
5. Données de type QSAR. Les conditions d'utilisation de ces données et leur validité sont examinées dans les chapitres pertinents.
6. Données provenant de sources secondaires telles que manuels, synthèses, citations, etc., dont la qualité ne peut être directement évaluée. Il convient d'examiner ces données pour déterminer si elles sont exploitables dans les cas où l'on ne dispose pas de données de qualité 1, 2 ou 3. Ces données doivent être suffisamment détaillées pour permettre l'évaluation de leur qualité. Pour déterminer l'acceptabilité de ces données à des fins de classification, il convient de prendre dûment en compte les difficultés rencontrées lors des essais, qui peuvent avoir nui à la qualité des données et à la significativité du résultat rapporté en termes de niveau de danger identifié (voir paragraphe 76).

32. Une classification peut aussi être réalisée à partir de jeux incomplets de données de toxicité, par exemple lorsqu'on ne dispose pas de données pour l'ensemble des trois niveaux trophiques. Dans ces cas, la classification peut être considérée comme "provisoire" et subordonnée à l'obtention ultérieure d'informations complémentaires. En général, toutes les données disponibles devront être prises en compte avant l'affectation d'un classement. En l'absence de données de bonne qualité, il sera nécessaire de prendre en considération des données de qualité moindre. Dans ces conditions, un jugement devra être porté quant au niveau réel de danger. Par exemple, lorsqu'on dispose de données de bonne qualité pour une espèce ou un taxon particulier, ces données doivent être utilisées de préférence à toutes les données de qualité inférieure pouvant également être disponibles pour cette espèce ou ce taxon. Or, on ne dispose pas toujours de données de bonne qualité pour l'ensemble des niveaux trophiques du jeu de données de base. En ce qui concerne les niveaux trophiques pour lesquels on ne dispose pas de données de bonne qualité, il sera nécessaire de prendre en compte des données de qualité inférieure. La prise en considération de ces données imposera cependant de tenir compte des difficultés pouvant avoir affecté la probabilité d'obtenir un résultat valide. Par exemple, les détails et le principe expérimental de l'essai peuvent être déterminants dans l'évaluation des possibilités d'utilisation de certaines données, concernant par exemple les produits chimiques instables en solution aqueuse, et moins importants pour d'autres produits. Ces difficultés sont décrites plus en détail dans le chapitre 3.

33. D'ordinaire, la détermination du danger et donc la classification reposent sur des informations directement obtenues à partir de l'essai de la substance examinée. Dans certains cas, cependant, les essais présentent des difficultés ou les résultats ne sont pas conformes au bon sens. Par exemple, certains produits chimiques, bien que stables en flacon, réagissent rapidement (ou lentement) dans l'eau, donnant des produits de dégradation qui peuvent avoir des propriétés différentes. Lorsque cette dégradation est rapide, les données d'essai disponibles définiront souvent les dangers liés aux produits de dégradation car ce sont eux qui auront été testés. Ces données peuvent être utilisées pour classer la substance mère de façon ordinaire. Toutefois, si la dégradation est plus lente, il peut être possible de tester la substance mère et d'obtenir des données sur les dangers de manière normale. La dégradation ultérieure peut ensuite être prise en compte pour savoir si l'on doit ranger la substance dans une catégorie de danger aigu ou chronique. Dans certains cas, cependant, une substance ainsi testée peut donner en se dégradant un produit plus dangereux. Le classement de la substance mère doit alors prendre dûment en considération le danger associé au produit de dégradation et la vitesse à laquelle il peut se former dans des conditions environnementales normales.

### 3. TOXICITÉ AQUATIQUE

#### 3.1 INTRODUCTION

34. L'identification du danger pour l'environnement aquatique associé à une substance se fonde sur la toxicité aquatique de cette substance. La classification repose sur la disponibilité de données de toxicité pour des poissons, crustacés et algues/plantes aquatiques. Ces taxons sont généralement acceptés comme représentatifs de la faune et de la flore aquatiques à des fins d'identification du danger. La probabilité de trouver des données concernant ces taxons particuliers est plus grande, en raison de leur acceptation générale par les autorités réglementaires et par l'industrie chimique. Afin de mieux délimiter le danger pour le milieu aquatique, on utilise d'autres informations sur le comportement en matière de dégradation et de bioaccumulation. Le présent chapitre décrit les essais appropriés pour déterminer l'écotoxicité, énonce certains concepts de base pour l'évaluation des données et l'utilisation de combinaisons de résultats d'essai en vue de la classification, résume les stratégies suivies à l'égard des substances "difficiles" et présente un exposé succinct sur l'interprétation de la qualité des données.

#### 3.2 DESCRIPTION DES ESSAIS

35. Pour classer les substances dans le cadre du système harmonisé, on peut considérer comme équivalentes les données de toxicité relatives aux espèces d'eau douce et aux espèces marines. Il convient de noter que certains types de substances, par exemple les produits chimiques organiques ionisables ou les substances organométalliques, peuvent manifester des toxicités différentes dans l'eau douce et l'eau de mer. L'objectif de la classification étant de caractériser le danger dans le milieu aquatique, c'est le résultat indiquant la toxicité la plus forte qui doit être retenu.

36. Les critères du Système mondial harmonisé servant à la définition des dangers pour la santé et l'environnement doivent être neutres à l'égard de la méthode d'essai, en autorisant différentes approches dans la mesure où elles sont scientifiquement correctes et validées selon des procédures et des critères internationaux déjà mentionnés dans des systèmes existants pour les points finaux concernés, et où elles produisent des données mutuellement acceptables. Selon le système proposé (OCDE, 1998) :

“La toxicité aiguë est normalement déterminée à partir d'une  $CL_{50}$  à 96 heures pour les poissons (Ligne directrice 203 de l'OCDE ou équivalent), d'une  $CE_{50}$  à 48 heures pour les crustacés (Ligne directrice 202 de l'OCDE ou équivalent) et/ou d'une  $CE_{50}$  à 72 ou 96 heures pour les algues (Ligne directrice 201 de l'OCDE ou équivalent). Ces espèces sont considérées comme représentatives de l'ensemble des organismes aquatiques et les données relatives à d'autres espèces, comme la lentille d'eau *Lemna*, peuvent aussi être prises en compte si la méthodologie d'essai s'y prête”.

Les essais de toxicité chronique supposent une exposition qui persiste ou se poursuit sur une durée prolongée, pouvant aller de plusieurs jours à un an, voire davantage selon le cycle reproductif de l'organisme aquatique. On peut réaliser des essais de toxicité chronique pour évaluer certains points finaux relatifs à la croissance, à la survie, à la reproduction et au développement.

“Les données de toxicité chronique sont plus difficiles à obtenir que les données de toxicité aiguë, et l'éventail des protocoles d'essai est moins normalisé. Les données obtenues conformément aux lignes directrices 210 (Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie), 202 (partie 2) ou 211 (Reproduction des daphnies) et 201 (Algues, essai d'inhibition de la croissance) de l'OCDE peuvent être acceptées. D'autres essais validés et internationalement acceptés peuvent aussi être utilisés. Il convient d'utiliser les CSEO ou d'autres  $CL(E)_x$  équivalentes”.

37. On notera que plusieurs des lignes directrices de l'OCDE citées comme exemples pour la classification sont en cours de révision ou doivent faire l'objet d'une mise à jour. Ces révisions peuvent entraîner des modifications mineures des conditions d'essai. C'est pourquoi le groupe d'experts chargé de la mise au point des critères harmonisés de classification a prévu une certaine souplesse concernant la durée des essais, voire les espèces utilisées.

38. On peut trouver des lignes directrices permettant de réaliser des essais acceptables sur des poissons, des crustacés et des algues auprès de nombreuses sources (OCDE, 1999 ; EPA, 1996 ; ASTM, 1999 ; ISO, UE). La monographie de l'OCDE n° 11, "*Detailed Review Paper on Aquatic Toxicity Testing for Industrial Chemicals and Pesticides*", constitue une bonne compilation de méthodes d'essai pélagiques et de sources d'informations sur les essais. Ce document est également une source de méthodologies d'essai appropriées.

### 3.2.1 Essais sur les poissons

#### *Essais de toxicité aiguë*

39. Les essais de toxicité aiguë sont généralement réalisés sur des juvéniles de 0.1 à 5 g, sur une période de 96 heures. Le point final à observer dans le cadre de ces essais est la mortalité. Les poissons d'une taille supérieure à cet ordre de grandeur et/ou les durées d'essai inférieures à 96 heures conduisent généralement à une moindre sensibilité. Cependant, les données de ce type peuvent être utilisées pour la classification si l'on ne dispose pas de données acceptables pour des poissons plus petits pour 96 heures, ou si les résultats de ces essais avec une taille de poisson ou une durée d'essai différentes sont susceptibles d'aboutir à un classement dans une plage de danger supérieure. Il convient d'utiliser, pour la classification, des essais conformes à la Ligne directrice 203 de l'OCDE (Poisson, essai de toxicité aiguë) ou équivalent.

#### *Essais de toxicité chronique*

40. Les essais de toxicité chronique ou à long terme sur les poissons peuvent débiter sur des œufs fertilisés, des embryons, des juvéniles ou des adultes actifs sur le plan reproductif. On peut utiliser des essais compatibles avec la Ligne directrice 210 de l'OCDE (Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie), le "*fish life-cycle test*" (US EPA 850.1500) ou équivalent, dans le cadre du schéma de classification. Les durées peuvent varier considérablement en fonction de la finalité du test (de 7 jours à plus de 200 jours). Les points finaux à observer peuvent comprendre le succès de l'éclosion, la croissance (évolution de la longueur et du poids), le succès du frai et la survie. Techniquement, la Ligne directrice 210 de l'OCDE (Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie) n'est pas un essai de toxicité "chronique", mais de toxicité subchronique, à des stades sensibles de la vie. Elle est largement acceptée comme moyen de prédiction de la toxicité chronique, et utilisée à ce titre à des fins de classification dans le cadre du système harmonisé. Les données de toxicité aux premiers stades de la vie des poissons sont beaucoup plus largement disponibles que les études sur le cycle de vie ou la reproduction des poissons.

### 3.2.2 Essais sur les crustacés

#### *Essais de toxicité aiguë*

41. Les essais de toxicité aiguë sur les crustacés commencent généralement sur des juvéniles au premier stade larvaire. Pour les daphnies, la durée de l'essai est de 48 heures. Pour les autres crustacés, tels que les mysidacés ou autres, la durée est généralement de 96 heures. Le point final à observer est la mortalité ou l'immobilisation, en tant que substitut de la mortalité. L'immobilisation est définie comme l'absence de réaction à une poussée douce. Il convient d'utiliser des essais conformes à la Ligne directrice 202 de l'OCDE, partie 1 (*Daphnia*, essai d'immobilisation immédiate), au document USA-EPA OPPTS 850.1035 (*Mysid acute toxicity*) ou à leur équivalent.

### *Essais de toxicité chronique*

42. Les essais de toxicité chronique sur les crustacés débutent généralement aussi sur des juvéniles au premier stade larvaire et se poursuivent avec la maturation et la reproduction. Pour les daphnies, 21 jours suffisent pour la maturation et la reproduction de 3 générations. Pour les mysidacés, 28 jours sont nécessaires. Les points finaux à observer comprennent le temps nécessaire à l'obtention d'une première génération, le nombre de descendants produits par femelle, la croissance et la survie. Il est recommandé que les essais soient conformes à la Ligne directrice 202 de l'OCDE, partie 2 (*Daphnia*, essai de reproduction), au document US-EPA 850.1350 (*Mysid chronic*) ou à leur équivalent, pour être utilisés dans le schéma de classification.

### **3.2.3 Essais sur les algues/plantes**

#### *Essais sur les algues*

43. Les algues sont cultivées et exposées à la substance d'essai dans un milieu enrichi en nutriments. Il convient d'utiliser des essais conformes à la Ligne directrice 201 de l'OCDE (Algues, essai d'inhibition de la croissance). Les méthodes d'essai normalisées utilisent une densité de cellules dans l'inoculum afin d'assurer une croissance exponentielle sur l'ensemble de l'essai, qui dure habituellement de 3 à 4 jours.

44. L'essai algal est un essai à court terme et, bien qu'il vise des effets à la fois aigus et chroniques, seule la CE<sub>50</sub> aiguë est utilisée pour la classification dans le cadre du système harmonisé. Le point final préféré dans cette étude est l'inhibition de la vitesse de croissance algale, car celle-ci ne dépend pas de la conception de l'essai, alors que la biomasse dépend à la fois de la vitesse de croissance de l'espèce testée et de la durée de l'essai, ainsi que d'autres paramètres de conception. Si le point final n'est indiqué qu'en termes de réduction de la biomasse ou n'est pas spécifié, cette valeur peut être interprétée comme un point final équivalent.

#### *Essais sur les macrophytes aquatiques*

45. Les plantes vasculaires les plus couramment utilisées pour les essais de toxicité aquatique sont les lentilles d'eau (*Lemna gibba* et *Lemna minor*). L'essai sur *Lemna* est un essai à court terme et, bien qu'il vise des effets à la fois aigus et subchroniques, seule la CE<sub>50</sub> aiguë est utilisée pour la classification dans le cadre du système harmonisé. Les essais durent jusqu'à 14 jours et sont réalisés dans un milieu enrichi en nutriments, semblable à celui utilisé pour les algues, mais qui peut être plus fort. Le point final observé se fonde sur l'évolution du nombre de frondes produites. Il convient d'utiliser des essais conformes à la Ligne directrice de l'OCDE pour les essais portant sur *Lemna* (en préparation) et au document US-EPA 850.4400 (*aquatic plant toxicity, Lemna*).

## **3.3 CONCEPTS DE TOXICITÉ AQUATIQUE**

46. Cette partie traite de l'utilisation des données de toxicité aiguë et chronique dans la classification, et plus particulièrement des régimes d'exposition, des essais de toxicité algale et de l'utilisation des données de type QSAR. Pour un examen plus détaillé des concepts de toxicité aquatique, on se référera à Rand (1996).

### **3.3.1 Toxicité aiguë**

47. Aux fins de la classification, la toxicité aiguë désigne la propriété intrinsèque d'une substance résidant dans sa nocivité à l'égard d'un organisme, dans le cadre d'une exposition de courte durée à cette substance. La toxicité aiguë s'exprime généralement par la concentration qui provoque la mort de 50 % des organismes d'essai (CL<sub>50</sub>), qui entraîne un effet néfaste mesurable sur 50 % des organismes d'essai (par exemple, l'immobilisation des daphnies) ou qui induit une réduction de 50 % des réponses des organismes d'essai (traités) par rapport aux organismes témoins (non traités) (par exemple, la vitesse de croissance d'une algue).



48. Les substances dont la toxicité aiguë a été déterminée comme inférieure à une partie par million (1 mg/L) sont généralement considérées comme très toxiques. La manipulation, l'utilisation ou le rejet dans l'environnement de ces substances présentent un danger très important et ces substances sont classées dans la plage de danger chronique et/ou aigu I. Des plages décimales sont admises pour distinguer différentes catégories de toxicité aiguë au-dessus de cette plage. Les substances présentant une toxicité aiguë mesurée allant de une à dix parties par million (1- 10 mg/L) sont classées dans la catégorie II de toxicité aiguë, celles dont la toxicité va de dix à cent parties par million (10 – 100 mg/L) dans la catégorie III de toxicité aiguë et celles dont la toxicité excède cent parties par million sont considérées comme pratiquement non toxiques.

### 3.3.2 Toxicité chronique

49. Aux fins de la classification, la toxicité chronique désigne les propriétés potentielles ou réelles d'une substance l'amenant à provoquer des effets néfastes sur des organismes aquatiques au cours d'expositions qui sont déterminées en fonction du cycle de vie de cet organisme. De tels effets chroniques englobent habituellement une série de points finaux sublétaux et sont généralement exprimés sous la forme d'une concentration sans effet observé (CSEO) ou d'une  $CE_x$  équivalente. Les points finaux observables comprennent généralement la survie, la croissance et/ou la reproduction. Les durées d'exposition des essais de toxicité chronique peuvent varier dans une large mesure selon le point final mesuré et l'espèce d'essai utilisée.

50. Les données de toxicité chronique étant moins courantes dans certains secteurs que les données de toxicité aiguë, pour les schémas de classification, le potentiel de toxicité chronique est identifié par des combinaisons appropriées associant toxicité aiguë, absence de dégradabilité et/ou bioaccumulation potentielle ou réelle. Lorsque ces données existent et indiquent une CSEO à long terme  $> 1$  mg/L, elles peuvent être prises en compte dans la décision de classer la substance sur la base des données de toxicité aiguë. Dans ce contexte, il convient d'appliquer la démarche générale suivante. Pour supprimer un classement dans une catégorie chronique, il doit être démontré que la CSEO utilisée permettrait d'éliminer les inquiétudes pour tous les taxons ayant conduit à ce classement. On réalise souvent cette démonstration en mettant en évidence une CSEO à long terme  $> 1$  mg/L pour les espèces les plus sensibles identifiées par la toxicité aiguë. C'est pourquoi, si une classification a été appliquée sur la base d'une  $CL_{50}$  aiguë chez le poisson, il ne sera généralement pas possible de supprimer ce classement en utilisant la CSEO à long terme provenant d'un essai de toxicité sur un invertébré. Dans ce cas, la CSEO devrait normalement provenir d'un essai à long terme chez un poisson de la même espèce ou d'une espèce de sensibilité équivalente ou supérieure. De même, si un classement résulte d'une toxicité aiguë pour plus d'un taxon, il faudra probablement démontrer que la CSEO est supérieure à 1 mg/L pour chacun des taxons. Lorsqu'une substance est classée dans la catégorie de danger chronique IV, il suffit de démontrer que les CSEO sont supérieures à la solubilité dans l'eau des substances considérées.

51. Les essais sur des algues ou sur *Lemma* ne peuvent être utilisés pour la déclassification de produits chimiques car (1) il ne s'agit pas d'études à long terme, (2) le rapport toxicité aiguë/toxicité chronique est généralement faible et (3) les points finaux correspondent davantage à ceux recherchés pour d'autres organismes.

Cependant, lorsqu'un classement a été établi uniquement en raison de la toxicité aiguë [ $CL(E)_{50}$ ] observée dans un essai isolé sur une algue/plante aquatique, mais que les résultats provenant d'une série d'autres essais sur des algues prouvent que la toxicité chronique (CSEO) pour ce groupe taxonomique est supérieure à 1 mg/L, ces résultats peuvent être utilisés pour envisager la déclassification. Actuellement, cette démarche ne peut être appliquée aux plantes aquatiques car aucun essai de toxicité chronique normalisé n'a été mis au point.

52. Il est prévu que le Système mondial harmonisé (GHS) contienne une valeur spécifique de toxicité chronique, au-dessous de laquelle les substances seraient classées comme chroniquement toxiques, mais les critères ne sont pas encore fixés.

### 3.3.3 Régimes d'exposition

53. Quatre types de conditions d'exposition sont utilisés dans les essais de toxicité aiguë et chronique et dans les milieux à base d'eau douce et d'eau salée : régime statique, régime statique avec renouvellement (semi-statique), recirculation et régime dynamique. Le choix du type d'essai à utiliser dépend généralement des caractéristiques de la substance d'essai, de la durée de l'essai, des espèces testées et des prescriptions réglementaires.

### 3.3.4 Milieux d'essai pour les algues

54. Les essais sur les algues sont réalisés dans des milieux enrichis en nutriments, et il convient d'envisager avec prudence l'utilisation d'un constituant commun, l'EDTA, ou d'autres agents chélatants. Lorsqu'on teste la toxicité de produits chimiques organiques, des traces d'un agent chélatant tel que l'EDTA sont nécessaires pour complexer les oligo-éléments dans le milieu de culture. Si cet agent chélatant est omis, la croissance algale peut être considérablement réduite et l'utilité de l'essai compromise. Cependant, les agents chélatants peuvent diminuer la toxicité observée des substances d'essai métalliques. Par conséquent, pour les composés métalliques, il est souhaitable que les données provenant d'essais où l'on a utilisé une forte concentration d'agents chélatants et/ou un excès stœchiométrique de chélatant par rapport au fer fassent l'objet d'une évaluation critique. L'agent chélatant libre peut masquer la toxicité des métaux lourds de façon considérable, en particulier s'il s'agit d'un chélatant fort tel que l'EDTA. Toutefois, en l'absence de fer disponible dans le milieu, la croissance algale peut être limitée par manque de fer et, par conséquent, les données provenant d'essais réalisés sans fer et sans EDTA ou avec une quantité réduite de ces substances, doivent être traitées avec précaution.

### 3.3.5 Utilisation des relations quantitatives structure-activité (QSAR)

55. Aux fins de la classification, et en l'absence de données expérimentales, on peut s'appuyer sur les QSAR pour prédire la toxicité aiguë pour les poissons, les daphnies et les algues de substances non électrolytes, non électrophiles et non réactives par ailleurs (voir le chapitre 6 sur l'utilisation des données de type QSAR). Cette utilisation reste problématique pour des substances telles que les organophosphates qui agissent par des mécanismes spéciaux comme des groupes fonctionnels interagissant avec des récepteurs biologiques ou pouvant former des liaisons sulfhydryle avec des protéines cellulaires. On a obtenu des données QSAR fiables pour des produits chimiques agissant par un mécanisme de base de type narcotique. Ces produits chimiques sont des substances non électrolytes de faible réactivité, telles que des hydrocarbures, des alcools, des cétones et certains hydrocarbures chlorés aliphatiques produisant des effets biologiques qui sont fonction de leur coefficient de partage. Tout produit chimique organique peut produire une narcose. Cependant, si le produit chimique est un électrolyte ou contient certains groupes fonctionnels spécifiques entraînant également des effets non narcotiques, tout calcul de toxicité reposant uniquement sur le coefficient de partage sous-estimera gravement la toxicité. On ne peut utiliser de données QSAR relatives à la toxicité aiguë des composés parents pour le milieu aquatique afin de prédire les effets de métabolites ou de produits de dégradation toxiques, lorsque ceux-ci apparaissent après un laps de temps dépassant la durée des essais de toxicité aiguë.

### 3.4 POIDS DE LA PREUVE

56. Il convient d'utiliser les données offrant la meilleure qualité comme fondement de la classification. Celle-ci doit s'appuyer de préférence sur des sources de données primaires. Il est essentiel que les conditions d'essai soient clairement et complètement définies.

57. Lorsqu'on dispose de plusieurs études pour un groupe taxonomique, il faut déterminer lesquelles sont les plus sensibles et présentent la meilleure qualité. Il faut juger au cas par cas de l'opportunité d'utiliser, au lieu d'une étude conforme aux BPL, une étude non conforme aux BPL mais offrant une observation plus sensible. Il semble que les résultats indiquant une forte toxicité et provenant d'essais réalisés selon des lignes directrices non normalisées ou non conformes aux BPL devraient pouvoir être utilisés pour la classification, tandis que des études démontrant une toxicité négligeable nécessiteraient un examen plus soigneux. Les substances difficiles à tester peuvent donner des résultats apparents supérieurs ou inférieurs à la toxicité réelle. Un jugement d'expert sera aussi nécessaire pour la classification de ces cas.

58. Lorsqu'on dispose de plus d'un essai acceptable pour le même groupe taxonomique, on utilise généralement le plus sensible [celui présentant la  $CL(E)_{50}$  ou la CSEO la plus faible] pour la classification. Toutefois, cette sélection doit être opérée au cas par cas. Lorsqu'on dispose de jeux de données plus importants (4 valeurs ou plus) pour la même espèce, on peut utiliser la moyenne géométrique des valeurs de toxicité comme valeur de toxicité représentative pour cette espèce. Pour estimer une valeur moyenne, il n'est pas conseillé de combiner les essais portant sur différentes espèces d'un même groupe taxonomique, ou réalisés à différents stades de la vie, dans différentes conditions ou sur différentes durées.

### 3.5 SUBSTANCES DIFFICILES A TESTER

59. Des essais de toxicité aquatique valides nécessitent la dissolution de la substance d'essai dans le milieu aqueux selon les conditions d'essai recommandées par la ligne directrice. De plus, une concentration d'exposition biodisponible doit être maintenue pendant la durée de l'essai. Certaines substances chimiques sont difficiles à tester dans des systèmes aquatiques, et des orientations ont été formulées afin de faciliter les essais de ces matériaux (DoE, 1996 ; ECETOC, 1996 ; et US EPA, 1996). L'OCDE est en train de mettre la dernière main à un document d'orientation sur les essais de toxicité aquatique portant sur les substances et mélanges "difficiles" (OCDE, 2000). Ce document constitue une bonne source d'informations sur les types de substances difficiles à tester et sur les étapes nécessaires pour garantir la formulation de conclusions valides à partir des essais de ces matériaux.

60. Il existe néanmoins de nombreuses données d'essai ayant pu être obtenues à l'aide de méthodes qui, bien que non conformes à ce qu'on pourrait considérer aujourd'hui comme des pratiques exemplaires, peuvent fournir des informations qui se prêtent à l'application des critères de classification. L'interprétation de telles données nécessite des instructions spéciales, encore qu'en dernier ressort, un jugement d'expert s'impose pour déterminer la validité des données. Ces substances difficiles à tester peuvent être peu solubles, volatiles ou sujettes à une dégradation rapide sous l'effet de processus tels que phototransformation, hydrolyse, oxydation ou dégradation biotique. Lorsqu'on teste des algues, des matériaux colorés peuvent interférer avec le point final de l'essai en atténuant la lumière nécessaire à la croissance cellulaire. De même, des substances testées sous forme de dispersions troubles peuvent donner lieu à des mesures de toxicité erronées. Le chargement de la colonne d'eau avec le matériau d'essai peut être problématique pour des particules ou des solides tels que des métaux. Les fractions pétrolières obtenues par distillation peuvent aussi poser des problèmes de chargement, et présenter des difficultés d'interprétation lors du choix des concentrations appropriées pour déterminer les valeurs de  $CL(E)_{50}$ . Le projet de document d'orientation sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges difficiles décrit les propriétés les plus courantes de nombreux types de substances susceptibles de poser des problèmes lors des essais.

Stabilité : Si l'on prévoit que les concentrations du produit chimique testé diminueront en deçà de 80 % de la concentration nominale, l'essai, pour être valide, peut nécessiter des régimes d'exposition assurant un renouvellement du matériau d'essai. Des conditions semi-statiques ou dynamiques sont préférables. Des problèmes particuliers se posent donc lors des essais sur des algues, pour lesquels les lignes directrices prévoient généralement la réalisation d'essais statiques. Alors que d'autres régimes d'exposition sont possibles pour les crustacés et les poissons, les essais sur les algues sont souvent menés en conditions statiques, comme indiqué dans les lignes directrices internationalement acceptées. Dans ces essais, il faut tolérer un certain degré de dégradation et d'autres facteurs pertinents, qui doivent être dûment pris en compte dans les calculs de concentrations toxiques. Les paragraphes 64 et 65 présentent quelques approches pour traiter ce problème. Dans les cas où une dégradation intervient, il est également important de prendre en compte l'influence de la toxicité des produits de dégradation sur la toxicité enregistrée lors de l'essai. Un jugement d'expert devra être porté pour décider si les données peuvent être utilisées pour la classification.

Dégradation : Si un composé se décompose ou se dégrade dans les conditions d'essai, un jugement d'expert doit intervenir pour calculer la toxicité à des fins de classification, compte tenu notamment des produits de décomposition connus ou probables. Il est souhaitable de connaître les concentrations du matériau parent et de tous les produits de dégradation toxiques importants. Si l'on s'attend à ce que les produits de dégradation soient relativement peu toxiques, il est souhaitable de mettre en place des régimes d'exposition avec renouvellement, afin de garantir le maintien des concentrations de composés parents.

Saturation : Pour les substances ne comprenant qu'un seul composant, la classification doit reposer uniquement sur les réponses toxiques observées dans la plage de solubilité, et non sur la charge chimique totale au-dessus de la solubilité. Il est fréquent qu'on dispose de données indiquant une toxicité à des niveaux dépassant la solubilité dans l'eau et, bien que ces données soient souvent considérées comme non valides, une certaine interprétation peut être possible. Ces problèmes se posent généralement lorsqu'on teste des substances peu solubles et l'on trouvera des indications sur la façon d'interpréter ces données aux paragraphes 66 et 67 (voir également le document d'orientation sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges difficiles).

Perturbation du milieu d'essai : Des dispositions spéciales peuvent être nécessaires pour assurer la dissolution de substances difficiles à tester. Ces mesures ne devraient pas entraîner de modifications importantes du milieu d'essai, si de telles modifications sont susceptibles de provoquer une augmentation ou une diminution de la toxicité apparente, et donc de faire varier le niveau de classification de la substance d'essai.

Substances complexes : Nombre des substances couvertes par le schéma de classification sont en fait des mélanges, pour lesquels il est difficile et, dans certains cas, impossible de mesurer les concentrations d'exposition. Des substances telles que les fractions pétrolières, les polymères, les substances contenant des quantités importantes d'impuretés, etc., posent des problèmes particuliers car la concentration toxique est difficile à définir et impossible à vérifier. Les protocoles d'essai typiques reposent souvent sur la formation d'une fraction soluble dans l'eau (FSE) ou d'une fraction adaptée à l'eau (FAE) et les données sont rapportées sous forme de taux de charge. Ces données peuvent être utilisées dans l'application des critères de classification.

61. Pour la classification des composés organiques, il est souhaitable de disposer de concentrations d'essai stabilisées et mesurées par analyse. Bien que des concentrations mesurées soient préférables, la classification peut se fonder sur des études utilisant la concentration nominale lorsqu'il s'agit des seules données valides disponibles dans certaines circonstances. Si le matériau est susceptible de se dégrader de manière substantielle ou d'être éliminé d'une autre manière de la colonne d'eau, des précautions doivent être

prises dans l'interprétation des données et la classification doit s'effectuer en tenant compte, si cela est utile et possible, de la perte du toxique au cours de l'essai. De plus, les métaux présentent une série de difficultés qui leur est propre et qui fait l'objet d'une analyse séparée. Le tableau 1 énumère plusieurs propriétés des substances difficiles à tester, et indique leur pertinence du point de vue de la classification.

62. Dans les conditions les plus difficiles à tester, la concentration d'essai effective sera sans doute inférieure à la concentration d'essai nominale ou prévue. Si l'on évalue à moins de 1 mg/L la toxicité [CL(E)50] d'une substance difficile à tester, on peut être relativement sûr que cette substance se classera dans la catégorie de danger aigu 1 (et dans la catégorie de danger chronique 1, s'il y a lieu). En revanche, si la toxicité estimée est supérieure à 1 mg/L, il est probable qu'elle sous-estime la toxicité réelle. Dans ces conditions, un jugement d'expert est nécessaire pour déterminer si un essai portant sur une substance difficile à tester peut être accepté à des fins de classification. Si l'on pense que la nature de la difficulté a une incidence non négligeable sur la concentration d'essai réelle lorsque la toxicité est estimée supérieure à 1 mg/L et que la concentration d'essai n'est pas mesurée, l'essai doit être utilisé dans la classification avec les précautions qui s'imposent.

63. Les paragraphes qui suivent donnent des indications détaillées au sujet de certains de ces problèmes d'interprétation. Dans ce contexte, il ne faut pas oublier que ces éléments sont donnés à titre indicatif et que l'on ne peut pas appliquer de règles inflexibles. Compte tenu de la nature de nombre des difficultés, un jugement d'expert doit toujours intervenir pour déterminer à la fois si l'on dispose de suffisamment d'informations dans un essai pour juger de sa validité, et si l'on peut calculer un niveau de toxicité susceptible d'être utilisé dans l'application des critères de classification.

#### *Substances instables*

64. Bien qu'en principe, il y ait lieu d'adopter des protocoles d'essai qui minimisent les répercussions de l'instabilité des milieux d'essai, il est quasiment impossible, dans la pratique de certains essais, de maintenir une concentration pendant la totalité de l'essai. Les causes courantes d'une telle instabilité sont l'oxydation, l'hydrolyse, la photodégradation et la biodégradation. Si ces dernières formes de dégradation peuvent être facilement contrôlées, ce contrôle fait souvent défaut dans beaucoup d'essais existants. Néanmoins, pour certains essais, en particulier les essais de toxicité aiguë et chronique vis-à-vis des poissons, on dispose d'un choix de régimes d'exposition permettant de contribuer à la minimisation des pertes par instabilité, et cela doit être pris en compte pour décider de la validité des données d'essai.

65. Lorsque l'instabilité intervient dans la détermination du niveau d'exposition pendant l'essai, une condition préalable essentielle pour l'interprétation des données est l'existence de mesures de la concentration d'exposition à des instants appropriés pendant l'ensemble de l'essai. En l'absence de mesures analytiques de la concentration au moins au début et à la fin de l'essai, aucune interprétation valide ne peut être effectuée et l'essai doit être considéré comme non valide à des fins de classification. Lorsqu'on dispose de données mesurées, un certain nombre de règles pratiques peuvent être prises en compte pour guider l'interprétation :

- Si l'on dispose de données mesurées au début et à la fin de l'essai (comme cela est normal pour les essais de toxicité aiguë sur les daphnies et les algues), on peut calculer la CL(E)<sub>50</sub> à des fins de classification à partir de la moyenne géométrique des concentrations de début et de fin de l'essai. Lorsque les concentrations à la fin de l'essai sont inférieures à la limite de détection analytique, ces concentrations doivent être considérées comme égales à la moitié de cette limite de détection.
- Si l'on dispose de données mesurées au début et à la fin des périodes de renouvellement du milieu (comme ce peut être le cas pour les essais semi-statiques), il convient de calculer la moyenne géométrique pour chaque période de renouvellement et de déterminer à partir de ces données l'exposition moyenne sur l'ensemble de la période d'exposition.

- Si la toxicité peut être attribuée à un produit de dégradation et si les concentrations de celui-ci sont connues, on peut calculer la  $CL(E)_{50}$  à des fins de classification à partir de la moyenne géométrique de la concentration du produit de dégradation, qu'on ramène à une valeur rapportée à la substance mère.
- Des principes semblables s'appliquent aux données mesurées dans les essais de toxicité chronique.

### *Substances peu solubles*

66. Ces substances, habituellement considérées comme celles présentant une hydrosolubilité  $< 1$  mg/L, sont souvent difficiles à dissoudre dans les milieux d'essai, et les concentrations dissoutes se révèlent fréquemment difficiles à mesurer au faible niveau attendu. Pour de nombreuses substances, la solubilité vraie dans le milieu d'essai sera inconnue et sera souvent enregistrée comme inférieure à la limite de détection dans l'eau purifiée. Néanmoins, de telles substances peuvent présenter une toxicité, et si l'on n'observe aucun effet toxique, un jugement doit être porté pour décider si ce résultat peut être considéré comme valide pour la classification. Ce jugement doit pêcher par excès de prudence et ne doit pas sous-estimer le danger.

67. En principe, il faut mettre en œuvre des essais utilisant des techniques de dissolution appropriées et des concentrations mesurées avec précision dans la plage d'hydrosolubilité. Lorsque de telles données d'essai sont disponibles, elles doivent être utilisées de préférence à d'autres données. Il est cependant normal, lorsqu'on examine des données plus anciennes, de trouver, pour de telles substances, des niveaux de toxicité supérieurs à l'hydrosolubilité, ou des quantités dissoutes inférieures à la limite de détection de la méthode analytique. Aussi est-il impossible, dans les deux cas, de vérifier les concentrations d'exposition réelles à l'aide de données mesurées. Lorsque ces données sont les seules disponibles comme base de la classification, certaines règles pratiques peuvent être prises en compte à titre d'orientation générale :

- Lorsque la toxicité aiguë est observée à des niveaux dépassant la solubilité dans l'eau, on peut considérer la  $CL(E)_{50}$  à des fins de classification comme inférieure ou égale à l'hydrosolubilité mesurée. Dans ces cas, il est probable que la substance doit être classée dans les catégories de danger chronique I et/ou de danger aigu I. En arrêtant cette décision, il faut prendre dûment en considération la possibilité que la substance non dissoute en excès ait provoqué des effets physiques sur les organismes d'essai. Si cette action est considérée comme la cause probable des effets observés, l'essai doit être jugé comme non valide à des fins de classification.
- Lorsqu'on n'observe aucune toxicité aiguë à des niveaux dépassant la solubilité dans l'eau, on peut considérer que la  $CL(E)_{50}$  à des fins de classification est supérieure à l'hydrosolubilité mesurée. Dans ces cas, il faut déterminer si la substance doit être classée dans la catégorie de danger chronique IV. Lors de la décision de considérer que la substance ne présente aucune toxicité aiguë, il faut prendre dûment en compte les techniques employées pour obtenir les concentrations dissoutes maximales. Si ces techniques ne sont pas considérées comme adéquates, l'essai doit être jugé comme non valide à des fins de classification.
- Lorsque la solubilité dans l'eau est inférieure à la limite de détection de la méthode analytique pour une substance, et que l'on observe une toxicité aiguë, on peut considérer que la  $CL(E)_{50}$  à des fins de classification est inférieure à la limite de détection analytique. Si l'on n'observe aucune toxicité, on peut considérer que la  $CL(E)_{50}$  à des fins de classification est supérieure à la solubilité dans l'eau. Il convient de prendre aussi dûment en considération les critères de qualité mentionnés précédemment.
- Lorsqu'on dispose de données de toxicité chronique, il convient d'appliquer les mêmes règles

générales. En principe, seules les données n'indiquant aucun effet à la limite de solubilité dans l'eau, ou supérieures à 1 mg/L, doivent être prises en compte. Encore une fois, si ces données ne peuvent être validées en considérant les concentrations mesurées, les techniques utilisées pour obtenir les concentrations maximales dissoutes doivent être considérées comme appropriées.

### ***Autres facteurs contribuant à la perte de concentration***

68. Un certain nombre d'autres facteurs peuvent aussi contribuer à des pertes de concentration et, si certains peuvent être évités par une conception correcte de l'étude, l'interprétation des données dans les cas où ces facteurs sont intervenus peut parfois être nécessaire.

- **Sédimentation** : ce phénomène peut se produire au cours d'un essai pour un certain nombre de raisons. Une explication courante est que la substance ne s'est pas vraiment dissoute malgré l'absence apparente de particules, et qu'une agglomération intervient pendant l'essai, entraînant une précipitation. Dans ces conditions, on peut considérer la  $CL(E)_{50}$  à des fins de classification comme déterminable à partir des concentrations à la fin de l'essai. De même, la précipitation peut se produire par réaction avec le milieu. Cette situation est envisagée plus haut à propos de l'instabilité.
- **Adsorption** : ce phénomène peut se produire pour des substances présentant de fortes caractéristiques d'adsorption, telles qu'une valeur élevée de  $\log K_{oc}$ . Lorsqu'il se manifeste, la perte de concentration est habituellement rapide et les concentrations à la fin de l'essai peuvent constituer la meilleure façon de caractériser l'exposition.
- **Bioaccumulation** : des pertes peuvent résulter de la bioaccumulation d'une substance dans les organismes d'essai. Ce phénomène peut être particulièrement important lorsque l'hydrosolubilité est faible et la valeur de  $\log K_{oc}$  par conséquent élevée. On peut calculer la  $CL(E)_{50}$  à des fins de classification à partir de la moyenne géométrique des concentrations au début et à la fin de l'essai.

### ***Perturbation du milieu d'essai***

69. Les bases et les acides forts peuvent sembler toxiques car ils sont susceptibles de modifier le pH. Généralement, on prévient cependant les modifications du pH des systèmes aquatiques par des systèmes tampons dans le milieu d'essai. Si l'on ne dispose d'aucune donnée sur un sel, ce sel doit en principe être classé de la même façon que l'anion ou le cation, c'est-à-dire que l'ion auquel est affecté le classement le plus sévère. Si la concentration efficace ne concerne que l'un des ions, il convient, lors de la classification du sel, de prendre en compte la différence de masse moléculaire, et de corriger la concentration efficace en la multipliant par le rapport  $MM_{sel}/MM_{ion}$ .

70. Les polymères ne sont normalement pas disponibles dans les systèmes aquatiques. Les polymères dispersibles et autres matériaux de masse moléculaire élevée peuvent perturber le système d'essai, interférer avec la consommation d'oxygène et donner lieu à des effets mécaniques ou secondaires. Ces facteurs doivent être pris en compte lors de l'examen des données obtenues sur ces substances. De nombreux polymères se comportent toutefois comme des substances complexes, présentant une importante fraction massique de faible masse moléculaire, qui peut être lixiviée à partir de la masse du polymère. Cet aspect est examiné ci-après.

### ***Substances complexes***

71. Les substances complexes sont caractérisées par diverses structures chimiques, qui appartiennent souvent à des séries homologues, mais présentent des valeurs d'hydrosolubilité et d'autres caractéristiques

physico-chimiques très variables. En plus de l'eau, on obtient un équilibre entre les fractions dissoutes et non dissoutes qui sera caractéristique de la charge de substance. De ce fait, ces substances complexes sont souvent testées sous la forme d'une fraction soluble dans l'eau ou d'une fraction adaptée à l'eau et l'on enregistre la CL(E)<sub>50</sub> d'après la charge ou les concentrations nominales. On ne dispose normalement pas de données analytiques d'appoint car la fraction dissoute sera elle-même un mélange complexe de composants. Le paramètre de toxicité est parfois appelé NCL<sub>50</sub>, désignant le niveau de charge létal. Ce niveau de charge déterminé à partir de la fraction soluble dans l'eau ou de la fraction adaptée à l'eau peut être utilisé directement dans les critères de classification.

72. Les polymères représentent un cas particulier de substances complexes, qui nécessite la prise en compte du type de polymère et de son comportement en matière de dissolution/dispersion. Les polymères peuvent se dissoudre tels quels sans modification (solubilité vraie liée à la taille des particules), être dispersibles ou passer partiellement en solution sous forme de fractions de faible masse moléculaire. Dans ce dernier cas, l'essai appliqué au polymère teste la capacité du polymère massique de perdre par lixiviation du matériau de faible masse moléculaire, ainsi que la toxicité du produit de lixiviation. Le polymère peut donc être considéré de la même manière qu'un mélange complexe, dans la mesure où la charge de polymère constitue le meilleur moyen de caractériser le produit de lixiviation résultant, et où la toxicité peut par conséquent être reliée à cette charge.

**Tableau 1. Classification des substances difficiles à tester**

Propriété	Nature de la difficulté	Pertinence pour la classification
Peu soluble dans l'eau	Obtenir/maintenir la concentration d'exposition nécessaire. Analyser l'exposition.	Si l'on observe des réponses toxiques au-dessus de la solubilité apparente, un jugement d'expert est nécessaire pour confirmer si ces effets sont dus à une toxicité chimique ou à un effet physique ; si l'on n'observe aucun effet, il faut démontrer qu'on a atteint la saturation totale.
Toxique à faible concentration	Obtenir/maintenir la concentration d'exposition nécessaire. Analyser l'exposition.	Classification sur la base d'une toxicité < 1 mg/l
Volatil	Maintenir et mesurer la concentration d'exposition.	La classification doit être réalisée sur la base de mesures fiables des concentrations.
Photodégradable	Maintenir la concentration d'exposition. Toxicité des produits de décomposition.	La classification nécessite un jugement d'expert et doit s'effectuer sur la base de concentrations mesurées. La toxicité des produits de décomposition importants doit être caractérisée.
Instable en solution aqueuse	Maintenir la concentration d'exposition. Toxicité des produits de décomposition. Comparaison des demi-vies de dégradation et du régime d'exposition utilisé dans les essais.	La classification nécessite un jugement d'expert, doit s'effectuer sur la base de concentrations mesurées et doit prendre en compte la toxicité des produits de décomposition importants.
Oxydable	Obtenir, maintenir et mesurer la concentration d'exposition. Toxicité des structures chimiques modifiées ou des produits de décomposition. Comparaison des demi-vies de dégradation et du régime d'exposition utilisé dans les essais.	La classification nécessite un jugement d'expert, doit s'effectuer sur la base de concentrations mesurées et doit prendre en compte la toxicité des produits de décomposition importants.
Sujet à la corrosion /transformation (métaux/composés)	Obtenir, maintenir et mesurer la concentration d'exposition. Comparaison de la répartition des demi-vies	La classification nécessite un jugement d'expert, doit s'effectuer sur la base de concentrations mesurées et doit prendre en



métalliques)	de dégradation dans la colonne d'eau et du régime d'exposition utilisé dans les essais.	compte la toxicité des produits de décomposition importants.
Biodégradable	Maintenir la concentration d'exposition. Toxicité des produits de décomposition. Comparaison des demi-vies de dégradation et du régime d'exposition utilisé dans les essais.	La classification nécessite un jugement d'expert, doit s'effectuer sur la base de concentrations mesurées et doit prendre en compte la toxicité des produits de décomposition importants.

**Tableau 1. Classification des substances difficiles à tester (suite)**

Adsorbant	Maintenir la concentration d'exposition. Analyser l'exposition. Atténuation de la toxicité due à une disponibilité réduite de la substance d'essai.	La classification doit utiliser la mesure de la concentration de matériau disponible.
Chélatant	Distinguer les fractions complexées des fractions non complexées dans le milieu.	La classification doit utiliser la mesure de la concentration de matériau biodisponible.
Coloré	Atténuation de la lumière (problème pour les algues).	Le classement doit distinguer les effets toxiques de la réduction de croissance due à l'atténuation de la lumière.
Hydrophobe	Maintenir la concentration d'exposition à un niveau constant.	La classification doit utiliser la concentration mesurée.
Ionisé	Maintenir la concentration d'exposition. Toxicité des produits de décomposition. Comparaison des demi-vies de dégradation et du régime d'exposition utilisé dans les essais.	La classification nécessite un jugement d'expert, doit s'effectuer sur la base de concentrations mesurées et doit prendre en compte la toxicité des produits de décomposition importants.
Substances et préparations multicomposants	Préparer des lots d'essai représentatifs.	Considéré de la même façon qu'un mélange complexe.

### 3.6 INTERPRÉTATION DE LA QUALITÉ DES DONNÉES

#### 3.6.1 Normalisation

73. De nombreux facteurs peuvent influencer sur les résultats des essais de toxicité portant sur des organismes aquatiques. Ces facteurs englobent les caractéristiques de l'eau d'essai, la conception expérimentale de l'essai, les caractéristiques chimiques du matériau d'essai et les caractéristiques biologiques des organismes d'essai. Il importe donc, lorsqu'on réalise des essais de toxicité aquatique, d'utiliser des protocoles d'essai normalisés pour réduire l'influence de ces sources de variabilité externe. L'objectif de la normalisation des essais et de l'harmonisation internationale de ces normes est de diminuer la variabilité des essais et d'améliorer la précision, la reproductibilité et la cohérence des résultats d'essai.

#### 3.6.2 Hiérarchie des données

74. La classification doit reposer sur des données primaires de bonne qualité. La préférence est accordée à des données conformes aux Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques ou leur équivalent, ainsi qu'aux Bonnes pratiques de laboratoire (BPL). Si les données obtenues à l'aide de méthodes d'essai harmonisées au plan international et appliquées à des espèces d'essai normalisées sont préférables, il est aussi possible d'utiliser les résultats d'essais effectués selon des méthodes reconnues au niveau international ou national, ou leur équivalent, par exemple, des méthodes ISO ou ASTM. Les données provenant d'essais qui semblent respecter des lignes directrices acceptées mais qui ne sont pas parfaitement conformes aux BPL peuvent être utilisées en l'absence de données pertinentes conformes aux BPL.

75. Pedersen *et al.* (1995) proposent un système d'évaluation de la qualité des données compatible avec de nombreux autres systèmes actuellement en usage, y compris celui employé par l'US-EPA pour sa base de données AQUIRE. On trouvera également dans Mensink *et al.* (1995) une étude sur la qualité des données. Le système d'évaluation de la qualité des données décrit par Pedersen *et al.* comprend un schéma d'évaluation de la fiabilité qui peut être utilisé comme modèle pour la classification dans le cadre du schéma harmonisé. Les trois premiers niveaux de données décrits par Pedersen concernent les données préférentielles.

76. Les données servant à la classification dans le cadre du schéma harmonisé doivent provenir de sources primaires. Cependant, comme de nombreux pays et de nombreuses autorités réglementaires procèdent à des classifications à l'aide du schéma harmonisé au niveau mondial, la classification doit permettre l'utilisation d'études provenant d'autorités nationales et de groupes d'experts, dans la mesure où ces études s'appuient sur des sources de données primaires. De telles études doivent contenir des résumés des conditions d'essai, suffisamment détaillés pour que l'on puisse évaluer le "poids de la preuve" et prendre des décisions de classification. Il est envisageable d'utiliser les études réalisées par un groupe réputé, tel que le GESAMP, qui a accès aux données primaires.

77. En l'absence de données d'essai expérimentales, il est possible d'utiliser des relations quantitatives structure-activité (QSAR) validées pour la toxicité aquatique. Les données d'essai sont toujours préférées aux prévisions de type QSAR, sous réserve qu'elles soient valides.

## ANNEXE 3.I

### LIGNES DIRECTRICES POUR LES ESSAIS

**78. La plupart des lignes directrices mentionnées sont regroupées dans des compilations constituées par l'organisation qui les publie. Les principales références sont les suivantes :**

- Lignes directrices de la CE : Commission européenne (1996). Classification, emballage et étiquetage des substances dangereuses dans l'Union européenne. Partie 2 – Méthodes d'essai. Commission européenne, 1997. ISBN 92-828-0077-6. (Page d'accueil : <http://ecb.jrc.it/testing-methods/> - en anglais);
- Lignes directrices de l'ISO : disponibles auprès des organismes de normalisation nationaux ou de l'ISO (page d'accueil : <http://www.iso.ch/>);
- Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris, 1993, avec mises à jour régulières (Page d'accueil: <http://www.oecd.org/ehs/>);
- Lignes directrices de l'OPPTS : page d'accueil de l'US-EPA : <http://www.epa.gov/opptsfrs/home/guidelin.htm>;
- ASTM : page d'accueil de l'ASTM : <http://www.astm.org>. Poursuivre la recherche via le terme “standards”.

Ligne directrice 201 de l'OCDE (1984) Algues, essai d'inhibition de la croissance

Ligne directrice 202 de l'OCDE (1984) *Daphnia* sp., essai d'immobilisation immédiate et essai de reproduction

Ligne directrice 203 de l'OCDE (1992) Poisson, essai de toxicité aiguë

Ligne directrice 204 de l'OCDE (1984) Poisson, toxicité prolongée, étude sur 14 jours

Ligne directrice 210 de l'OCDE (1992) Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie

Ligne directrice 211 de l'OCDE (1998) *Daphnia magna*, essai de reproduction

Ligne directrice 212 de l'OCDE (1998) Poisson, essai de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin

Ligne directrice 215 de l'OCDE (2000) Poisson, essai sur la croissance des juvéniles

Ligne directrice 221 de l'OCDE (en préparation) *Lemna* sp., essai d'inhibition de la croissance

CE C.1: Toxicité aiguë vis-à-vis des poissons (1992)

CE C.2: Toxicité aiguë vis-à-vis des daphnies (1992)

CE. C.3: Essai d'inhibition des algues (1992)

CE C.14: Poisson, essai sur la croissance des juvéniles (2001)

CE C.15: Poisson, essai de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin (2001)

CE C.20: *Daphnia Magna*, essai de reproduction (2001)

OPPTS Testing Guidelines for Environmental Effects (850 Series Public Drafts)

850.1000 Special consideration for conducting aquatic laboratory studies (Adobe PDF)

- 850.1000 Special consideration for conducting aquatic laboratory studies (texte au format HTML)
- 850.1010 Aquatic invertebrate acute toxicity, test, freshwater daphnids (Adobe PDF)
- 850.1010 Aquatic invertebrate acute toxicity, test, freshwater daphnids (texte au format HTML)
- 850.1020 Gammarid acute toxicity test (Adobe PDF)
- 850.1020 Gammarid acute toxicity test (texte au format HTML)
- 850.1035 Mysid acute toxicity test (Adobe PDF)
- 850.1035 Mysid acute toxicity test (texte au format HTML)
- 850.1045 Penaeid acute toxicity test (Adobe PDF)
- 850.1045 Penaeid acute toxicity test (texte au format HTML)
- 850.1075 Fish acute toxicity test, freshwater and marine (Adobe PDF)
- 850.1075 Fish acute toxicity test, freshwater and marine (texte au format HTML)
- 850.1300 Daphnid chronic toxicity test (Adobe PDF)
- 850.1300 Daphnid chronic toxicity test (texte au format HTML)
- 850.1350 Mysid chronic toxicity test (Adobe PDF)
- 850.1350 Mysid chronic toxicity test (texte au format HTML)
- 850.1400 Fish early-life stage toxicity test (Adobe PDF)
- 850.1400 Fish early-life stage toxicity test (texte au format HTML)
- 850.1500 Fish life cycle toxicity (Adobe PDF)
- 850.1500 Fish life cycle toxicity (texte au format HTML)
- 850.1730 Fish BCF (Adobe PDF)
- 850.1730 Fish BCF (texte au format HTML)
- 850.4400 Aquatic plant toxicity test using Lemna spp. Tiers I and II (Adobe PDF)
- 850.4400 Aquatic plant toxicity test using Lemna spp. Tiers I and II (texte au format HTML)
- 850.4450 Aquatic plants field study, Tier III (Adobe PDF)
- 850.4450 Aquatic plants field study, Tier III (texte au format HTML)
- 850.5400 Algal toxicity, Tiers I and II (Adobe PDF)
- 850.5400 Algal toxicity, Tiers I and II (texte au format HTML)

*Note 1* : Cette liste de lignes directrices pour les essais portant sur les effets environnementaux (versions publiques) est extraite de la page d'accueil de l'U.S. Environmental Protection Agency datée du 19 septembre 2000.

([http://www.epa.gov/OPPTS\\_Harmonized/850\\_Ecological\\_Effects\\_Test\\_Guidelines/Drafts](http://www.epa.gov/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts)). Cette liste a été révisée pour la dernière fois le 10 février 1997 à l'aide d'un programme de conversion informatisé. D'autres révisions peuvent intervenir à mesure que les lignes directrices sont mises à jour.

## ANNEXE 3.II

### RÉFÉRENCES

- APHA 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18<sup>th</sup> edition. American Public Health Association, Washington, DC.
- ASTM 1999. Annual Book of ASTM standards, Vol. 11.04. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- DoE 1996. Guidance on the Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances. United Kingdom Department of the Environment, Londres.
- ECETOC 1996. Aquatic Toxicity Testing of Sparingly Soluble, Volatile and Unstable Substances. ECETOC Monograph No. 26, ECETOC, Bruxelles.
- Lewis, M. A. 1995. Algae and vascular plant tests. In: Rand, G. M. (ed.) 1995. Fundamentals of Aquatic Toxicology, Second Edition. Taylor & Francis, Washington, DC. pp. 135-169.
- Mensink, B. J. W. G., M. Montforts, L. Wijkhuizen-Maslankiewicz, H. Tibosch, et J.B.H.J. Linders 1995. Manual for Summarising and Evaluating the Environmental Aspects of Pesticides. Report No. 679101022 RIVM, Bilthoven, Pays-Bas.
- OCDE 1998. Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances. OCDE, Paris. <http://www.oecd.org/ehs>
- OCDE 1999. Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- OCDE 2000. Revised Draft Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OCDE, Paris.
- OCDE, Monographie n°11, Detailed Review Paper on Aquatic Toxicity Testing for Industrial Chemicals and Pesticides.
- Pedersen, F., H. Tyle, J. R. Niemeldi, B. Guttman, L. Lander, et A. Wedebrand 1995. Environmental Hazard Classification - data collection and interpretation guide. TemaNord 1995:581.
- Rand, Gary M., Fundamentals of Aquatic toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment.
- US EPA 1996. Ecological Effects Test Guidelines - OPPTS 850.1000. Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Public Draft, EPA 712-C-96-113. United States Environmental Protection Agency. [http://www.epa.gov/docs/OPPTS\\_Harmonized/](http://www.epa.gov/docs/OPPTS_Harmonized/)

## 4. DÉGRADATION

### 4.1 INTRODUCTION

79. La dégradabilité est l'une des propriétés intrinsèques majeures des substances chimiques qui déterminent le danger potentiel qu'elles représentent pour l'environnement. Les substances non dégradables persistent dans l'environnement et possèdent par conséquent un potentiel d'effets néfastes à long terme sur le biote. A l'opposé, les substances dégradables peuvent être éliminées dans les égouts, dans les stations d'épuration des eaux usées ou dans l'environnement.

80. La classification des substances chimiques repose principalement sur leurs propriétés intrinsèques. Cependant, le degré de dégradation dépend non seulement de la résistance intrinsèque de la molécule, mais aussi des conditions réelles dans le compartiment environnemental récepteur, telles que le potentiel redox, le pH, la présence de micro-organismes appropriés, la concentration des substances, ainsi que l'apparition et la concentration d'autres substrats. L'interprétation des caractéristiques de dégradation dans un contexte de classification des dangers pour le milieu aquatique nécessite donc des critères détaillés permettant de mettre en balance les propriétés intrinsèques de la substance et les conditions environnementales existantes, pour parvenir à une conclusion sur le potentiel d'effets néfastes à long terme. L'objectif du présent chapitre est de fournir des orientations permettant d'interpréter les données relatives à la dégradabilité des substances organiques. Ces orientations reposent sur une analyse des aspects mentionnés plus haut concernant la dégradation dans le milieu aquatique. Sur la base de ces orientations, un schéma décisionnel détaillé pour l'utilisation des données de dégradation existantes à des fins de classification est proposé. Le présent document d'orientation couvre les types de données de dégradation suivants : données de biodégradabilité facile, données de simulation de la transformation dans l'eau, les sédiments aquatiques et le sol, données de DBO<sub>5</sub>/DCO et techniques pour estimer la dégradabilité rapide dans le milieu aquatique. Il examine également la dégradabilité anaérobie, la biodégradabilité intrinsèque, les données issues des essais de simulation des stations d'épuration des eaux usées, les données relatives aux transformations abiotiques telles que l'hydrolyse et la photolyse, les processus d'élimination comme la volatilisation et, enfin, les données obtenues lors d'enquêtes sur le terrain et d'études de surveillance.

81. Le terme dégradation est défini dans le glossaire de ce document d'orientation comme la décomposition de molécules organiques en molécules plus petites et finalement en dioxyde de carbone, eau et sels. Pour les composés inorganiques et les métaux, le concept de dégradabilité tel qu'appliqué aux composés organiques n'a guère ou pas de signification. De fait, la substance peut être transformée par des processus environnementaux normaux, de sorte que la biodisponibilité des espèces toxiques est augmentée ou réduite. Le présent chapitre traite donc seulement des substances organiques ou organométalliques. Le partage environnemental à la sortie de la colonne d'eau est examiné au chapitre 7.

82. Les données relatives aux propriétés de dégradation peuvent provenir d'essais normalisés ou d'autres types d'études, ou peuvent être estimées à partir de la structure des molécules. L'interprétation de ces données de dégradation à des fins de classification nécessite souvent une évaluation détaillée des données d'essai. Le présent chapitre donne des indications à ce sujet, et le lecteur trouvera des détails supplémentaires dans deux annexes décrivant les méthodes disponibles (annexe 3) et les facteurs influant sur la dégradation dans les milieux aquatiques (annexe 4).

### 4.2 INTERPRÉTATION DES DONNÉES DE DÉGRADABILITÉ

#### 4.2.1 Dégradabilité rapide

83. La classification des dangers liés aux substances chimiques repose normalement sur des données existantes concernant leurs propriétés environnementales. Il est rare que des données d'essai soient

obtenues dans le but principal de faciliter une classification. On dispose souvent d'une gamme variée de données d'essai, qui ne répondent pas nécessairement directement aux critères de classification. Aussi des orientations sont-elles nécessaires pour interpréter les données d'essai existantes dans le contexte de la classification des dangers pour l'environnement aquatique. Sur la base des critères harmonisés, des orientations sont formulées ci-après pour les trois types de données couverts par l'expression "dégradation rapide" dans l'environnement aquatique [voir paragraphes 8, 9, 20, 21 et 22 et la définition figurant à l'annexe 1 du Système harmonisé de classification des produits chimiques dangereux pour l'environnement aquatique (OCDE, 1998), joint en appendice au présent document d'orientation].

#### **4.2.2 Biodégradabilité facile**

84. La biodégradabilité facile est définie dans la Ligne directrice 301 de l'OCDE (OCDE, 1992). Toutes les substances organiques qui se dégradent à un degré supérieur au niveau de seuil dans un essai de biodégradabilité facile normalisé de l'OCDE ou un essai similaire doivent être considérées comme facilement biodégradables et donc aussi comme rapidement dégradables. De nombreuses données d'essai tirées de la littérature ne spécifient cependant pas toutes les conditions devant être évaluées pour démontrer si l'essai répond aux exigences d'un essai de biodégradabilité facile. Un jugement d'expert doit par conséquent être porté quant à la validité des données avant que celles-ci puissent être utilisées à des fins de classification. Avant de conclure à la biodégradabilité facile d'une substance d'essai, il convient cependant de prendre en compte au moins les paramètres suivants.

##### **Concentration de la substance d'essai**

85. Dans les essais de biodégradabilité facile de l'OCDE, on utilise des concentrations relativement élevées de substance d'essai (2 à 100 mg/l). De nombreuses substances peuvent toutefois être toxiques pour les inoculum à des concentrations aussi fortes, d'où une faible dégradation lors des essais, bien que ces substances puissent être rapidement dégradables à des concentrations non toxiques plus faibles. Un essai de toxicité sur des micro-organismes (comme, par exemple, la Ligne directrice 209 de l'OCDE "Boue activée, essai d'inhibition de la respiration", l'essai d'inhibition de la nitrification ISO 9509 ou l'essai d'inhibition de la luminescence de bactéries ISO 11348) peut démontrer la toxicité de la substance d'essai. Lorsqu'il est probable que l'absence de dégradabilité facile d'une substance tient à un effet inhibiteur, on doit utiliser, s'ils sont disponibles, les résultats d'un essai employant des concentrations de la substance d'essai plus faibles et non toxiques. Ces résultats peuvent être mis, au cas par cas, en relation avec les critères de classification concernant la dégradation rapide, même si l'on préfère en général utiliser les données d'essai disponibles sur la dégradation dans les eaux de surface, avec une biomasse microbienne réaliste d'un point de vue environnemental et une faible concentration non toxique réaliste de la substance d'essai.

##### **Intervalle de temps**

86. Les critères harmonisés comprennent une obligation générale, s'appliquant à l'ensemble des essais de biodégradabilité facile, d'atteindre le niveau de seuil en l'espace de 10 jours. Cette exigence n'est pas en accord avec la Ligne directrice 301 de l'OCDE, dans laquelle l'intervalle de temps de 10 jours s'applique aux essais de biodégradabilité facile de l'OCDE, excepté l'essai MITI I (Ligne directrice 301C de l'OCDE). Dans l'essai en flacon fermé (Ligne directrice 301D de l'OCDE), on peut utiliser à la place un intervalle de temps de 14 jours, lorsque des mesures doivent être effectuées au-delà de 10 jours. En outre, on ne dispose souvent que d'informations limitées dans les références des essais de biodégradation. Aussi peut-on dans la pratique, si l'on ne dispose pas d'informations sur l'intervalle de temps de 10 jours, utiliser directement le pourcentage de dégradation atteint au bout de 28 jours pour évaluer la biodégradabilité facile. Cette solution ne devrait cependant être acceptable que pour des données d'essai existantes et des données provenant d'essais dans lesquels l'intervalle de temps de 10 jours ne s'applique pas.



### 4.2.3 DBO<sub>5</sub>/DCO

87. Les informations sur la demande biochimique en oxygène à 5 jours (DBO<sub>5</sub>) ne seront utilisées à des fins de classification que si l'on ne dispose pas d'autres données de dégradabilité mesurées. La priorité est donc accordée aux données provenant d'essais de biodégradabilité facile et d'études de simulation de la dégradabilité dans l'environnement aquatique. L'essai de DBO<sub>5</sub> est un essai de biodégradabilité classique, maintenant remplacé par les essais de biodégradabilité facile. C'est pourquoi cet essai ne devrait pas être mis en œuvre aujourd'hui pour évaluer la biodégradabilité facile de substances. Les données d'essai plus anciennes peuvent cependant être utilisées lorsqu'on ne dispose pas d'autres données de biodégradabilité. Pour les substances dont la structure chimique est connue, la demande théorique en oxygène (DThO) peut être calculée et cette valeur doit être employée à la place de la demande chimique en oxygène (DCO).

### 4.2.4 Autres preuves scientifiques convaincantes

88. La dégradation rapide dans le milieu aquatique peut être démontrée par d'autres données que celles mentionnées dans les critères a) et b) de l'annexe I des critères harmonisés (OCDE, 1998), par exemple des données sur la dégradation biotique et/ou abiotique. Les données de dégradation primaire ne peuvent être utilisées que s'il est démontré que les produits de dégradation ne doivent pas être classés comme dangereux pour le milieu aquatique, c'est-à-dire s'ils ne répondent pas aux critères de classification.

89. Pour remplir le critère c), il faut que la substance soit dégradée dans le milieu aquatique à plus de 70 % en l'espace de 28 jours. Si l'on suppose une cinétique du premier ordre, ce qui est raisonnable pour les faibles concentrations observées dans la plupart des milieux aquatiques, la vitesse de dégradation sera relativement constante sur l'intervalle de temps de 28 jours. Ainsi, l'exigence portant sur la dégradation sera respectée avec une constante de vitesse de dégradation moyenne,  $k > -(\ln 0.3 - \ln 1)/28 = 0.043 \text{ j}^{-1}$ . Cette constante correspond à une demi-vie de dégradation,  $t_{1/2} < \ln 2/0.043 = 16$  jours.

90. En outre, comme les processus de dégradation dépendent de la température, ce paramètre doit aussi être pris en compte lors de l'évaluation de la dégradation dans l'environnement. Pour cette évaluation, il convient d'utiliser des données provenant d'études menées à des températures réalistes d'un point de vue environnemental. Si l'on doit comparer des données provenant d'études réalisées à des températures différentes, on peut utiliser l'approche classique Q10, qui suppose que la vitesse de dégradation est divisée par deux lorsque la température diminue de 10 °C.

91. Pour déterminer si les données remplissent ce critère, il convient de procéder au cas par cas en portant un jugement d'expert. On trouvera toutefois ci-après des indications sur l'interprétation de divers types de données susceptibles d'être utilisées pour démontrer une dégradation rapide dans l'environnement aquatique. D'une manière générale, seules les données provenant d'essais de simulation de biodégradation aquatique sont considérées comme directement applicables. Cependant, des données d'essais de simulation provenant d'autres compartiments environnementaux pourraient aussi être prises en compte, mais ces données nécessitent généralement un jugement plus scientifique avant d'être utilisées.

#### Essais de simulation aquatique

92. Les essais de simulation aquatique sont des essais menés en laboratoire, mais qui simulent les conditions environnementales et utilisent comme inoculum des échantillons naturels. Les résultats des essais de simulation aquatique peuvent être employés directement à des fins de classification, lorsque ces essais simulent des conditions environnementales réalistes des eaux de surface, à savoir :

- concentration de substance réaliste pour l'environnement aquatique général (souvent dans la plage basse des µg/L) ;

- inoculum provenant d'un environnement aquatique pertinent ;
- concentration réaliste de l'inoculum ( $10^3$  à  $10^6$  cellules/ml) ;
- température réaliste (par exemple, 5 °C à 25 °C) ; et
- détermination de la dégradation ultime (c'est-à-dire du taux de minéralisation ou des vitesses de dégradation individuelles pour l'ensemble de la voie de biodégradation).

93. Les substances qui, dans ces conditions, sont dégradées à 70 % au moins en l'espace de 28 jours, c'est-à-dire qui présentent une demi-vie < 16 jours, sont considérées comme rapidement dégradables.

### **Études sur le terrain**

94. Parallèlement aux essais de simulation en laboratoire, il existe des études sur le terrain ou expériences en mésocosme. Dans le cadre de ces études, on peut rechercher le devenir et/ou les effets des produits chimiques dans des environnements ou des enceintes environnementales. Les données sur le devenir provenant de ces expériences peuvent être utilisées pour évaluer le potentiel de dégradation rapide. Cependant, cette évaluation peut souvent être difficile car elle nécessite de faire la preuve d'une dégradation ultime. On peut étayer cette démonstration en préparant des bilans massiques montrant qu'il ne se forme pas d'intermédiaires non dégradables et prenant en compte les fractions éliminées du système aqueux sous l'effet d'autres processus comme la sorption dans les sédiments ou la volatilisation à partir de l'environnement aquatique.

### **Données de surveillance**

95. Les données de surveillance peuvent démontrer l'élimination des polluants de l'environnement aquatique. Ces données sont cependant très difficiles à utiliser à des fins de classification. Au préalable, il est nécessaire de répondre aux questions suivantes :

- L'élimination est-elle le résultat d'une dégradation, ou d'autres processus tels qu'une dilution ou une répartition entre différents compartiments (sorption, volatilisation) ?
- La formation d'intermédiaires non dégradables est-elle exclue ?

Ces données ne peuvent être considérées comme utilisables à des fins de classification que si l'on peut démontrer que l'élimination, en tant que résultat de la dégradation ultime, répond aux critères de dégradabilité rapide. En général, les données de surveillance ne doivent être utilisées que comme preuves complémentaires soit d'une persistance dans l'environnement aquatique, soit d'une dégradation rapide.

### **Essais de biodégradabilité intrinsèque**

96. Les substances qui sont dégradées à plus de 70 % dans les essais de biodégradabilité intrinsèque (Ligne directrice 302 de l'OCDE) présentent un potentiel de biodégradation ultime. Or, compte tenu des conditions optimales mises en œuvre dans ces essais, on ne peut supposer une biodégradabilité rapide des substances intrinsèquement biodégradables dans l'environnement. Les conditions optimales des essais de biodégradabilité intrinsèque stimulent l'adaptation des micro-organismes, ce qui augmente le potentiel de biodégradation par rapport à des milieux naturels. Aussi convient-il, en général, de ne pas interpréter des résultats positifs comme une preuve de la dégradation rapide dans l'environnement (voir Note 1).

Note 1 : En relation avec l'interprétation des données de dégradation répondant aux critères harmonisés de l'OCDE pour la catégorie de danger chronique IV, le groupe de travail permanent de l'UE examine la possibilité d'utiliser certains types de données provenant d'essais de biodégradabilité intrinsèque dans une évaluation au cas par cas, comme base du non-classement de substances remplissant par ailleurs ce critère de classification.

Les essais de biodégradabilité intrinsèque concernés sont l'essai Zahn Wellens (LD OCDE 302B) et l'essai MITI modifié (II) (LD OCDE 302 C). Les conditions d'utilisation à cet égard sont les suivantes :

- a) Les méthodes ne doivent pas employer de micro-organismes pré-exposés (pré-adaptés).
- b) La durée de l'adaptation dans chaque essai doit être limitée, le point final de l'essai ne doit concerner que la minéralisation et le niveau de seuil ainsi que le temps nécessaire pour atteindre celui-ci doivent être respectivement :
- niveau de seuil de l'essai MITI II > 60 % en l'espace de 14 jours.
  - niveau de seuil de l'essai Zahn Wellens > 70 % en l'espace de 7 jours.

### **Essais de simulation des stations d'épuration des eaux usées**

97. Les résultats des essais simulant les conditions de fonctionnement d'une station d'épuration des eaux usées (par exemple, la Ligne directrice 303 de l'OCDE) ne peuvent être utilisés pour évaluer la dégradation dans l'environnement aquatique. Les principales raisons en sont que la biomasse microbienne d'une station d'épuration est très différente de la biomasse présente dans l'environnement, que les compositions des substrats diffèrent sensiblement et que la présence de matières organiques rapidement minéralisées dans les eaux usées facilite la dégradation de la substance d'essai par co-métabolisme.

### **Données de dégradation dans le sol et les sédiments**

98. Il a été démontré que pour de nombreuses substances non sorbantes (non lipophiles), on relève des vitesses de dégradation plus ou moins identiques dans le sol et dans les eaux de surface. Pour les substances lipophiles, la vitesse de dégradation sera généralement plus faible dans les sols que dans l'eau, en raison de l'immobilisation partielle provoquée par la sorption. Aussi, lorsqu'une étude de simulation a démontré qu'une substance se dégradait rapidement dans le sol, il est très probable qu'elle se dégradera aussi rapidement dans l'environnement aquatique. Il est donc proposé que la démonstration par voie expérimentale d'une dégradation rapide dans le sol soit une justification suffisante pour supposer une dégradation rapide dans les eaux de surface lorsque :

- aucune pré-exposition (préadaptation) des micro-organismes présents dans le sol n'est intervenue,
- on teste une concentration de la substance réaliste d'un point de vue environnemental, et
- la substance subit une dégradation ultime en l'espace de 28 jours, avec une demi-vie < 16 jours, correspondant à une vitesse de dégradation > 0.043 j<sup>-1</sup>.

99. La même argumentation est considérée comme valide pour des données relatives à la dégradation dans des sédiments en conditions aérobies.

### **Données de dégradation anaérobie**

100. Il est impossible d'utiliser des données relatives à la dégradation anaérobie pour décider si une substance doit être tenue pour rapidement dégradable, car l'environnement aquatique est généralement considéré comme le compartiment aérobie dans lequel vivent les organismes aquatiques, tels que ceux employés pour la classification des dangers pour l'environnement aquatique.

### **Hydrolyse**

101. Les données relatives à l'hydrolyse (par exemple, Ligne directrice 111 de l'OCDE) ne peuvent être prises en compte à des fins de classification que si la demi-vie la plus longue  $t_{1/2}$  déterminée dans la plage de pH 4-9 est inférieure à 16 jours. Cependant, l'hydrolyse n'est pas une dégradation ultime et divers produits de dégradation intermédiaires sont susceptibles de se former, dont certains peuvent ne se dégrader que lentement. On ne peut prendre en considération les données provenant d'études d'hydrolyse que si l'on

parvient à démontrer de manière satisfaisante que les produits d'hydrolyse formés ne répondent pas aux critères de classification des substances dangereuses pour le milieu aquatique.

102. Lorsqu'une substance est rapidement hydrolysée (par exemple, avec  $t_{1/2} <$  quelques jours), ce processus fait partie de la dégradation déterminée dans les essais de biodégradation. L'hydrolyse peut constituer le processus de transformation initial dans la biodégradation.

### **Dégradation photochimique**

103. Les informations relatives à la dégradation photochimique (par exemple, OCDE, 1997) sont difficiles à utiliser à des fins de classification. Le degré réel de dégradation photochimique dans l'environnement aquatique dépend des conditions locales (par exemple, profondeur de l'eau, matières solides en suspension, turbidité) et le danger lié aux produits de dégradation n'est généralement pas connu. On ne disposera probablement que rarement d'informations suffisantes pour une évaluation complète fondée sur la dégradation photochimique.

### **Estimation de la dégradation**

104. Certaines relations quantitatives structure-activité (QSAR) ont été établies afin de prédire une valeur approximative de la demi-vie d'hydrolyse, qui ne doit être prise en compte qu'en l'absence de données expérimentales. Or, on ne peut utiliser une demi-vie d'hydrolyse en relation avec la classification que très prudemment, car l'hydrolyse ne concerne pas la dégradabilité ultime (voir la partie "Hydrolyse" de cette section). En outre, les QSAR élaborées à ce jour présentent une applicabilité plutôt limitée et ne permettent de prédire le potentiel d'hydrolyse que pour un nombre restreint de catégories chimiques. Le programme de données QSAR baptisé HYDROWIN (version 1.67, Syracuse Research Corporation) ne peut, par exemple, prédire le potentiel d'hydrolyse que pour moins de 20 % des substances existantes recensées par l'UE qui possèdent une structure moléculaire (précise) définie (Niemelä, 2000).

105. En général, aucune méthode d'évaluation quantitative (QSAR) visant à estimer le degré de biodégradabilité de substances organiques n'est encore suffisamment précise pour prédire la dégradation rapide. On peut toutefois utiliser les résultats de telles méthodes pour prédire qu'une substance n'est pas rapidement dégradable. Par exemple, si le *Biodegradation Probability Program* (par exemple, BIOWIN version 3.67, Syracuse Research Corporation) fournit une probabilité, estimée par des méthodes linéaires ou non linéaires, inférieure à 0.5, les substances doivent être considérées comme non rapidement dégradables (OCDE, 1994 ; Pedersen *et al.*, 1995 & Langenberg *et al.*, 1996). On peut aussi faire appel à d'autres méthodes (Q)SAR et à un jugement d'expert, par exemple, lorsqu'on dispose de données de dégradation pour des composés structurellement analogues, mais un tel jugement doit être porté avec de grandes précautions. En général, la prédiction par une méthode QSAR de la non dégradabilité rapide d'une substance est considérée comme une meilleure base de classification que l'application d'un classement par défaut, en l'absence de données de dégradation utiles.

### **Volatilisation**

106. Les produits chimiques peuvent être éliminés de certains milieux aquatiques par volatilisation. Le potentiel intrinsèque de volatilisation est déterminé par la constante de la loi de Henry (H) de la substance. La volatilisation à partir du milieu aquatique dépend largement des conditions environnementales de la masse d'eau spécifique considérée, notamment de la profondeur de l'eau, des coefficients d'échange des gaz (fonctions de la vitesse du vent et du débit d'eau) et de la stratification de la masse d'eau. La volatilisation ne représentant que l'élimination d'un produit chimique de la phase aqueuse, la constante de la loi de Henry ne peut être utilisée pour évaluer la dégradation en relation avec la classification des substances selon leur danger

pour l'environnement aquatique. On pourrait cependant approfondir à cet égard la question des substances gazeuses à la température ambiante, par exemple (voir aussi Pedersen *et al.*, 1995).

#### **4.2.5 Absence de données de dégradation**

107. Si l'on ne dispose d'aucune information utile sur la dégradabilité, qu'il s'agisse de données déterminées expérimentalement ou de données estimées, la substance doit être considérée comme non rapidement dégradable.

### **4.3 PROBLÈMES GÉNÉRAUX D'INTERPRÉTATION**

#### **4.3.1 Substances complexes**

108. Les critères harmonisés de classification des produits chimiques dangereux pour l'environnement aquatique visent principalement des substances isolées. Les substances multicomposants constituent un certain type de substances intrinsèquement complexes. Elles sont généralement d'origine naturelle et doivent parfois faire l'objet d'un examen. Ce peut être le cas de substances chimiques produites ou extraites à partir d'huile minérale ou de matériau végétal. De telles substances chimiques complexes sont normalement considérées comme des substances isolées dans un contexte réglementaire. Dans la plupart des cas, elles sont définies comme une série homologue de substances possédant une certaine plage de longueur de chaîne et/ou de degré de substitution. Lorsqu'il en est ainsi, aucune différence majeure de dégradabilité n'est prévue et le degré de dégradabilité peut être établi à partir d'essais portant sur le produit chimique complexe. Une exception intervient lorsqu'on met en évidence une dégradation limite car, dans ce cas, il se peut que certaines des substances individuelles soient rapidement dégradables et d'autres non. Cette situation nécessite une évaluation plus détaillée de la dégradabilité des différents composants de la substance complexe. Si les composants non rapidement dégradables représentent une proportion importante de la substance complexe (par exemple, plus de 20 % ou, pour un composant dangereux, une teneur encore plus faible), la substance doit être considérée comme non rapidement dégradable.

#### **4.3.2 Disponibilité de la substance**

109. La dégradation des substances organiques dans l'environnement s'effectue principalement dans les milieux aquatiques ou dans les phases aquatiques du sol ou des sédiments. L'hydrolyse, bien entendu, requiert la présence d'eau, dont dépend par ailleurs l'activité des micro-organismes. En outre, la biodégradation suppose que les micro-organismes sont directement en contact avec la substance. La dissolution de la substance dans la phase aqueuse qui entoure les micro-organismes constitue donc le mode de contact le plus direct entre les bactéries et champignons et le substrat.

110. Les actuelles méthodes d'essai normalisées utilisées pour étudier la dégradabilité des substances chimiques ont été mises au point pour des composés d'essai facilement solubles. Or, de nombreuses substances organiques ne sont que légèrement solubles dans l'eau. Les essais normalisés nécessitant de 2 à 100 mg/L de substance d'essai, il se peut qu'on n'obtienne pas une disponibilité suffisante pour les substances faiblement hydrosolubles. Pour les composés légèrement solubles, on peut disposer d'essais avec mélange permanent et/ou à durée d'exposition prolongée, ou d'essais de conception spéciale, employant des concentrations de la substance d'essai inférieures à la solubilité dans l'eau.

#### **4.3.3 Durée de l'essai inférieure à 28 jours**

111. Une dégradation est parfois rapportée pour des essais achevés avant la période de 28 jours spécifiée dans les normes (voir MITI, 1992). Ces données sont bien sûr directement applicables lorsqu'on obtient une valeur de la dégradation supérieure ou égale au niveau de seuil. Si un niveau de dégradation inférieur est atteint, les résultats doivent être interprétés avec prudence. Il est notamment possible que la

durée de l'essai ait été trop courte et que la structure chimique aurait été dégradée dans un essai de biodégradabilité de 28 jours. Si une dégradation substantielle se produit dans un bref laps de temps, on peut comparer cette situation au critère  $DBO_5/DCO \geq 0.5$  ou aux exigences imposant à la dégradation de s'effectuer dans un intervalle de temps de 10 jours. Dans ce cas, une substance peut être considérée comme facilement dégradable (et donc rapidement dégradable), si :

- la biodégradabilité ultime dépasse 50 % en l'espace de 5 jours, ou
- la constante de vitesse de dégradation ultime sur cette période est supérieure à  $0.1 \text{ j}^{-1}$ , valeur correspondant à une demi-vie de 7 jours.

112. Ces critères ont pour objet de s'assurer qu'une minéralisation rapide s'est bien produite, même si l'essai s'est achevé en moins de 28 jours, avant que le niveau de seuil ne soit atteint. L'interprétation de données d'essai ne répondant pas aux niveaux de seuil prescrits doit être effectuée avec prudence. Il est impératif de déterminer si une biodégradabilité inférieure au niveau de seuil tient à la dégradation partielle de la substance et non à une minéralisation complète. Si la dégradation partielle est l'explication probable de la biodégradabilité observée, la substance doit être considérée comme non facilement biodégradable.

#### 4.3.4 Biodégradation primaire

113. Dans certains essais, on détermine uniquement la disparition du composé parent (c'est-à-dire la dégradation primaire), par exemple en suivant la dégradation par des analyses chimiques spécifiques de la substance d'essai ou du groupe auquel elle appartient. On ne peut utiliser les données sur la biodégradabilité primaire pour démontrer une dégradabilité rapide que s'il est possible de mettre en évidence de manière satisfaisante que les produits de dégradation formés ne répondent pas aux critères de classification des substances dangereuses pour l'environnement aquatique.

#### 4.3.5 Résultats contradictoires provenant d'essais de "screening"

114. Lorsque plusieurs données de dégradation sont disponibles pour une même substance, on peut se trouver en présence de résultats contradictoires. En général, les résultats contradictoires pour une substance testée à plusieurs reprises dans le cadre d'un essai de biodégradabilité approprié peuvent être interprétés par une approche fondée sur le "poids de la preuve". Cela signifie que si, pour une substance, on a obtenu à la fois des résultats positifs (c'est-à-dire, une dégradation supérieure au niveau de seuil) et des résultats négatifs lors d'essais de biodégradabilité facile, il faudra utiliser les données présentant la plus grande qualité et les mieux étayées pour déterminer la biodégradabilité facile de cette substance. Toutefois, les résultats positifs des essais de biodégradabilité facile peuvent être considérés comme valides, indépendamment des résultats négatifs, si leur qualité scientifique est bonne et si les conditions d'essai sont bien établies, c'est-à-dire si les critères des lignes directrices sont respectés, y compris l'utilisation d'un inoculum non pré-exposé (non adapté). Aucun des divers essais de "screening" ne se prête à l'étude de tous les types de substances, et il conviendra d'évaluer avec soin les résultats obtenus à l'issue d'une procédure d'essai ne convenant pas pour la substance particulière étudiée, avant de prendre une décision quant à leur utilisation.

115. Ainsi, un certain nombre de facteurs peuvent expliquer l'existence de données de biodégradabilité contradictoires provenant des essais de "screening" :

- l'inoculum ;
- la toxicité de la substance d'essai ;
- les conditions d'essai ;
- la solubilité de la substance d'essai, et
- la volatilisation de la substance d'essai.

116. L'aptitude de l'inoculum à dégrader la substance d'essai dépend de la présence et de la quantité d'agents de dégradation compétents. Lorsque l'inoculum est obtenu à partir d'un environnement précédemment exposé à la substance d'essai, il peut s'être adapté, comme le montre une capacité de dégradation supérieure à celle d'un inoculum provenant d'un environnement non exposé. Dans la mesure du possible, l'inoculum doit être prélevé dans un environnement non exposé, mais pour des substances très répandues utilisées en grandes quantités, et libérées à grande échelle ou de façon plus ou moins continue, ceci peut être difficile ou impossible. Si l'on obtient des résultats contradictoires, il convient de vérifier la provenance de l'inoculum afin de déterminer si des différences dans l'adaptation à la communauté microbienne en sont ou non la raison.

117. Comme indiqué précédemment, de nombreuses substances peuvent être toxiques ou exercer un effet inhibiteur à l'égard de l'inoculum aux concentrations relativement élevées testées dans les essais de biodégradabilité. L'essai du MITI modifié (I) (Ligne directrice 301C de l'OCDE) et l'essai de respirométrie manométrique (Ligne directrice 301F de l'OCDE) prescrivent en particulier des concentrations élevées (100 mg/l). Les concentrations de substance d'essai les plus faibles (2 à 10 mg/L) sont prescrites dans l'essai en flacon fermé (Ligne directrice 301D de l'OCDE). On peut évaluer la possibilité d'effets toxiques en intégrant un contrôle de toxicité dans l'essai de biodégradabilité facile ou en comparant la concentration d'essai avec des données provenant d'essais de toxicité sur des micro-organismes, comme les essais d'inhibition de la respiration (Ligne directrice 209 de l'OCDE), l'essai d'inhibition de la nitrification (ISO 9509) ou, si l'on ne dispose pas d'autres essais de toxicité microbienne, l'essai d'inhibition de la bioluminescence (ISO 11348). Lorsqu'on obtient des résultats contradictoires, ces résultats peuvent être dus à la toxicité de la substance d'essai. Si celle-ci n'exerce pas d'effet inhibiteur à des concentrations réalistes d'un point de vue environnemental, la dégradation la plus poussée mesurée dans les essais de "screening" peut être utilisée comme base pour la classification. Si, dans de tels cas, on dispose de données d'essais de simulation, la prise en compte de ces données peut être particulièrement importante car une concentration faible et non inhibitrice de la substance a pu être utilisée, donnant ainsi une indication plus fiable de la demi-vie de biodégradation de la substance dans des conditions d'environnement réalistes.

118. Si la solubilité de la substance d'essai est inférieure aux concentrations utilisées dans un essai, ce paramètre peut constituer le facteur limitant de la dégradation réelle mesurée. Dans un tel cas, les résultats provenant des essais utilisant les concentrations les plus faibles, c'est-à-dire souvent de l'essai en flacon fermé (Ligne directrice 301D de l'OCDE), doivent prévaloir sur les autres. En général, l'essai de disparition du COD (Ligne directrice 301A de l'OCDE) et l'essai de "screening" modifié de l'OCDE (Ligne directrice 301E de l'OCDE) ne conviennent pas au test de la biodégradabilité des substances peu solubles (par exemple, Ligne directrice 301 de l'OCDE).

119. Les substances volatiles ne doivent être testées que dans des systèmes fermés, comme dans l'essai en flacon fermé (Ligne directrice 301D de l'OCDE), l'essai MITI modifié (I) (Ligne directrice 301C de l'OCDE) et l'essai de respirométrie manométrique (Ligne directrice 301F de l'OCDE). Il convient d'évaluer avec prudence les résultats provenant d'autres essais, et de ne les prendre en compte que si l'on peut démontrer, par exemple par une estimation des bilans massiques, que l'élimination de la substance d'essai ne résulte pas d'une volatilisation.

#### **4.3.6 Variation des données d'essais de simulation**

120. Pour certains produits chimiques hautement prioritaires, on peut disposer d'un certain nombre de données d'essais de simulation. Ces données fournissent souvent une plage de demi-vies dans des milieux tels que le sol, les sédiments et/ou les eaux de surface. Les différences observées entre les demi-vies provenant d'essais de simulation réalisés sur la même substance peuvent refléter des différences entre les conditions d'essai, dont toutes peuvent être pertinentes d'un point de vue environnemental. Il convient de choisir pour la classification une demi-vie appropriée, située à l'extrémité supérieure de la plage observée des demi-vies provenant de ces études, en appliquant une démarche reposant sur le poids de la preuve et en tenant

compte du réalisme et de la pertinence des essais utilisés par rapport aux conditions environnementales. En général, les données tirées d'essais de simulation relatifs aux eaux de surface sont préférables aux données provenant d'essais de simulation concernant les sédiments aquatiques ou les sols lorsqu'il s'agit d'évaluer la dégradabilité rapide dans l'environnement aquatique.

#### 4.4 Schéma décisionnel

121. Le schéma décisionnel suivant peut être utilisé en tant qu'orientation générale pour faciliter les décisions au sujet de la dégradabilité rapide dans l'environnement aquatique et de la classification des produits chimiques dangereux pour cet environnement.

122. Une substance est considérée comme non rapidement dégradable, sauf si une au moins des conditions suivantes est remplie :

- 1) on démontre que la substance est facilement biodégradable dans un essai de biodégradabilité rapide de 28 jours. Le niveau de seuil de l'essai (élimination de 70 % du COD ou consommation de 60 % de la demande théorique en oxygène) doit être atteint dans les 10 jours suivant le début de la biodégradation, si les données d'essai disponibles permettent d'évaluer ce résultat. Si cette condition est impossible à remplir, le niveau de seuil doit être évalué, si possible, à l'intérieur d'un intervalle de temps de 14 jours ou après l'achèvement de l'essai ; ou
- 2) on démontre que la substance subit une dégradation ultime lors d'un essai de simulation dans des eaux de surface<sup>1</sup>, avec une demi-vie < 16 jours (correspondant à une dégradation > 70 % en l'espace de 28 jours) ; ou
- 3) on démontre que la substance subit une dégradation primaire (biotique ou abiotique) dans l'environnement aquatique, avec une demi-vie < 16 jours (correspondant à une dégradation > 70 % en l'espace de 28 jours) et que les produits de dégradation ne remplissent pas les critères de classification comme substances dangereuses pour l'environnement aquatique ; ou

Lorsque ces données ne sont pas disponibles, la dégradation rapide peut être démontrée si l'un des critères suivants est rempli :

- 4) on démontre que la substance subit une dégradation ultime dans un essai de simulation sur des sédiments ou des sols aquatiques<sup>1</sup>, avec une demi-vie < 16 jours (correspondant à une dégradation > 70% en l'espace de 28 jours) ; ou
- 5) si l'on dispose seulement de données sur la DBO<sub>5</sub> et la DCO, le rapport DBO<sub>5</sub>/DCO est supérieur ou égal à 0.5. Le même critère s'applique aux essais de biodégradabilité facile d'une durée inférieure à 28 jours, si la demi-vie est en outre inférieure à 7 jours.

Note 1. Les essais de simulation doivent refléter des conditions environnementales réalistes, telles qu'une faible concentration du produit chimique, une température réaliste et l'utilisation d'une biomasse microbienne ambiante n'ayant pas subi de pré-exposition au produit chimique.

123. Si l'on ne dispose d'aucun des types de données ci-dessus, la substance est considérée comme n'étant pas rapidement dégradable. Le respect d'un au moins des critères suivants peut étayer cette décision.

1. la substance n'est pas intrinsèquement dégradable dans un essai de biodégradabilité intrinsèque ;  
ou



2. une biodégradabilité lente de la substance est prédite par des QSAR scientifiquement valides, par exemple, dans le *Biodegradation Probability Program*, le résultat de dégradation rapide (modèle linéaire ou non linéaire) est inférieur à 0.5 ; ou
3. la substance est considérée comme non rapidement dégradable sur la base de preuves indirectes telles que, par exemple, la connaissance de substances structurellement similaires ; ou
4. on ne dispose d'aucune autre donnée concernant la dégradabilité.

## ANNEXE 4.I

## DÉTERMINATION DE LA DÉGRADABILITÉ DES SUBSTANCES ORGANIQUES

124. Les substances organiques peuvent être dégradées par des processus abiotiques ou biotiques, ou par une combinaison de tels procédés. On dispose, pour la détermination de la dégradabilité, d'un certain nombre de protocoles ou d'essais normalisés. Les principes généraux de certains d'entre eux sont décrits ci-après. Il ne s'agit en aucune façon de présenter un bilan exhaustif des méthodes d'essai de dégradabilité, mais seulement de placer ces méthodes dans le contexte de la classification des dangers pour l'environnement aquatique.

**1. DÉGRADABILITÉ ABIOTIQUE**

125. La dégradation abiotique comprend la transformation chimique et la transformation photochimique. Habituellement, les transformations abiotiques donnent d'autres composés organiques, mais ne provoquent pas une minéralisation complète (Schwarzenbach *et al.*, 1993). La transformation chimique est définie comme une transformation qui s'opère sans lumière et sans la médiation d'organismes, tandis que les transformations photochimiques nécessitent de la lumière.

126. Parmi les processus de transformation chimique observés dans un environnement aqueux, on peut citer l'hydrolyse, la substitution nucléophile, l'élimination et les réactions d'oxydo-réduction (Schwarzenbach *et al.*, 1993). L'hydrolyse est souvent considérée comme le plus important d'entre eux, et c'est le seul processus de transformation chimique pour lequel on dispose généralement de lignes directrices internationales pour les essais. Les essais de dégradation abiotique des produits chimiques prennent en général la forme d'une détermination des vitesses de transformation dans des conditions normalisées.

**2. HYDROLYSE**

127. L'hydrolyse désigne la réaction des nucléophiles  $H_2O$  ou  $OH^-$  avec un produit chimique, dans laquelle un groupe (sortant) du produit chimique est échangé avec un groupe OH. De nombreux composés, notamment les dérivés d'acide, sont susceptibles de s'hydrolyser. L'hydrolyse peut être abiotique ou biotique, mais en ce qui concerne les essais, on ne considère que l'hydrolyse abiotique. Elle peut s'effectuer par divers mécanismes à différents pH (hydrolyse neutre ou hydrolyse catalysée par un acide ou par une base), et les vitesses d'hydrolyse peuvent dépendre fortement de la valeur du pH.

128. On dispose en général de deux lignes directrices pour évaluer l'hydrolyse abiotique, la Ligne directrice 111 de l'OCDE "Hydrolyse en fonction du pH" (correspondant à OPPTS 835.2110) et la méthode OPPTS 835.2130 (*Hydrolysis as a function of pH and temperature*). La Ligne directrice 111 de l'OCDE permet de déterminer la vitesse d'hydrolyse globale à différentes valeurs du pH dans de l'eau pure tamponnée. L'essai est divisé en deux parties : un essai préliminaire réalisé sur des produits chimiques dont les vitesses d'hydrolyse sont inconnues et un essai plus détaillé, réalisé sur des substances connues comme instables dans l'eau et des substances pour lesquelles l'essai préliminaire a mis en évidence une hydrolyse rapide. Dans l'essai préliminaire, on mesure la concentration de produit chimique dans des solutions tamponnées à des pH compris dans la gamme habituellement rencontrée dans l'environnement (pH de 4, 7 et 9), à 50 °C, après 5 jours. Si la concentration du produit chimique a diminué de moins de 10 %, on considère le produit comme stable dans l'eau, sinon on peut procéder à l'essai détaillé. Ce dernier consiste à déterminer la vitesse d'hydrolyse globale pour trois valeurs du pH (4, 7 et 9), en mesurant la concentration du produit chimique en fonction du temps. On détermine la vitesse d'hydrolyse à différentes températures, de manière à pouvoir réaliser des interpolations ou des extrapolations aux températures observées dans l'environnement. La conception de l'essai OPPTS 835.2130 est presque identique à celle de la Ligne directrice 111 de l'OCDE, la différence résidant principalement dans le traitement des données.

129. Il convient de noter qu'outre l'hydrolyse, les constantes de vitesse d'hydrolyse déterminées par les essais couvrent toutes les autres transformations abiotiques pouvant se produire sans lumière, dans les conditions d'essai données. On a constaté un bon accord entre les vitesses d'hydrolyse dans des eaux naturelles et dans des eaux pures (OPPTS 835.2110).

### 3. PHOTOLYSE

130. Actuellement, il n'existe aucune ligne directrice de l'OCDE sur la photodégradation en milieu aqueux, mais un document d'orientation concernant la photolyse aquatique directe est disponible (OCDE, 1997). Ce document d'orientation est supposé constituer la base d'une ligne directrice dont la publication est prévue. D'après les définitions qui y figurent, la phototransformation de composés dans l'eau peut prendre la forme d'une phototransformation primaire ou secondaire, la phototransformation primaire (photolyse) pouvant encore se subdiviser en photolyse directe et photolyse indirecte. La phototransformation directe (photolyse) correspond au cas où le produit chimique absorbe de la lumière et subit une transformation qui est une conséquence directe de cette absorption. On parle de phototransformation indirecte lorsque d'autres espèces excitées transfèrent de l'énergie, des électrons ou des atomes d'hydrogène au produit chimique, induisant ainsi une transformation (photolyse sensibilisée). La phototransformation secondaire correspond au cas où des réactions chimiques se produisent entre le produit chimique et des espèces réactives à vie courte, telles que des radicaux hydroxy, des radicaux peroxy ou de l'oxygène singulet, qui se forment en présence de lumière par des réactions impliquant des espèces excitées comme de l'acide humique, de l'acide fulvique ou des nitrates excités.

131. Les seules lignes directrices actuellement disponibles sur la phototransformation des produits chimiques dans l'eau sont donc OPPTS 835.2210 (*Direct photolysis rate in water by sunlight*) et OPPTS 835.5270 (*Indirect photolysis screening test*). L'essai OPPTS 835.2210 utilise une approche à plusieurs niveaux. Au niveau 1, on calcule la constante de vitesse de photolyse directe maximale (demi-vie minimale) à partir d'une mesure de l'absorptivité molaire. Le niveau 2 comprend deux phases. Dans la phase 1, le produit chimique est photolysé par la lumière solaire et on obtient une constante de vitesse approximative. Dans la phase 2, on détermine une constante de vitesse plus précise en utilisant un actinomètre qui quantifie l'intensité lumineuse à laquelle le produit chimique a réellement été exposé. À partir des paramètres mesurés, on peut calculer la vitesse de photodégradation directe effective, à différentes températures et sous différentes latitudes. Cette vitesse de dégradation ne s'applique qu'à la couche supérieure de la masse d'eau, par exemple, aux 50 premiers centimètres ou moins, et seulement si l'eau est pure et saturée en air ce qui, à l'évidence, peut ne pas être le cas dans l'environnement. Les résultats peuvent toutefois être élargis à d'autres conditions environnementales, à l'aide d'un programme informatique intégrant l'atténuation dans les eaux naturelles et d'autres facteurs pertinents.

132. L'essai de "screening" OPPTS 835.5270 concerne la photolyse indirecte de produits chimiques dans des eaux contenant des substances humiques. Le principe de cet essai est que, dans les eaux naturelles exposées à la lumière solaire naturelle, la vitesse de phototransformation mesurée englobe à la fois les phototransformations directe et indirecte, tandis que seule la phototransformation directe se produit dans l'eau pure. Par conséquent, la différence entre la vitesse de photodégradation directe dans l'eau pure et la photodégradation totale dans l'eau naturelle est la somme de la photolyse indirecte et de la photodégradation secondaire, selon les définitions formulées dans le document d'orientation de l'OCDE. En conditions d'essai pratiques, on utilise des substances humiques industrielles pour constituer une eau humique synthétique, qui imite l'eau naturelle. Il convient de noter que la vitesse de phototransformation indirecte déterminée est valable uniquement pour la saison et la latitude pour lesquelles elle a été obtenue, et qu'il est impossible de transposer les résultats à d'autres latitudes et saisons.

#### **4. DÉGRADABILITÉ BIOTIQUE**

133. Seul un panorama sommaire des méthodes d'essai est présenté ci-après. Pour plus d'informations, consulter le document de synthèse de l'OCDE sur les essais de biodégradabilité (OCDE, 1995).

#### **5. BIODÉGRADABILITÉ FACILE**

134. Un certain nombre d'organisations ont mis au point des essais normalisés pour la détermination de la biodégradabilité facile des substances organiques, dont l'OCDE (Ligne directrice 301A-F de l'OCDE), l'Union européenne (Essais C.4), l'OPPTS (835.3110) et l'ISO (9408, 9439, 10707).

135. Les essais de biodégradabilité facile sont des essais rigoureux, qui laissent à la biodégradation et à l'acclimatation des possibilités limitées pour s'opérer. Les conditions d'essai de base garantissant ces spécifications sont les suivantes :

- forte concentration de la substance d'essai (2 à 100 mg/L) ;
- la substance d'essai est la seule source de carbone et d'énergie ;
- concentration d'inoculum faible à moyenne ( $10^4$  à  $10^8$  cellules/ml) ;
- aucune préadaptation de l'inoculum n'est autorisée ;
- période d'essai de 28 jours, comportant un intervalle de temps de 10 jours [excepté pour la méthode MITI modifiée I (Ligne directrice 301C de l'OCDE)], dans lequel la dégradation doit se produire ;
- température d'essai  $< 25^\circ\text{C}$  ; et
- niveaux de seuil de 70% (élimination du COD) ) ou 60% (évolution de la demande en  $\text{O}_2$  ou de la production de  $\text{CO}_2$ ), démontrant la minéralisation complète (le carbone restant de la substance d'essai étant supposé intégré à la biomasse croissante).

136. On suppose qu'un résultat positif à l'issue d'un des essais de biodégradabilité facile démontre que la substance se dégrade rapidement dans l'environnement (Lignes directrices de l'OCDE pour les essais).

137. Les essais de  $\text{DBO}_5$  classiques (par exemple, l'essai C5 de l'UE) peuvent également faire la preuve qu'une substance est facilement biodégradable. Dans ces essais, la demande biochimique en oxygène relative sur une période de 5 jours est comparée à la demande théorique en oxygène (DThO) ou, lorsque celle-ci n'est pas disponible, à la demande chimique en oxygène (DCO). L'essai est achevé en l'espace de cinq jours et le niveau de seuil, fixé à 50 % dans les critères de classification des dangers proposés, est par conséquent inférieur à celui des essais de biodégradabilité facile.

138. L'essai de "screening" sur la biodégradabilité dans l'eau de mer (Ligne directrice 306 de l'OCDE) peut être considéré comme un parallèle dans l'eau de mer des essais de biodégradabilité facile. Les substances atteignant le niveau de seuil dans la Ligne directrice 306 de l'OCDE (élimination du COD  $> 70\%$  ou consommation de la DthO  $> 60\%$ ) peuvent être considérées comme facilement biodégradables car le potentiel de dégradation est normalement plus faible dans l'eau de mer que dans l'eau douce.

#### **6. BIODÉGRADABILITÉ INTRINSÈQUE**

139. Les essais de biodégradabilité intrinsèque sont conçus pour déterminer si une substance possède un quelconque potentiel de dégradation. Parmi ces essais, on peut citer la Ligne directrice 302A-C de l'OCDE, les essais C.9 et C.12 de l'UE et l'essai ASTM E 1625-94.

140. Les conditions d'essai de base favorisant l'évaluation du potentiel de biodégradation intrinsèque sont :

- une exposition prolongée de la substance d'essai à l'inoculum, permettant l'adaptation avant l'achèvement de la période d'essai ;
- une forte concentration de micro-organismes ;
- un rapport substance/biomasse favorable.

141. Un résultat positif à l'issue d'un essai de biodégradabilité intrinsèque indique que la substance d'essai ne persistera pas indéfiniment dans l'environnement, mais on ne peut tabler sur une biodégradation rapide et complète. Un résultat démontrant une minéralisation supérieure à 70 % indique un potentiel de biodégradation ultime, une dégradation de plus de 20 % traduit une biodégradation primaire intrinsèque, et un résultat inférieur à 20 % révèle que la substance est persistante. Ainsi, un résultat négatif signifie qu'il faut supposer une non-biodégradabilité (persistante) de la substance (Lignes directrices de l'OCDE pour les essais).

142. Dans de nombreux essais de biodégradabilité intrinsèque, on ne mesure que la disparition de la substance d'essai. Un tel résultat démontre seulement une biodégradabilité primaire, et non une minéralisation complète. Des produits de dégradation plus ou moins persistants peuvent donc s'être formés. La biodégradation primaire d'une substance n'est pas l'indication d'une dégradabilité ultime dans l'environnement.

143. Les essais de biodégradabilité intrinsèque de l'OCDE adoptent une approche très différente et, en particulier, l'essai MITI II (Ligne directrice 302C de l'OCDE) utilise une concentration d'inoculum qui n'est que trois fois supérieure à celle de l'essai de biodégradabilité facile MITI I correspondant (Ligne directrice 301C de l'OCDE). De même, l'essai Zahn-Wellens (Ligne directrice 302B de l'OCDE) est un essai de biodégradabilité intrinsèque relativement "faible". Cependant, bien que le potentiel de dégradation dans ces essais ne soit guère supérieur à celui mis en évidence dans les essais de biodégradabilité facile, les résultats ne peuvent être extrapolés aux conditions des essais de biodégradabilité facile et au milieu aquatique.

## 7. ESSAIS DE SIMULATION AQUATIQUE

144. Un essai de simulation s'efforce de simuler la biodégradation dans un milieu aquatique spécifique. Parmi les essais normalisés de simulation de la dégradation dans l'environnement aquatique, on peut citer la méthode ISO/DS14592, Essai par agitation de lots de flacons, portant sur des eaux de surface ou des suspensions eau de surface/sédiments (Nyholm et Toräng, 1999), l'essai de biodégradation (méthode de disparition en flacon agité) ASTM E 1279-89(95) et l'essai similaire OPPTS 835.3170. Ces méthodes d'essai sont souvent appelées essais de disparition en rivière.

145. Les caractéristiques de ces essais qui garantissent la simulation des conditions de l'environnement aquatique sont :

- l'utilisation d'eau et de sédiments naturels comme inoculum ; et
- une faible concentration de la substance d'essai (1 à 100 µg/L) assurant l'obtention d'une cinétique de dégradation du premier ordre.

146. L'utilisation d'un composé d'essai marqué est recommandée pour faciliter la détermination de la dégradation ultime. Si seule l'élimination de la substance d'essai est déterminée par analyse chimique, on ne détermine que la dégradabilité primaire. Il est possible de déduire la constante de vitesse de dégradation en observant la cinétique de dégradation. En raison de la faible concentration de la substance d'essai, on suppose que la cinétique de dégradation qui prévaut est du premier ordre.

147. L'essai peut aussi être réalisé sur des sédiments naturels simulant les conditions dans le milieu sédimentaire. En outre, on peut déterminer la dégradation abiotique dans les conditions d'essai en stérilisant les échantillons.

## 8. ESSAIS DE SIMULATION DES STATIONS D'ÉPURATION DES EAUX USÉES

148. On dispose également d'essais pour simuler la dégradabilité dans une installation de traitement des eaux usées, comme la Ligne directrice 303A de l'OCDE (Unité de traitement par boues activées), l'essai ISO 11733 (Essai de simulation des boues activées) et l'essai C.10 de l'UE. Récemment, un nouvel essai de simulation, utilisant de faibles concentrations de polluants organiques, a été proposé (Nyholm *et al.*, 1996).

## 9. DÉGRADABILITÉ ANAÉROBIE

149. Les méthodes d'essai pour évaluer la biodégradabilité anaérobie déterminent le potentiel intrinsèque de biodégradation de la substance d'essai en conditions anaérobies. Parmi ces méthodes, on peut citer les essais ISO 11734:1995(E), ASTM E 1196-92 et OPPTS 835.3400.

150. Le potentiel de dégradation anaérobie est déterminé sur une période allant jusqu'à huit semaines et dans les conditions d'essai indiquées ci-après :

- réalisation de l'essai dans des récipients fermés, en l'absence d'O<sub>2</sub> (initialement dans une atmosphère de N<sub>2</sub> pur) ;
- utilisation de boue digérée ;
- température d'essai de 35 °C ; et
- détermination de la pression gazeuse de l'espace de tête (CO<sub>2</sub> et formation de CH<sub>4</sub>).

151. On évalue la dégradation ultime par détermination de la production de gaz. Cependant, on peut aussi déterminer la dégradation primaire en mesurant la substance mère restante.

## 10. DÉGRADATION DANS LE SOL ET LES SÉDIMENTS

152. De nombreuses substances chimiques finissent dans le sol ou dans les compartiments sédimentaires, et une évaluation de leur dégradabilité dans ces environnements peut donc être importante. Parmi les méthodes d'essai normalisées, on peut citer la Ligne directrice 304A de l'OCDE sur la biodégradabilité intrinsèque dans le sol, qui correspond à l'essai OPPTS 835.3300.

153. Les caractéristiques d'essai particulières permettant la détermination de la dégradabilité intrinsèque dans le sol sont :

- l'utilisation d'échantillons de sols naturels, sans inoculation supplémentaire ;
- l'utilisation d'une substance d'essai marquée ; et
- la détermination de l'évolution du CO<sub>2</sub> marqué.

154. L'essai OPPTS 835.3180 (*Sediment/water microcosm biodegradation*) constitue une méthode normalisée de détermination de la biodégradation dans les sédiments. On collecte des microcosmes contenant des sédiments et de l'eau en provenance des sites d'essai et on introduit les composés d'essai dans le système. On mesure la disparition du composé parent (c'est-à-dire, la biodégradation primaire) et, si cela est faisable, l'apparition de métabolites ou la biodégradation ultime.

155. Actuellement, deux nouvelles lignes directrices de l'OCDE sont en préparation. Elles portent sur la transformation aérobie et anaérobie, respectivement, dans le sol (Ligne directrice de l'OCDE pour les essais, 1999a) et dans les systèmes sédimentaires aquatiques (Ligne directrice de l'OCDE pour les essais, 1999b). Les expériences ont pour objet de déterminer la vitesse de transformation de la substance d'essai, ainsi que la nature et la vitesse de formation et de disparition des produits de transformation dans des

conditions d'environnement réalistes, y compris une concentration réaliste de la substance d'essai. On peut évaluer la minéralisation complète ou la dégradabilité primaire, selon la méthode analytique utilisée pour déterminer la transformation de la substance d'essai.

## 11. MÉTHODES D'ESTIMATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ

156. Ces dernières années, des moyens d'estimer les propriétés environnementales des substances chimiques ont été mis au point et, parmi eux, des méthodes de prédiction du potentiel de biodégradabilité des substances organiques (comme le *Biodegradability Probability Program* de la Syracuse Research Corporation, BIOWIN). Des bilans de ces méthodes ont été réalisés par l'OCDE (1993) et par Langenberg *et al.* (1996). Ils montrent que les méthodes de contribution de groupes apparaissent comme les méthodes les plus efficaces. Parmi celles-ci, le *Biodegradation Probability Program* (BIOWIN) semble avoir la plus large application. Il fournit une estimation qualitative de la probabilité de biodégradation lente ou rapide, en présence d'une population mixte de micro-organismes de l'environnement. Son applicabilité a été évaluée dans le cadre du projet conjoint USEPA/CE sur l'évaluation des (Q)SAR (OCDE, 1994), et par Pedersen *et al.* (1995). Cette dernière évaluation est examinée succinctement ci-après.

157. Un jeu de validation constitué de données de biodégradation déterminées expérimentalement a été sélectionné parmi les données provenant d'essais MITI (1992), en excluant les substances pour lesquelles on ne disposait pas de données de dégradation précises et les substances déjà utilisées pour la mise au point du programme. Ce jeu de validation comprenait alors 304 substances. On a estimé la biodégradabilité de ces substances en utilisant le module d'estimation non linéaire (le plus fiable) du programme et on a comparé les résultats avec les données mesurées. Une dégradabilité "rapide" a été prédite pour 162 substances, mais seules 41 (25 %) se sont révélées effectivement faciles à dégrader dans l'essai MITI I. Il a été prévu que 142 substances se dégraderaient "lentement", ce qui s'est confirmé pour 138 substances (97 %) qui sont apparues non facilement dégradables dans l'essai MITI I. On a ainsi conclu qu'il n'était possible d'utiliser le programme à des fins de classification que lorsqu'on ne pouvait pas obtenir de données de dégradation expérimentales et lorsque le programme prédisait une dégradation "lente" de la substance. Dans ce cas, la substance peut être considérée comme non rapidement dégradable.

158. Les responsables du projet conjoint USEPA/CE sur l'évaluation des (Q)SAR sont parvenus à la même conclusion en utilisant des données expérimentales et des données de type QSAR au sujet de nouvelles substances notifiées dans l'Union européenne. L'évaluation reposait sur une analyse des prédictions réalisées à partir de QSAR à propos de 115 nouvelles substances, également testées expérimentalement dans des essais de biodégradabilité facile. Seules 9 des substances incluses dans cette analyse étaient facilement biodégradables. La méthodologie QSAR employée n'est pas complètement spécifiée dans le rapport final du projet conjoint USEPA/CE (OCDE, 1994), mais il est probable que la majorité des prédictions ont été réalisées à l'aide de méthodes ultérieurement intégrées au *Biodegradation Probability Program*.

159. Il est également recommandé dans le Document d'orientation technique de l'UE (CE, 1996) d'utiliser avec prudence la biodégradabilité estimée à l'aide du *Biodegradation Probability Program*, car si le programme prédit une biodégradation rapide, ce résultat ne doit pas être pris en considération, tandis que la prédiction d'une biodégradation lente doit être prise en compte (CE, 1996).

160. Ainsi, l'utilisation prudente des résultats du *Biodegradability Probability Program* peut répondre aux besoins en matière d'évaluation de la biodégradabilité pour certaines des très nombreuses substances pour lesquelles on ne dispose d'aucune donnée de dégradation expérimentale.

## **ANNEXE 4.II**

### **FACTEURS INFLUANT SUR LA DÉGRADABILITÉ DANS L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE**

161. Les critères de classification de l'OCDE n'envisagent que les dangers pour l'environnement aquatique. Or, la classification des dangers repose principalement sur des données obtenues lors d'essais menés dans des conditions de laboratoire qui ne sont que rarement analogues aux conditions régnant dans l'environnement. Ainsi, pour prévoir les dangers dans l'environnement aquatique, il convient de prendre en compte l'interprétation des données d'essais en laboratoire.

162. L'interprétation des données provenant d'essais de biodégradabilité des substances organiques a fait l'objet d'une étude détaillée de l'OCDE (OCDE, 1995).

163. Les conditions observées dans l'environnement sont généralement très différentes de celles des systèmes d'essai normalisés, ce qui rend difficile l'extrapolation à l'environnement de données de dégradation provenant d'essais de laboratoire. Parmi ces différences, les aspects suivants ont une influence importante sur la dégradabilité :

- facteurs relatifs aux organismes (présence de micro-organismes compétents) ;
- facteurs relatifs au substrat (concentration de la substance et présence d'autres substrats) ; et
- facteurs relatifs à l'environnement (conditions physico-chimiques, présence de nutriments, biodisponibilité de la substance).

164. Ces aspects sont examinés plus en détail ci-après.

#### **1. PRÉSENCE DE MICRO-ORGANISMES COMPÉTENTS**

165. La biodégradation dans l'environnement aquatique dépend de la présence de micro-organismes compétents en nombre suffisant. Les communautés microbiennes naturelles sont constituées d'une biomasse très diverse et lorsqu'on introduit une "nouvelle" substance à une concentration suffisante, la biomasse peut s'adapter pour dégrader cette substance. Il est fréquent que l'adaptation de la population microbienne soit provoquée par le développement d'agents de dégradation spécifiques, qui par nature sont compétents pour dégrader cette substance. Cependant, d'autres processus, tels que l'induction enzymatique, l'échange de matériel génétique et le développement d'une tolérance à la toxicité, peuvent aussi intervenir.

166. L'adaptation s'effectue au cours d'une phase de "latence", qui correspond à l'intervalle de temps allant du début de l'exposition à l'amorce d'une dégradation importante. Il semble évident que la durée de la phase de latence dépendra de la présence initiale de dégradeurs compétents. Celle-ci dépendra encore une fois de l'histoire de la communauté microbienne, c'est-à-dire de l'éventualité que cette communauté ait été exposée antérieurement à la substance. Cela signifie que si une substance xénobiotique a été utilisée et émise de manière omniprésente pendant un certain nombre d'années, la probabilité de trouver des dégradeurs compétents augmentera. Il en sera tout particulièrement ainsi dans les environnements recevant des émissions, comme les stations d'épuration des eaux usées par traitement biologique. On obtient souvent des résultats de dégradation plus cohérents dans les essais sur des inoculums provenant d'eaux polluées que dans ceux réalisés à partir d'inoculums provenant d'eaux non polluées (OCDE, 1995 ; Nyholm et Ingerslev, 1997).

167. Un certain nombre de facteurs déterminent la comparabilité entre le potentiel d'adaptation dans l'environnement aquatique et le potentiel dans les essais de laboratoire. L'adaptation dépend entre autres :

- du nombre initial de dégradeurs compétents dans la biomasse (proportion et nombre) ;



- de la présence de surfaces de fixation ;
- de la concentration et de la disponibilité du substrat ; et
- de la présence d'autres substrats.

168. La durée de la phase de latence dépend du nombre initial de dégradeurs compétents et, pour les substances toxiques, de la survie et de la récupération de ces dégradeurs. Dans les essais de biodégradabilité facile normalisés, l'inoculum est prélevé dans des stations d'épuration des eaux usées. La charge de polluants étant normalement supérieure à celle présente dans l'environnement, la proportion et le nombre de dégradeurs compétents seront peut-être plus importants que dans un environnement aquatique moins pollué. Il est cependant difficile d'estimer dans quelle mesure la phase de latence dans l'environnement aquatique excédera celle de l'essai en laboratoire, en raison du nombre initial probablement plus faible de dégradeurs compétents.

169. Sur des périodes de temps prolongées, la concentration initiale de dégradeurs compétents importe peu, dans la mesure où ces dégradeurs se développeront lorsqu'un substrat approprié sera présent en concentration suffisante. Or, si l'on s'intéresse à la dégradabilité sur une courte période, la concentration initiale de micro-organismes dégradeurs compétents doit être prise en considération (Scow, 1982).

170. La présence de floccs, d'agrégats et de micro-organismes fixés peut aussi améliorer l'adaptation, par exemple, par le développement de niches microbiennes contenant des consortiums de micro-organismes. Ce phénomène est important lorsqu'on considère la capacité d'adaptation dans les divers environnements des stations d'épuration des eaux usées ou dans les sédiments ou le sol. Cependant, le nombre total de micro-organismes dans les essais de biodégradabilité facile et dans l'environnement aquatique est du même ordre de grandeur :  $10^4$  à  $10^8$  cellules/ml dans les essais de biodégradabilité facile et  $10^3$  à  $10^6$  cellules/ml ou plus dans les eaux de surface (Scow, 1982). On voit donc que ce facteur revêt probablement une importance mineure.

171. Lorsqu'on examine l'extrapolation aux conditions environnementales, il peut être utile de faire la distinction entre milieux oligotrophes et eutrophes. Les micro-organismes prospérant dans des conditions oligotrophes sont capables de minéraliser des substrats organiques à faibles concentrations (fractions de mg de carbone/L) et ils présentent normalement une plus grande affinité pour le substrat, mais des vitesses de croissance plus lentes et des temps de génération plus longs que les organismes eutrophes (OCDE, 1995). En outre, les populations oligotrophes sont incapables de dégrader des produits chimiques à des concentrations supérieures à 1 mg/L et peuvent même être inhibées à concentrations élevées. A l'opposé, les populations eutrophes nécessitent des concentrations plus importantes de substrat avant que la minéralisation ne commence et elles prospèrent à des concentrations plus élevées que les populations oligotrophes. Aussi le seuil inférieur de la dégradation dans l'environnement aquatique dépendra-t-il de la nature oligotrophe ou eutrophe de la population microbienne. On ignore cependant si les populations oligotrophes et eutrophes sont constituées d'espèces différentes ou s'il existe seulement deux modes de vie, oligotrophe et eutrophe (OCDE, 1995). La plupart des polluants parviennent dans le milieu aquatique directement par rejet d'eaux usées, et par conséquent les récepteurs sont essentiellement eutrophes.

172. On peut conclure de l'analyse qui précède que la probabilité de présence de dégradeurs compétents est plus grande dans des environnements fortement exposés, c'est-à-dire recevant en permanence des substances (ce qui se produit plus fréquemment pour les substances chimiques produites en grandes quantités que pour les substances produites en faibles quantités). Ces environnements sont souvent eutrophes et la dégradation peut donc nécessiter des concentrations relativement élevées de substances avant de débiter. Par ailleurs, les eaux vierges peuvent manquer d'espèces compétentes, en particulier d'espèces capables de dégrader des produits chimiques rejetés de façon uniquement occasionnelle, tels que les substances chimiques produites en faibles quantités.

## 2. FACTEURS RELATIFS AU SUBSTRAT

### 1.1 Concentration de la substance d'essai.

173. Dans la plupart des essais en laboratoire, la substance d'essai est appliquée à des concentrations très fortes (2 à 100 mg/L) par rapport à celles correspondant à la plage plus basse des  $\mu\text{g/L}$  que l'on s'attend à rencontrer dans l'environnement aquatique. En général, la croissance des micro-organismes n'est pas assurée lorsque le substrat est présent à des concentrations inférieures à un niveau seuil d'environ 10  $\mu\text{g/L}$  et à des concentrations plus basses, même les besoins en énergie pour le maintien de la population ne sont pas satisfaits (OCDE, 1995). Ce seuil inférieur s'explique peut-être par un manque de stimulus suffisant pour amorcer une réponse enzymatique (Scow, 1982). Cela signifie en général que les concentrations de nombreuses substances dans l'environnement aquatique sont telles que ces substances ne peuvent que difficilement constituer le substrat primaire de micro-organismes dégradeurs.

174. En outre, la cinétique de dégradation dépend de la concentration de la substance ( $S_0$ ) par rapport à la constante de saturation ( $K_s$ ) décrite par l'équation de Monod. La constante de saturation est la concentration de substrat résultant d'une vitesse de croissance spécifique représentant 50 % de la vitesse de croissance spécifique maximale. A des concentrations de substrat très inférieures à la constante de saturation, ce qui constitue la situation normale dans la plupart des environnements aquatiques, la dégradation peut être décrite par une cinétique du premier ordre ou logistique (OCDE, 1995). Lorsque la densité de micro-organismes est faible (inférieure à  $10^3$ - $10^5$  cellules/ml), par exemple dans des eaux oligotrophes, la population se développe à des vitesses qui ne cessent de diminuer, ce qui est typique des cinétiques logistiques. Lorsque la densité de micro-organismes est plus élevée (par exemple dans des eaux eutrophes), la concentration de substrat n'est pas suffisante pour assurer la croissance des cellules et une cinétique du premier ordre s'applique, c'est-à-dire que la vitesse de dégradation est proportionnelle à la concentration de substance. Dans la pratique, il peut être impossible de faire la distinction entre les deux types de cinétique de dégradation, en raison de l'incertitude sur les données (OCDE, 1995).

175. En conclusion, les substances présentes à faibles concentrations (c'est-à-dire inférieures à 10  $\mu\text{g/L}$ ) ne sont probablement pas dégradées sous forme de substrats primaires dans l'environnement aquatique. A des concentrations plus élevées, les substances facilement dégradables seront probablement dégradées sous forme de substrats primaires dans l'environnement, à une vitesse de dégradation plus ou moins proportionnelle à la concentration de la substance. La dégradation des substances sous forme de substrats secondaires est examinée ci-après.

### 2.2 Présence d'autres substrats

176. Dans les essais normalisés, on applique la substance d'essai en tant que substrat unique pour les micro-organismes, tandis que dans l'environnement, un grand nombre d'autres substrats sont présents. Dans les eaux naturelles, on relève souvent des concentrations de carbone organique dissous comprises entre 1 et 10 mg C/L, c'est-à-dire jusqu'à mille fois supérieures à la concentration d'un polluant. Cependant, une grande partie de ce carbone organique est relativement persistant, la fraction de matière persistante augmentant avec la distance au rivage.

177. Dans les eaux naturelles, les bactéries se nourrissent principalement d'exsudats provenant des algues. Ces exsudats sont minéralisés très rapidement (en l'espace de quelques minutes), ce qui démontre qu'il existe un fort potentiel de dégradation dans les communautés naturelles de micro-organismes. Ainsi, les micro-organismes étant en compétition vis-à-vis des divers substrats dans les eaux naturelles, une pression sélective s'exerce parmi eux, ce qui entraîne le développement d'espèces opportunistes capables de se nourrir de substrats rapidement minéralisés, tandis que le développement d'espèces plus spécialisées est empêché. Des expériences reposant sur l'isolement de bactéries capables de dégrader divers xénobiotiques

ont démontré que le développement de ces organismes est souvent relativement lent et qu'ils survivent à partir de sources de carbone complexes, en concurrence avec des bactéries à développements plus rapides. Lorsque des micro-organismes compétents sont présents dans l'environnement, leur nombre peut augmenter si le substrat xénobiotique spécifique est libéré en continu et atteint une concentration dans l'environnement suffisante pour favoriser la croissance. Cependant, la plupart des polluants organiques de l'environnement aquatique sont présents à faibles concentrations et ne se dégradent qu'en substrats secondaires, ne permettant pas la croissance.

178. Par ailleurs, la présence de substrats rapidement minéralisés à fortes concentrations peut faciliter une transformation initiale de la molécule xénobiotique par co-métabolisme. La substance co-métabolisée peut alors être disponible pour subir une dégradation et une minéralisation plus poussées. La présence d'autres substrats peut ainsi accroître les possibilités de dégradation d'une substance.

179. On peut alors conclure que la présence de divers substrats dans les eaux naturelles et, parmi eux, de substrats rapidement minéralisés peut, d'une part, entraîner une pression sélective empêchant le développement des micro-organismes compétents en termes de dégradation des micropolluants. D'autre part, elle peut faciliter une dégradation accrue par un co-métabolisme initial, suivi d'une minéralisation plus poussée. L'importance relative de ces processus dans les conditions naturelles peut varier à la fois en fonction des conditions environnementales et de la substance, et aucune généralisation ne peut encore être établie.

### **3. FACTEURS LIÉS À L'ENVIRONNEMENT**

180. Les variables environnementales régissent l'activité microbienne générale plutôt que des processus de dégradation spécifiques. Cependant, l'importance de cette influence varie entre les différents écosystèmes et les différentes espèces microbiennes (Scow, 1982).

#### **3.1 Potentiel redox**

181. L'un des principaux facteurs liés à l'environnement qui influent sur la dégradabilité est probablement la présence d'oxygène. La teneur en oxygène et le potentiel redox associé conditionnent la présence de différents types de micro-organismes dans des environnements aquatiques, les organismes aérobies étant présents dans la phase aqueuse, dans la couche supérieure de sédiments et dans certaines parties des stations d'épuration des eaux usées, et les organismes anaérobies étant présents dans les sédiments et dans certaines parties des stations d'épuration. Dans la majeure partie de la phase aqueuse, il règne des conditions aérobies et la prédiction de la biodégradabilité doit reposer sur des résultats d'essais aérobies. Cependant, dans certains environnements aquatiques, la teneur en oxygène peut être très faible pendant certaines périodes de l'année, en raison de l'eutrophisation et de la diminution consécutive de la production de matières organiques. Pendant ces périodes, les organismes aérobies ne seront pas en mesure de dégrader le produit chimique, mais des processus anaérobies peuvent prendre le relais si le produit chimique est dégradable en conditions anaérobies.

#### **3.2 Température**

182. La température constitue un autre paramètre important. La plupart des essais en laboratoire sont réalisés à 20-25°C (essais normalisés de biodégradabilité facile en conditions aérobies), mais les essais anaérobies peuvent être effectués à 35°C, température qui imite mieux les conditions dans un réacteur de boues. On constate une activité microbienne dans l'environnement à des températures allant de moins de 0°C à 100°C. Or, les températures optimales se situent probablement dans la plage allant de 10°C à 30°C et, grosso modo, la vitesse de dégradation double tous les 10°C à l'intérieur de cette plage (de Henau, 1993). En dehors de cette plage optimale, l'activité des dégradeurs est considérablement réduite, bien que certaines espèces spécialisées (bactéries thermophiles et psychrophiles) puissent prospérer. Si l'on extrapole

à partir des conditions de laboratoire, il convient de prendre en compte le fait que certains environnements aquatiques sont couverts de glace pendant des périodes importantes de l'année et que, pendant la saison hivernale, on ne peut s'attendre qu'à une dégradation mineure ou même inexistante.

### **3.3 pH**

183. On trouve des micro-organismes actifs dans la totalité de la gamme de pH observée dans l'environnement. Cependant, pour les bactéries en tant que groupe, des conditions légèrement alcalines favorisent l'activité et la plage de pH optimale correspond à 6-8. Pour un pH inférieur à 5, l'activité métabolique des bactéries diminue sensiblement. Pour les champignons en tant que groupe, des conditions légèrement acides favorisent l'activité, avec une plage de pH optimale correspondant à 5-6 (Scow, 1982). Ainsi, l'optimum de l'activité de dégradation des micro-organismes se situera probablement dans la plage de pH 5-8, soit celle la plus souvent rencontrée dans l'environnement aquatique.

### **3.2 Présence de nutriments**

184. La présence de nutriments inorganiques (azote et phosphore) est souvent nécessaire à la prolifération microbienne. Toutefois, ces nutriments ne représentent que rarement les facteurs limitant l'activité dans l'environnement aquatique, où le développement des micro-organismes est souvent limité par le substrat. La présence de nutriments influe néanmoins sur la prolifération des producteurs primaires et, encore une fois, sur la disponibilité d'exsudats facilement minéralisés.

## ANNEXE 4.III

## LIGNES DIRECTRICES POUR LES ESSAIS

**185. La plupart des lignes directrices mentionnées sont regroupées dans des compilations constituées par l'organisation qui les publie. Les principales références sont les suivantes :**

- Lignes directrices de la CE : Commission européenne (1996). Classification, emballage, et étiquetage des substances dangereuses dans l'Union européenne. Partie 2 – Méthodes d'essai. Commission européenne, 1997. ISBN92-828-0076-8. (page d'accueil : <http://ecb.ei.jrc.it/testing-methods/>) ;
- Lignes directrices de l'ISO : disponibles auprès des organismes de normalisation nationaux ou de l'ISO (page d'accueil : <http://www.iso.ch/>) ;
- Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris, 1993, avec mises à jour régulières (Page d'accueil : <http://www.oecd.org/ehs>) ;
- Lignes directrices de l'OPPTS : page d'accueil de l'US-EPA : <http://www.epa.gov/opptsfrs/home/guidelin.htm>;
- ASTM : page d'accueil de l'ASTM : <http://www.astm.org>. Poursuivre la recherche via le terme "standards".

ASTM E 1196-92.

ASTM E 1279-89(95) Standard test method for biodegradation by a shake-flask die-away method.

ASTM E 1625-94 Standard test method for determining biodegradability of organic chemicals in semi-continuous activated sludge (SCAS).

CE C.4. A à F - Biodégradation : détermination de la biodégradabilité "facile" Directive 67/548/CEE, Annexe V. (1992).

CE C.5. Dégradation : Demande biochimique en oxygène. Directive 67/548/CEE, Annexe V. (1992).

CE C.7. Dégradation abiotique : Hydrolyse en fonction du pH. Directive 67/548/CEE, Annexe V. (1992).

CE C.9. Biodégradation : Essai Zahn-Wellens. Directive 67/548/CEE, Annexe V. (1988).

CE C.10. Biodégradation: Essais de simulation de boues activées. Directive 67/548/CEE, Annexe V. (1998).

CE C.11. Biodégradation : Boues activées : essai d'inhibition de la respiration. Directive 67/548/CEE, Annexe V.(1988).

CE C.12. Biodégradation : Test S.C.A.S. modifié. Directive 67/548/CEE Annexe V. (1998).

ISO 9408 (1991). Qualité de l'eau – Évaluation, en milieu aqueux, de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques par détermination de la demande en oxygène dans un respiromètre fermé.

ISO 9439 (1990). Qualité de l'eau – Évaluation de la biodégradabilité aérobie ultime en milieu aqueux des composés organiques – Essai de dégagement de dioxyde de carbone.

ISO 9509 (1996). Qualité de l'eau – Méthode pour l'évaluation de l'effet inhibiteur sur la nitrification par des micro-organismes de boues activées par des produits chimiques ou des eaux résiduaires.

ISO 9887 (1992). Qualité de l'eau – Évaluation, en milieu aqueux, de la biodégradabilité aérobie des composés organiques – Méthode semi-continue par boues activées (méthode SCAS).

ISO 9888 (1991). Qualité de l'eau – Évaluation, en milieu aqueux, de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques – Essai statique (méthode Zahn-Wellens).

ISO 10707 (1994). Qualité de l'eau – Évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie "ultime" des composés organiques – Méthode par analyse de la demande biochimique en oxygène (essai en fiole fermée).

ISO 11348 (1997). Qualité de l'eau – Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de *Vibrio fischeri* (essai de bactéries luminescentes).

ISO 11733 (1994). Qualité de l'eau – Évaluation de l'élimination et de la biodégradabilité des composés organiques en milieu aqueux – Essai de simulation des boues activées.

ISO 11734 (1995). Qualité de l'eau – Évaluation de la biodégradabilité anaérobie "ultime" des composés organiques dans les boues de digesteurs – Méthode par mesurage de la production de biogaz.

ISO/FDIS 14592 (1999) Qualité de l'eau - Evaluation de la biodégradabilité aérobie des composés organiques présents en faibles concentrations. Partie 1: Essai par agitation de lots de flacons avec des eaux de surface ou des suspensions eaux de surface/sédiments (22.11.1999).

Ligne directrice 111 de l'OCDE (1981). Hydrolyse en fonction du pH. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

Ligne directrice 209 de l'OCDE (1984). Boue activée, essai d'inhibition de la respiration. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

Ligne directrice 301 de l'OCDE (1992). Biodégradabilité facile. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

Ligne directrice 302A de l'OCDE (1981). Biodégradabilité dite intrinsèque : méthode SCAS modifiée. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

Ligne directrice 302B de l'OCDE (1992). Essai Zahn-Wellens/EMPA. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

Ligne directrice 302C de l'OCDE (1981). Biodégradabilité dite intrinsèque : essai MITI modifié (II). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

Ligne directrice 303A de l'OCDE (1981). Unité de traitement par boues activées. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Projet de mise à jour disponible en 1999.

Ligne directrice 304A de l'OCDE (1981). Biodégradabilité intrinsèque dans le sol. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

Ligne directrice 306 de l'OCDE (1992). Biodégradabilité dans l'eau de mer. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

OCDE (1998). Transformation aérobie et anaérobie dans les sédiments aquatiques. Projet de proposition de nouvelle ligne directrice, décembre 1999.

OCDE (1999). Transformation aérobie et anaérobie dans le sol. Texte final d'une proposition de projet de nouvelle ligne directrice, octobre 1999.

OCDE (2000). Essai de simulation – Traitement aérobie des eaux usées. Proposition de projet de nouvelle ligne directrice, mai 2000.

OPPTS 835.2110 Hydrolysis as a function of pH.

OPPTS 835.2130 Hydrolysis as a function of pH and temperature.

OPPTS 835.2210 Direct photolysis rate in water by sunlight.

OPPTS 835.3110 Ready biodegradability.

OPPTS 835.3170 Shake flask die-away test.

OPPTS 835.3180 Sediment/water microcosm biodegradability test.

OPPTS 835.3200 Zahn-Wellens/EMPA test.

OPPTS 835.3210 Modified SCAS test.

OPPTS 835.3300 Soil biodegradation.

OPPTS 835.3400 Anaerobic biodegradability of organic chemicals.

OPPTS 835.5270 Indirect photolysis screening test: Sunlight photolysis in waters containing dissolved humic substances.

## ANNEXE 4.IV

### RÉFÉRENCES

Boesten J.J.T.I. & A.M.A. van der Linden (1991). Modeling the influence of sorption and transformation on pesticide leaching and persistence. *J. Environ. Qual.* 20, 425-435.

Boethling R.S., P.H. Howard, J.A. Beauman & M.E. Larosche (1995). Factors for intermedia extrapolation in biodegradability assessment. *Chemosphere* 30(4), 741-752.

CE (1996). Technical guidance documents in support of the Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and the Commission Regulation (EC) No. 1488/94 on risk assessment for existing substances. Commission européenne, Ispra.

de Henau H. (1993). Biodegradation. In: P. Calow. Handbook of Ecotoxicology, vol. I. Blackwell Scientific Publications, Londres. Chapitre 18, pp. 355-377.

EC (1996). Technical guidance documents in support of the Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and the Commission Regulation (EC) No. 1488/94 on risk assessment for existing substances. European Commission, Ispra.

ECETOC (1998): QSARs in the Assessment of the Environmental Fate and Effects of Chemicals, Technical report No. 74. Bruxelles, juin 1998.

Federle T.W., S.D. Gasior & B.A. Nuck (1997). Extrapolating mineralisation rates from the ready CO<sub>2</sub> screening test to activated sludge, river water, and soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 127-134.

Langenberg J.H., W.J.G.M. Peijnenburg & E. Rorije (1996). On the usefulness and reliability of existing QSBRs for risk assessment and priority setting. *SAR and QSAR in Environmental Research* 5, 1-16.

Loonen H., F. Lindgren, B. Hansen & W. Karcher (1996). Prediction of biodegradability from chemical structure. In: Peijnenburg W.J.G.M. & J. Damborsky (eds.). Biodegradability Prediction. Kluwer Academic Publishers.

MITI (1992). Biodegradation and bioaccumulation data on existing data based on the CSCL Japan. Japan chemical industry, Ecology-toxicology & information center. ISBN 4-89074-101-1.

Niemelä J. (2000). Communication personnelle avec la Direction de l'environnement de l'OCDE, 20 mars 2000.

Nyholm N., U.T. Berg & F. Ingerslev (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Danish EPA, Environmental Report No. 337.

Nyholm N. & F. Ingerslev (1997). Kinetic biodegradation tests with low test substance concentrations: Shake flask test with surface water and short term rate measurement in activated sludge. In: Hales S.G. (ed.). Biodegradation Kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making. From the SETAC-Europe Workshop. Port- Sunlight. Septembre 1996. pp. 101-115. SETAC-Europe, Bruxelles.



Nyholm N. & L. Toräng (1999). Report of 1998/1999 Ring-test: Shalke flask batch test with surface water or surface water / sediment suspensions. ISO/CD 14592-1 Water Quality- Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations, ISO/TC 147/ SC5/WG4 Biodegradability.

OCDE (1993). Structure-Activity Relationships for Biodegradation. OECD Environment Monographs No. 68. Paris 1993.

OCDE (1994). "US EPA/EC Joint Project on the Evaluation of (Quantitative) Structure Activity Relationships." OECD Environment Monograph No. 88. Paris.

OCDE (1995). Detailed Review Paper on Biodegradability Testing. OECD Environmental Monograph No. 98. Paris.

OCDE (1997). Guidance document on direct phototransformation of chemical in water. OECD/GD(97)21. Paris.

OCDE (1998). Harmonized integrated hazard classification system for human health and environmental effects of chemical substances. Paris. <http://www.oecd.org/ehs>.

Pedersen F., H. Tyle, J. R. Niemelä, B. Guttman. L. Lander & A. Wedebrand (1995). Environmental Hazard Classification - data collection and interpretation guide for substances to be evaluated for classification as dangerous for the environment. Nordic Council of Ministers. 2nd edition. TemaNord 1995:581, 166 pp.

Schwarzenbach R.P., P.M. Gschwend & D.M. ImDBOen (1993). Environmental organic chemistry 1st ed. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Scow K.M. (1982). Rate of biodegradation. In: Lyman W.J., W.F. Reehl & D.H. Rosenblatt (1982): Handbook of Chemical Property Estimation Methods Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society. Washington DC (ISBN 0-8412-1761-0). Chapitre 9.

Struijs J. & R. van den Berg (1995). Standardized biodegradability tests: Extrapolation to aerobic environments. *Wat. Res.* 29(1), 255-262.

Syracuse Research Corporation. Biodegradation Probability Program (BIOWIN). Syracuse. N.Y. <http://esc.syrres.com/~esc1/biodeg.htm>.

Westermann P., B.K. Ahring & R.A. Mah (1989). Temperature compensation in *Methanosarcina barkeri* by modulation of hydrogen and acetate affinity. *Applied and Environmental Microbiology* 55(5), 1262-1266.

## 5. BIOACCUMULATION

### 5.1 INTRODUCTION

186. La bioaccumulation est l'une des propriétés intrinsèques importantes des substances chimiques qui déterminent leur danger potentiel pour l'environnement. La bioaccumulation d'une substance dans un organisme ne constitue pas un danger en soi, mais la bioconcentration et la bioaccumulation entraîneront une charge corporelle qui pourra ou non conduire à des effets toxiques. Le système harmonisé et intégré de classification des dangers pour la santé humaine et l'environnement des substances chimiques (OCDE, 1998) contient l'expression "potentiel de bioaccumulation". Il convient cependant d'établir une distinction entre bioconcentration et bioaccumulation. Ici, la bioconcentration est définie comme le résultat net de l'absorption, de la transformation et de l'élimination d'une substance dans un organisme, résultant d'une exposition via l'eau, tandis que la bioaccumulation englobe toutes les voies d'exposition (air, eau, sédiments/sol et aliments). Enfin, la biomagnification est définie comme l'accumulation et le transfert de substances par l'intermédiaire de la chaîne alimentaire, entraînant une augmentation des concentrations internes dans les organismes situés à des niveaux plus élevés de la chaîne trophique (Commission européenne, 1996). Pour la plupart des produits chimiques organiques, on pense que l'absorption à partir de l'eau (bioconcentration) constitue la voie d'absorption prédominante. L'absorption à partir des aliments ne devient importante que pour les substances très hydrophobes. Par ailleurs, les critères de classification harmonisés utilisent le facteur de bioconcentration (ou le coefficient de partage octanol-eau) comme mesure du potentiel de bioaccumulation. Pour toutes ces raisons, le présent document d'orientation ne considère que la bioconcentration et ne tient pas compte de l'absorption par l'intermédiaire des aliments ou d'autres voies.

187. Le classement d'une substance chimique repose principalement sur ses propriétés intrinsèques. Cependant, le degré de bioconcentration dépend également de facteurs tels que le degré de biodisponibilité, la physiologie de l'organisme d'essai, le maintien d'une concentration d'exposition constante, la durée d'exposition, le métabolisme à l'intérieur du corps de l'organisme cible et l'excrétion. L'interprétation du potentiel de bioconcentration dans un contexte de classification chimique nécessite donc une évaluation des propriétés intrinsèques de la substance, ainsi que des conditions expérimentales dans lesquelles le facteur de bioconcentration (FBC) a été déterminé. A partir du guide, un schéma décisionnel pour l'application à la classification des données concernant la bioconcentration ou le  $\log K_{oe}$  a été mis au point. Le présent chapitre porte principalement sur les substances organiques et les composés organométalliques. La bioaccumulation des métaux est également examinée au chapitre 7.

188. Les données relatives aux propriétés de bioconcentration d'une substance peuvent être obtenues par des essais normalisés ou estimées à partir de la structure de la molécule. L'interprétation de ces données à des fins de classification nécessite souvent une évaluation détaillée des données d'essai. Pour faciliter cette évaluation, deux annexes supplémentaires ont été jointes à ce document. Elles décrivent les méthodes disponibles (annexe 5.I) et les facteurs influant sur le potentiel de bioconcentration (annexe 5.II). Enfin, deux autres annexes (annexes 5.III et 5.IV) contiennent respectivement une liste des méthodes expérimentales normalisées de détermination de la bioconcentration et de  $K_{oe}$ , et une liste de références.

### 5.2 INTERPRÉTATION DES DONNÉES DE BIOCONCENTRATION

189. Le classement d'une substance chimique sous l'angle des dangers pour l'environnement repose normalement sur les données existantes au sujet de ses propriétés environnementales. Les données d'essai sont rarement produites dans l'objectif principal de faciliter une classification. On dispose souvent d'une gamme variée de données d'essai, qui ne cadrent pas nécessairement avec les critères de classification. Des

orientations sont donc nécessaires pour interpréter les données d'essai existantes dans le contexte de la classification des dangers.

190. La bioconcentration d'une substance organique peut être déterminée expérimentalement par des essais de bioconcentration, au cours desquels on mesure le FBC comme le rapport entre la concentration dans l'organisme et la concentration dans l'eau aux conditions d'équilibre, et/ou on l'estime à partir de la constante cinétique d'absorption ( $k_1$ ) et de la constante cinétique d'élimination ( $k_2$ ) (Ligne directrice 305 de l'OCDE, 1996). En général, le potentiel de bioconcentration d'une substance organique est principalement lié au caractère lipophile de cette substance. Ce caractère se mesure par le coefficient de partage octanol-eau ( $K_{oe}$ ) qui, pour les substances organiques lipophiles non ioniques, subissant un métabolisme ou une biotransformation minimale à l'intérieur de l'organisme, est corrélé au facteur de bioconcentration. Par conséquent, on utilise souvent  $K_{oe}$  pour estimer la bioconcentration de substances organiques à partir de la relation empirique entre  $\log$  FBC et  $\log K_{oe}$ . Pour la plupart des substances organiques, on dispose de méthodes d'estimation pour calculer  $K_{oe}$ . Les données relatives aux propriétés de bioconcentration d'une substance peuvent donc être (1) déterminées expérimentalement, (2) estimées à partir de valeurs de  $K_{oe}$  déterminées expérimentalement, ou (3) estimées à partir de valeurs de  $K_{oe}$  obtenues par l'application de relations quantitatives structure-activité (QSAR). On trouvera ci-après des orientations pour l'interprétation de ces données, ainsi que des indications sur l'évaluation des catégories chimiques nécessitant une attention spéciale.

### 5.2.1 Facteur de bioconcentration (FBC)

191. Le facteur de bioconcentration est défini comme le rapport pondéral entre la concentration du produit chimique dans un biote et sa concentration dans le milieu environnant, ici l'eau, à l'état stationnaire. Le FBC peut ainsi être déterminé expérimentalement dans les conditions correspondant à l'état stationnaire, à partir des concentrations mesurées. Cependant, il peut aussi être calculé comme le rapport entre les constantes d'absorption et d'élimination du premier ordre, cette méthode ne nécessitant pas de se trouver aux conditions d'équilibre.

192. Différentes lignes directrices pour les essais, visant à déterminer expérimentalement la bioconcentration chez le poisson, ont été étudiées et adoptées, la plus couramment appliquée étant la Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n°305 (OCDE, 1996).

193. On préfère en fin de compte, pour la classification, des valeurs du FBC déterminées expérimentalement de haute qualité, dans la mesure où de telles données ont la priorité sur des données de substitution comme  $K_{oe}$ , par exemple.

194. Les données de haute qualité sont définies comme des données pour lesquelles les critères de validité de la méthode d'essai appliquée sont respectés et décrits, par exemple : maintien de la concentration d'exposition à une valeur constante, variations de la teneur en oxygène et de la température et attestation que les conditions d'équilibre ont été atteintes, etc. L'expérience sera considérée comme une étude de haute qualité si une description convenable est fournie (par exemple, par les Bonnes pratiques de laboratoire), permettant de vérifier que les critères de validité sont respectés. De plus, une méthode analytique appropriée doit être utilisée pour doser le produit chimique et ses métabolites toxiques dans l'eau et les tissus de poisson (voir l'annexe 1, pour plus de détails).

195. Une qualité médiocre ou incertaine des valeurs du FBC peut se traduire par une valeur erronée ou trop faible de ce facteur ; c'est le cas, par exemple, lorsqu'on a utilisé les concentrations mesurées de la substance d'essai dans le poisson et dans l'eau, mais que les mesures ont été réalisées après une durée d'exposition trop courte, pour laquelle les conditions d'équilibre n'étaient pas atteintes (voir Ligne directrice 306 de l'OCDE, 1996, concernant l'estimation du temps nécessaire pour atteindre l'équilibre). Par

conséquent, ces données doivent faire l'objet d'une évaluation soignée avant d'être utilisées et il convient d'envisager d'employer  $K_{oc}$  à la place.

196. En l'absence de valeur du FBC pour des espèces de poisson, il est possible d'utiliser des données de haute qualité relatives à la valeur de ce facteur pour d'autres espèces [par exemple, FBC déterminé sur des moules bleues, des huîtres, des coquilles Saint-Jacques (ASTM E 1022-94)]. Les valeurs du FBC rapportées pour des micro-algues doivent être utilisées avec prudence.

197. Pour les substances fortement lipophiles, par exemple présentant une valeur de  $\log K_{oc}$  supérieure à 6, les valeurs du FBC déterminées expérimentalement tendent à diminuer lorsque  $\log K_{oc}$  augmente. Les explications théoriques de cette non-linéarité font principalement référence à une diminution de la cinétique de perméation membranaire ou à une baisse de la solubilité dans les lipides biotiques pour les grosses molécules. On observera alors un faible degré de biodisponibilité et d'absorption de ces substances dans l'organisme. D'autres facteurs peuvent notamment intervenir : artefacts expérimentaux, tel qu'un équilibre non atteint, réduction de la biodisponibilité due à la sorption dans des matières organiques présentes dans la phase aqueuse, et erreurs analytiques. Il convient donc de prendre des précautions particulières pour évaluer les données expérimentales relatives au FBC de substances fortement lipophiles, car ces données comporteront un niveau d'incertitude beaucoup plus élevé que les valeurs de FBC déterminées pour des substances moins lipophiles.

#### **FBC pour différentes espèces d'essai**

198. Les valeurs de FBC utilisées pour la classification reposent sur des mesures portant sur le corps entier. Comme indiqué précédemment, les meilleures données pour la classification sont les valeurs du FBC obtenues à l'aide de la méthode d'essai OCDE 305, ou de méthodes équivalentes au plan international, faisant appel à des poissons de petite taille. Le rapport surface branchiale/poids étant plus élevé pour les petits organismes que pour les grands, les conditions à l'état stationnaire sont atteintes plus tôt dans les premiers que dans les seconds. La taille des organismes (poissons) utilisés dans les études de bioconcentration présente donc une importance considérable en regard de la durée de la phase d'absorption, lorsque la valeur du FBC rapportée repose uniquement sur des concentrations mesurées dans le poisson et dans l'eau, à l'état stationnaire. C'est pourquoi, si de gros poissons, par exemple des saumons adultes, ont été utilisés dans des études de bioconcentration, il convient d'évaluer si la période d'absorption a été suffisamment longue pour que l'état stationnaire ait été atteint ou pour qu'une constante cinétique d'absorption puisse être déterminée avec précision.

199. En outre, lorsqu'on utilise des données existantes pour la classification, il est possible que les valeurs du FBC aient été obtenues à partir de plusieurs poissons différents ou d'autres espèces aquatiques (par exemple, des palourdes) et pour différents organes du poisson. La comparaison de ces données entre elles et avec les critères nécessitera par conséquent certaines bases communes ou une normalisation. On a noté qu'il existait une relation étroite entre la teneur en lipides d'un poisson ou d'un organisme aquatique et la valeur du FBC observée. Par conséquent, lorsqu'on compare les valeurs du FBC pour différentes espèces de poissons ou lorsqu'on convertit des valeurs du FBC pour des organes spécifiques en valeurs relatives au corps entier, on procède communément en exprimant les valeurs du FBC par rapport à une teneur en lipides commune. Si, par exemple, on trouve dans la littérature des valeurs du FBC relatives au corps entier ou à des organes spécifiques, la première étape consiste à calculer le FBC par rapport au pourcentage de lipides, en utilisant une teneur relative en graisses dans le poisson (on trouvera dans la littérature ou la ligne directrice pour les essais la teneur en graisse caractéristique de l'espèce d'essai) ou dans l'organe. La deuxième étape consiste à calculer le FBC relatif au corps entier pour un organisme aquatique type (c'est-à-dire, un petit poisson), en supposant une teneur en lipides par défaut commune. Le plus souvent, on utilise une valeur par défaut de 5 % (Pedersen *et al.*, 1995), car elle représente la teneur en lipides moyenne des petits poissons utilisés dans la Ligne directrice 305 de l'OCDE (1996).

200. Généralement, on utilise la valeur du FBC valide la plus élevée, exprimée par rapport à cette base lipidique commune, pour déterminer la valeur du FBC par rapport au poids frais, en vue de la comparer avec la valeur limite de 500 retenue dans les critères de classification harmonisés.

### Utilisation de substances marquées

201. L'utilisation de substances d'essai ayant subi un marquage radioactif peut faciliter l'analyse des échantillons d'eau et de poisson. Or, à moins d'être associée à une méthode d'analyse spécifique, la mesure de la radioactivité totale peut refléter la présence de la substance mère, comme celle d'un ou plusieurs métabolites éventuels et de carbone éventuellement métabolisé, ayant été incorporé dans des molécules organiques des tissus de poisson. Les valeurs du FBC déterminées à l'aide de substances d'essai marquées sont donc normalement surestimées.

202. Lorsqu'on utilise des substances marquées, le marquage radioactif est le plus souvent situé dans la partie stable de la molécule, c'est pourquoi la valeur du FBC mesurée inclut le FBC des métabolites. Pour certaines substances, c'est le métabolite qui présente la plus forte toxicité et le potentiel de bioconcentration le plus élevé. Les mesures de la substance mère et des métabolites peuvent par conséquent être importantes pour l'interprétation du danger pour l'environnement aquatique (y compris le potentiel de bioconcentration) de ces substances.

203. Dans les expériences ayant fait appel à des substances marquées, on trouve souvent des concentrations élevées de marqueurs radioactifs dans la vésicule biliaire des poissons. La cause en est attribuée à la biotransformation dans le foie et à l'excrétion ultérieure des métabolites dans la vésicule (Comotto *et al.*, 1979 ; Wakabayashi *et al.*, 1987 ; Goodrich *et al.*, 1991 ; Toshima *et al.*, 1992). Si les poissons ne mangent pas, le contenu de la vésicule biliaire ne se vide pas dans l'intestin et des concentrations élevées de métabolites peuvent s'accumuler dans la vésicule. Le régime alimentaire peut ainsi avoir un effet prononcé sur le FBC mesuré. Dans la littérature, on trouve de nombreuses études faisant appel à des composés marqués, et dans lesquelles les poissons ne sont pas nourris. On relève donc des concentrations élevées de matière radioactive dans la vésicule biliaire. Ces études peuvent avoir surestimé dans la plupart des cas la bioconcentration. Ainsi, lors de l'évaluation des expériences dans lesquelles on a utilisé des composés marqués, il est essentiel d'examiner également le régime alimentaire.

204. Si le FBC, exprimé à partir des résidus radioactifs, est enregistré comme  $\geq 1\ 000$ , la Ligne directrice 305 de l'OCDE (1996) recommande fortement, par exemple pour les pesticides, d'identifier et de quantifier les produits de dégradation qui représentent au moins 10 % des résidus totaux dans les tissus de poisson à l'état stationnaire. En l'absence d'une identification et d'une quantification des métabolites, l'évaluation de la bioconcentration doit se fonder sur la valeur du FBC mesurée sur les composés marqués. Si, pour des substances ayant une forte tendance à la bioaccumulation ( $FBC \geq 500$ ), on dispose uniquement de valeurs du FBC déterminées à partir de mesures du composé parent et de mesures sur des composés marqués, il convient d'utiliser les dernières en relation avec la classification.

### 5.2.2 Coefficient de partage octanol-eau ( $K_{oe}$ )

205. Pour les substances organiques, il est préférable d'utiliser des valeurs de  $K_{oe}$  de haute qualité obtenues expérimentalement, ou des valeurs déterminées dans des études et désignées comme "valeurs recommandées". En l'absence de données expérimentales de haute qualité, il est possible d'utiliser, dans le processus de classification, des données validées de type QSAR (relations quantitatives structure-activité) pour évaluer  $\log K_{oe}$ . De telles QSAR validées peuvent être employées sans modification des critères convenus si elles ne portent que sur des produits chimiques pour lesquels leur applicabilité est bien définie. Pour les bases et acides forts, les substances qui réagissent avec l'éluant ou les substances tensioactives, il convient de fournir une valeur de  $K_{oe}$  estimée à partir des QSAR ou à partir des solubilités individuelles

dans le *n*-octanol et l'eau, au lieu d'une détermination analytique de  $K_{oe}$  (CEE A.8, 1992 ; Ligne directrice 117 de l'OCDE, 1989). Il convient de réaliser les mesures portant sur des substances ionisables sous leur forme non ionisée (acide ou base libre), en utilisant uniquement un tampon approprié, dont le pH est inférieur au pK pour un acide libre ou supérieur au pK pour une base libre.

### Détermination expérimentale de $K_{oe}$

206. Pour déterminer expérimentalement  $K_{oe}$ , plusieurs méthodes différentes, par agitation en flacon et par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), sont décrites dans les lignes directrices normalisées, notamment la Ligne directrice 107 de l'OCDE (1995), la Ligne directrice 117 de l'OCDE (1989), les documents CEE A.8. (1992), EPA-OTS (1982), EPA-FIFRA (1982), ASTM (1993) et la méthode pH-métrique (ligne directrice de l'OCDE en préparation). La méthode par agitation en flacon est recommandée lorsque la valeur de  $\log K_{oe}$  est comprise entre -2 et 4. Elle ne s'applique qu'aux substances essentiellement pures, solubles dans l'eau et le *n*-octanol. Pour les substances fortement lipophiles, qui se dissolvent lentement dans l'eau, les données obtenues selon une méthode par agitation douce sont généralement plus fiables. Ce type de méthode permet en outre de surmonter jusqu'à un certain point les difficultés expérimentales liées à la formation de micro-gouttelettes durant l'expérience par agitation en flacon, dans la mesure où l'eau, l'octanol et le composé d'essai y sont amenés à l'équilibre dans un réacteur agité doucement. La méthode par agitation douce (Ligne directrice de l'OCDE en préparation) permet une détermination précise et exacte de  $K_{oe}$  pour des composés présentant une valeur de  $\log K_{oe}$  allant jusqu'à 8.2 (Projet de Ligne directrice de l'OCDE, 1998). Comme la méthode par agitation en flacon, la méthode par agitation douce ne s'applique qu'aux substances essentiellement pures, solubles dans l'eau et le *n*-octanol. La méthode par CLHP, qui se pratique sur des colonnes analytiques, est recommandée lorsque la valeur de  $\log K_{oe}$  est comprise entre 0 et 6. Cette méthode est moins sensible à la présence d'impuretés dans le composé d'essai que la méthode par agitation en flacon. Une autre technique de mesure de  $\log K_{oe}$  est la méthode sur colonne (USEPA 1985).

207. Une détermination expérimentale de  $K_{oe}$  n'étant pas toujours possible, par exemple pour les substances très hydrosolubles, les substances très lipophiles et les tensioactifs, il est possible d'utiliser une valeur de  $K_{oe}$  déterminée à partir de QSAR.

### Utilisation des QSAR pour la détermination de $\log K_{oe}$

208. Lorsqu'on trouve une valeur estimée de  $K_{oe}$ , la méthode d'estimation doit être prise en considération. De nombreuses QSAR ont été et continuent d'être élaborées pour estimer  $K_{oe}$ . Quatre programmes sur PC, disponibles dans le commerce [CLOGP, LOGKOW (KOWWIN), AUTOLOGP et SPARC], sont fréquemment utilisés pour évaluer les risques en l'absence de données expérimentales. Les programmes CLOGP, LOGKOW et AUTOLOGP reposent sur l'addition des contributions de groupe, tandis que le programme SPARC s'appuie sur un algorithme de simulation de la structure chimique plus théorique. D'une manière générale, seul le programme SPARC peut être utilisé pour les composés inorganiques ou organométalliques. Des méthodes spéciales sont nécessaires pour estimer  $\log K_{oe}$  dans le cas des composés tensioactifs, des agents chélatants et des mélanges. Le programme CLOGP est préconisé dans le projet conjoint USEPA/CE sur la validation des méthodes d'estimation des QSAR (USEPA/EC 1993). Pedersen *et al.* (1995) ont recommandé les programmes CLOGP et LOGKOW à des fins de classification en raison de leur fiabilité, de leur disponibilité dans le commerce et de leur facilité d'utilisation. Les méthodes d'estimation suivantes sont recommandées pour la classification (tableau 1).

Tableau 1. QSAR recommandées pour l'estimation de  $K_{oe}$ 

MODÈLE	Plage de log $K_{oe}$	Substances concernées
CLOGP	$0 < - < 9^1$	Le programme calcule log $K_{oe}$ pour des composés organiques contenant des atomes de C, H, N, O, halogène, P et/ou S.
LOGKOW (KOWWIN)	$-4 - 8^2$	Le programme calcule log $K_{oe}$ pour des composés organiques contenant des atomes de C, H, N, O, halogène, Si, P, Se, Li, Na, K et/ou Hg. Il peut également fournir des prédictions pour certains tensioactifs (tels que les éthoxylates d'alcool, colorants et substances dissociées)
AUTOLOGP	$> 5$	Le programme calcule log $K_{oe}$ pour des composés organiques contenant des atomes de C, H, N, O, halogène, P ou S. Des améliorations sont en cours pour élargir le domaine d'application du programme AUTOLOGP.
SPARC	Fournit de meilleurs résultats que KOWWIN et CLOGP pour les composés présentant un log $K_{oe} > 5$ .	SPARC est un modèle mécaniste fondé sur des principes thermodynamiques, plutôt qu'un modèle déterministe reposant sur des connaissances tirées des données d'observation. C'est pourquoi il diffère des modèles utilisant les QSAR (KOWWIN, CLOGP, AUTOLOGP), en ce qu'il ne nécessite aucune donnée mesurée concernant log $K_{oe}$ pour un jeu de produits chimiques d'entraînement. D'une manière générale, seul SPARC peut être employé pour les composés inorganiques et organométalliques.

- 1) Une étude de validation, réalisée par Niemelä et comparant des valeurs de log  $K_{oe}$  déterminées expérimentalement et des valeurs estimées, a montré que le programme prédisait avec précision log  $K_{oe}$  pour un grand nombre de produits chimiques organiques, présentant une valeur de log  $K_{oe}$  allant de moins de 0 à plus de 9 ( $n = 501$ ,  $r^2 = 0.967$ ) (TemaNord 1995 : 581).
- 2) D'après un diagramme de dispersion représentant les valeurs estimées et expérimentales de log  $K_{oe}$  (Syracuse Research Corporation, 1999) et portant sur 13 058 composés, on estime que le programme LOGKOW donne des résultats valides pour les composés présentant une valeur de log  $K_{oe}$  comprise entre -4 et 8.

### 5.3 CATÉGORIES DE PRODUITS CHIMIQUES NÉCESSITANT UNE ATTENTION SPÉCIALE QUANT AUX VALEURS DU FBC ET DE $K_{oe}$

209. Certaines propriétés physico-chimiques peuvent rendre difficile la détermination ou la mesure du FBC. Il peut exister des substances qui ne se concentrent pas dans les milieux biologiques de façon cohérente avec leurs autres propriétés physico-chimiques, par exemple, l'encombrement stérique, ou encore des substances qui rendent impropre l'utilisation de certains descripteurs, comme l'activité superficielle, ce qui fait que la mesure et l'utilisation de log  $K_{oe}$  sont inappropriées.

#### 5.3.1 Substances difficiles

210. Certaines substances chimiques sont difficiles à tester dans des systèmes aquatiques et des orientations ont été formulées pour faciliter les essais de ces matériaux (DoE, 1996 ; ECETOC, 1996 ; et USEPA, 1996). L'OCDE achève de finaliser un document d'orientation pour les essais en milieu aquatique de substances difficiles (OCDE, 2000). Ce document constitue une bonne source d'informations, également

utile pour les études de bioconcentration, sur les types de substances difficiles à tester et sur les étapes nécessaires pour garantir la formulation de conclusions valides à partir des essais de ces substances. Les substances difficiles à tester peuvent être des substances peu solubles, volatiles ou sujettes à une dégradation rapide, sous l'effet de processus tels que la phototransformation, l'hydrolyse, l'oxydation ou la dégradation biotique.

211. Pour provoquer la bioconcentration de composés organiques, une substance doit être soluble dans les lipides, présente dans l'eau et disponible pour traverser les branchies des poissons. Les propriétés qui font varier cette disponibilité modifieront par conséquent la bioconcentration réelle d'une substance par rapport au niveau prévu. Par exemple, des substances facilement biodégradables peuvent n'être présentes dans le compartiment aquatique que pendant de brefs laps de temps. De même, la volatilisation et l'hydrolyse réduiront la concentration d'une substance et le temps pendant lequel elle est disponible pour se concentrer dans les milieux biologiques. L'adsorption sur des matières particulaires ou sur des surfaces en général constitue un autre paramètre important, susceptible de réduire la concentration d'exposition réelle d'une substance. Il existe un certain nombre de substances dont on a montré qu'elles se transformaient rapidement dans l'organisme, ce qui entraîne une valeur du FBC plus faible que prévu. Les substances qui forment des micelles ou des agrégats peuvent se concentrer dans les milieux biologiques à un degré plus faible que celui qui serait prédit à partir des simples propriétés physico-chimiques. C'est également le cas des substances hydrophobes contenues dans les micelles formées consécutivement à l'utilisation de dispersants. L'usage de dispersants dans les essais de bioaccumulation est par conséquent déconseillé.

212. En général, pour les substances difficiles à tester, la détermination du potentiel de bioconcentration suppose comme préalable la mesure des valeurs du FBC et de  $K_{oc}$  rapportées à la substance mère. En outre, une valeur donnée du FBC ne peut être validée que si la concentration d'essai a été convenablement déterminée au préalable.

### **5.3.2 Substances peu solubles et substances complexes**

213. Une attention particulière doit être accordée aux substances faiblement solubles. La solubilité de ces substances est souvent déclarée inférieure à la limite de détection, ce qui crée des problèmes d'interprétation du potentiel de bioconcentration. Pour de telles substances, ce potentiel doit être évalué à partir de valeurs de  $\log K_{oc}$  déterminées expérimentalement ou estimées à partir des QSAR.

214. Lorsqu'une substance multicomposants n'est pas totalement soluble dans l'eau, il importe de s'efforcer d'identifier les composants du mélange, dans la mesure où cela est réalisable pratiquement, et d'examiner la possibilité de déterminer son potentiel de bioaccumulation en utilisant les informations disponibles sur ses composants. Si les composants susceptibles de s'accumuler dans les milieux biologiques représentent une proportion importante de la substance complexe (par exemple, plus de 20 % ou même moins pour des composants dangereux), cette substance doit être considérée comme susceptible de bioaccumulation.

### **5.3.3 Substances de masse moléculaire élevée**

215. Au-dessus de certaines dimensions moléculaires, le potentiel de bioconcentration des substances diminue. Ce phénomène est peut-être dû à l'empêchement stérique du passage de la substance à travers les membranes des branchies. Il a été proposé d'appliquer un seuil de 700 pour la masse moléculaire (par exemple, Commission européenne, 1996). Cependant, cette limite a été critiquée et un seuil de 1000 a été proposé à la place, car la première limite excluait des substances susceptibles d'effets aquatiques indirects (CSTEE, 1999). En général, il convient de prendre en considération la bioconcentration dans l'environnement des éventuels métabolites ou produits de dégradation des molécules de grande dimension. Les données relatives à la bioconcentration des molécules de masse moléculaire élevée doivent donc être



évaluées avec soin et n'être utilisées que si elles sont considérées comme pleinement valides, s'agissant du composé parent comme de ses éventuels métabolites et produits de dégradation dans l'environnement.

#### 5.3.4 *Agents tensioactifs*

216. Les tensioactifs sont constitués d'une partie lipophile (le plus souvent une chaîne alkyle) et d'une partie hydrophile (tête polaire). En fonction de la charge de la tête polaire, les tensioactifs sont répartis en différentes catégories : anioniques, cationiques, non ioniques ou amphotères. En raison de la diversité des têtes polaires, les tensioactifs constituent une catégorie structurellement diverse de composés, définis par leur activité superficielle plutôt que par leur structure chimique. Il convient par conséquent de considérer le potentiel de bioaccumulation des tensioactifs en relation avec les différentes sous-catégories (anioniques, cationiques, non ioniques ou amphotères), et non avec le groupe dans son ensemble. Les substances tensioactives peuvent former des émulsions, dans lesquelles la biodisponibilité est difficile à établir. La formation de micelles peut entraîner une modification de la fraction biodisponible, même si les solutions sont apparemment formées, ce qui conduit à des problèmes d'interprétation du potentiel de bioaccumulation.

#### **Facteurs de bioconcentration déterminés expérimentalement**

217. Les valeurs du FBC mesurées sur les tensioactifs montrent que ce facteur peut augmenter avec la longueur de la chaîne alkyle et dépendre du site de fixation de la tête polaire, ainsi que d'autres caractéristiques structurales.

#### **Coefficient de partage octanol-eau ( $K_{oe}$ )**

218. Le coefficient de partage octanol-eau des tensioactifs ne peut être déterminé selon la méthode par agitation en flacon ou par agitation douce, en raison de la formation d'émulsions. De plus, les molécules de tensioactif seront présentes dans la phase aqueuse presque exclusivement sous forme d'ions, alors qu'elles devront s'apparier avec un contre-ion pour se dissoudre dans l'octanol. Par conséquent, la valeur de  $K_{oe}$  déterminée expérimentalement ne caractérise pas le partage des tensioactifs ioniques (Tolls, 1998). En revanche, il a été démontré que la bioconcentration des tensioactifs anioniques et non ioniques augmentait avec la lipophilie (Tolls, 1998). Tolls a montré que pour certains tensioactifs, une valeur de  $\log K_{oe}$  estimée à l'aide du programme LOGKOW pouvait représenter le potentiel de bioaccumulation, tandis que pour d'autres, une certaine "correction" de la valeur de  $\log K_{oe}$  estimée selon la méthode de Roberts (1989) était nécessaire. Ces résultats illustrent le fait que la qualité de la relation entre les estimations de  $\log K_{oe}$  et la bioconcentration dépend de la catégorie et du type particulier de tensioactif concerné. Par conséquent, il convient d'utiliser avec circonspection le classement du potentiel de bioconcentration établi à partir des valeurs de  $\log K_{oe}$ .

### **5.4 DONNÉES CONTRADICTOIRES ET ABSENCE DE DONNÉES**

#### **5.4.1 *Données contradictoires relatives au FBC***

219. Lorsque plusieurs données concernant le FBC sont disponibles pour une même substance, on peut se trouver en présence de résultats contradictoires. En général, les résultats contradictoires au sujet d'une substance soumise à plusieurs reprises à un essai de bioconcentration approprié doivent être interprétés selon une approche de type "poids de la preuve". Cela signifie que si, pour une substance, on a obtenu des valeurs expérimentales du FBC à la fois  $\geq$  et  $<$  500, il faudra utiliser les données présentant la plus grande qualité et les mieux étayées pour déterminer le potentiel de bioconcentration de cette substance. S'il subsiste des écarts entre les valeurs, par exemple si l'on dispose de valeurs de haute qualité

du FBC pour différentes espèces de poisson, il convient généralement d'employer la valeur valide la plus élevée comme base de la classification.

220. Lorsqu'on dispose de jeux de données plus importants (4 valeurs ou plus) pour la même espèce et le même stade de la vie, on peut utiliser la moyenne géométrique des valeurs du FBC comme valeur représentative pour cette espèce.

#### 5.4.2 *Données de log K<sub>oe</sub> contradictoires*

221. Lorsque plusieurs valeurs de log K<sub>oe</sub> sont disponibles pour une même substance, on peut se trouver en présence de résultats contradictoires. Si, pour une substance, on obtient à la fois des valeurs de log K<sub>oe</sub> ≥ et < 4, il faudra utiliser les données présentant la plus grande qualité et les mieux étayées pour déterminer le potentiel de bioconcentration de cette substance. Si des écarts subsistent, on accordera généralement la priorité à la donnée valide la plus élevée. Dans ce cas, le log K<sub>oe</sub> estimé d'après des relations QSAR peut être employé à titre indicatif.

#### 5.4.3 *Jugement d'expert*

222. Si l'on ne dispose d'aucune valeur de FBC ou de log K<sub>oe</sub> déterminée expérimentalement et d'aucune prédiction pour log K<sub>oe</sub>, le potentiel de bioconcentration dans l'environnement aquatique peut être évalué par un jugement d'expert. Ce dernier peut se fonder sur une comparaison entre la structure de la molécule et celle d'autres substances pour lesquelles on dispose de valeurs de la bioconcentration ou de log K<sub>oe</sub> déterminées expérimentalement, ou encore de prédictions pour K<sub>oe</sub>.

### 5.5 *SCHÉMA DÉCISIONNEL*

223. A partir des analyses et conclusions précédentes, les auteurs ont élaboré un schéma décisionnel susceptible de faciliter les décisions quant à l'existence éventuelle d'un potentiel de bioconcentration d'une substance dans les espèces aquatiques.

224. Pour la classification, on préfère en dernier ressort des valeurs du FBC de haute qualité déterminées expérimentalement. Les valeurs du FBC de qualité médiocre ou incertaine ne doivent pas être utilisées à des fins de classification si l'on dispose de données relatives à log K<sub>oe</sub>, car elles peuvent fournir une valeur erronée ou trop faible du FBC, en raison, par exemple, d'une durée d'exposition trop brève, au cours de laquelle les conditions correspondant à l'état stationnaire n'ont pas été atteintes. En l'absence de valeur du FBC pour des espèces de poisson, il est possible d'utiliser des données de haute qualité concernant le FBC d'autres espèces (moules, par exemple).

225. Pour les substances organiques, il est préférable d'utiliser des valeurs de K<sub>oe</sub> de haute qualité obtenues expérimentalement, ou des valeurs déterminées dans des études et désignées comme "valeurs recommandées". En l'absence de données expérimentales de haute qualité, on peut utiliser, dans le processus de classification, des données validées de type QSAR (relations quantitatives structure-activité) pour évaluer log K<sub>oe</sub>. De telles QSAR validées peuvent être utilisées sans modification des critères de classification, si elles concernent uniquement des produits chimiques pour lesquels leur applicabilité est bien définie. Pour les bases et acides forts, les complexes métalliques et les tensioactifs, il convient de fournir une valeur de K<sub>oe</sub> estimée à partir des QSAR ou des solubilités individuelles dans le *n*-octanol et l'eau, au lieu d'une détermination analytique de K<sub>oe</sub>.

226. Si des données sont disponibles mais non validées, il faut recourir à un jugement d'expert.

227. On pourra ainsi décider si une substance possède ou non un potentiel de bioconcentration dans les organismes aquatiques en suivant le schéma suivant :

Valeur du FBC déterminée expérimentalement valide/de haute qualité → OUI :

→  $FBC \geq 500$  : *la substance présente un potentiel de bioconcentration*

→  $FBC < 500$  : *la substance ne présente pas de potentiel de bioconcentration*

Valeur du FBC déterminée expérimentalement valide/de haute qualité → NON :

→ Valeur de  $\log K_{oe}$  déterminée expérimentalement valide/de haute qualité → OUI :

→  $\log K_{oe} \geq 4$  : *la substance présente un potentiel de bioconcentration*

→  $\log K_{oe} < 4$  : *la substance ne présente pas de potentiel de bioconcentration*

Valeur du FBC déterminée expérimentalement valide/de haute qualité → NON :

→ Valeur de  $\log K_{oe}$  déterminée expérimentalement valide/de haute qualité → NON :

→ Utilisation de QSAR validées pour estimer une valeur de  $\log K_{oe}$  → OUI :

→  $\log K_{oe} \geq 4$  : *la substance présente un potentiel de bioconcentration*

→  $\log K_{oe} < 4$  : *la substance ne présente pas de potentiel de bioconcentration*

## ANNEXE 5.I

**PRINCIPES DE BASE DES MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET ESTIMATIVES DE DÉTERMINATION DU FBC ET DE  $K_{oe}$  POUR LES SUBSTANCES ORGANIQUES**

**1. FACTEUR DE BIOCONCENTRATION (FBC)**

228. Le facteur de bioconcentration est défini comme le rapport entre la concentration du produit chimique dans un biote et sa concentration dans le milieu environnant, ici l'eau, à l'état stationnaire. Il peut être mesuré directement par voie expérimentale, dans les conditions correspondant à l'état stationnaire, ou être calculé comme le rapport entre les constantes cinétiques d'absorption et d'élimination du premier ordre, méthode qui ne nécessite pas d'atteindre les conditions d'équilibre.

**1.1 Méthodes appropriées pour la détermination expérimentale du FBC**

229. Différentes lignes directrices pour les essais, visant à déterminer expérimentalement la bioconcentration chez le poisson, ont été étudiées et adoptées, les plus couramment appliquées étant la Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n°305 (OCDE, 1996) et le recueil d'instructions de l'ASTM (ASTM E 1022-94). La ligne directrice 305 de l'OCDE (1996) est un document révisé qui remplace la version antérieure, OCDE 305A-E, (1981). Bien que la préférence aille aux régimes d'essai en dynamique (OCDE 305, 1996), les régimes semi-statiques sont également autorisés (ASTM E 1022-94), sous réserve que les critères de validité relatifs à la mortalité et au maintien des conditions d'essai soient respectés. Pour les substances lipophiles ( $\log K_{oe} > 3$ ), on préfère des méthodes dynamiques.

230. Les lignes directrices de l'OCDE (305) et de l'ASTM reposent sur des principes similaires, mais décrivent des conditions expérimentales différentes, notamment en ce qui concerne :

- le mode d'approvisionnement en eau de l'essai (statique, semi-statique ou dynamique) ;
- la nécessité de réaliser une étude de dépuration ;
- la méthode mathématique utilisée pour calculer le FBC ;
- la fréquence d'échantillonnage : nombre de mesures dans l'eau et nombre d'échantillons de poisson ;
- la nécessité de mesurer la teneur en lipides du poisson ;
- la durée minimale de la phase d'absorption.

231. En général, l'essai comprend deux phases : une phase d'exposition (absorption) et une phase de post-exposition (dépuration). Au cours de la phase d'absorption, des groupes séparés de poissons appartenant à une espèce sont exposés à au moins deux concentrations de la substance d'essai. Une phase d'exposition de 28 jours est obligatoire, à moins qu'un état stationnaire ait été atteint avant la fin de cette période. Le temps nécessaire pour atteindre les conditions d'équilibre peut être défini d'après les relations entre  $K_{oe}$  et  $k_2$  [par exemple,  $\log k_2 = 1.47 - 0.41 \log K_{oe}$  (Spacie et Hamelink, 1982) ou  $\log k_2 = 1.69 - 0.53 \log K_{oe}$  (Gobas *et al.*, 1989)]. Le temps prévu (d) pour atteindre 95% du régime stationnaire peut ainsi être calculé par :  $-\ln(1-0.95)/k_2$ , à condition que la bioconcentration obéisse à une cinétique du premier ordre. A cours de la phase de dépuration, les poissons sont transférés dans un milieu exempt de substance d'essai. On suit la concentration de substance d'essai dans le poisson pendant les deux phases de l'essai. Le FBC est exprimé en fonction du poids frais total de poisson. Pour de nombreuses substances organiques, il existe une relation certaine entre le potentiel de bioconcentration et la lipophilie; et aussi une relation correspondante entre la teneur en lipides du poisson et la bioconcentration observée de ces substances. Par conséquent, pour réduire cette source de variabilité des résultats d'essai pour les substances fortement lipophiles, la bioconcentration doit être rapportée non seulement au poids corporel total mais aussi à la

teneur en lipides [Ligne directrice 305 de l'OCDE (1996), ECETOC (1995)]. Les lignes directrices mentionnées supposent que la bioconcentration peut être représentée de manière approximative par un processus du premier ordre (modèle à un seul compartiment) et donc que le FBC vaut  $k_1/k_2$  ( $k_1$  étant la vitesse d'absorption du premier ordre et  $k_2$  la vitesse de dépuración du premier ordre, décrites par une approximation log-linéaire). Si la dépuración obéit à une cinétique biphasique, c'est-à-dire si l'on peut identifier deux vitesses de dépuración distinctes, l'approximation  $k_1/k_2$  peut sous-estimer sensiblement le FBC. Si on relève une cinétique du deuxième ordre, le FBC peut être estimé à partir de la relation :  $C_{\text{poisson}}/C_{\text{eau}}$ , à condition que "l'état stationnaire" pour le système poisson-eau ait été atteint.

232. Outre des informations détaillées sur la préparation et le stockage des échantillons, il faut disposer, pour quantifier la substance dans la solution d'essai et dans le matériau biologique, d'une méthode analytique appropriée de précision, d'exactitude et de sensibilité connues. Si ces éléments font défaut, il est impossible de déterminer un FBC vrai. L'utilisation de substances d'essai marquées peut faciliter l'analyse des échantillons d'eau et de poisson. Toutefois, à moins d'être associée à une méthode analytique spécifique, la mesure de la radioactivité totale peut refléter la présence de la substance mère, d'un ou plusieurs métabolites éventuels et de carbone éventuellement métabolisé, ayant été incorporé dans des molécules organiques des tissus de poisson. Pour déterminer la valeur vraie du FBC, il est essentiel de différencier clairement la substance mère des métabolites éventuels. Si l'on utilise des matériaux marqués dans l'essai, il est possible de doser le marquage isotopique total (c'est-à-dire, la substance mère et les métabolites) ou de purifier les échantillons de manière à pouvoir analyser séparément le composé parent.

233. Si  $\log K_{\text{oe}}$  est supérieur à 6, les valeurs mesurées du FBC ont tendance à diminuer lorsque  $\log K_{\text{oe}}$  augmente. Les explications théoriques de cette non-linéarité font principalement référence à une biotransformation, à une réduction de la cinétique de perméation membranaire ou à une diminution de la solubilité dans les lipides biotiques pour les grosses molécules. D'autres facteurs peuvent intervenir, notamment des artefacts expérimentaux, tels qu'un équilibre non atteint, une diminution de la biodisponibilité due à la sorption dans des matières organiques présentes dans la phase aqueuse, et des erreurs analytiques. En outre, il convient de prendre des précautions dans l'évaluation des données expérimentales relatives au FBC de substances présentant un  $\log K_{\text{oe}}$  supérieur à 6, car ces données seront entachées d'un degré d'incertitude notablement plus élevé que les valeurs du FBC déterminées pour des substances dont le  $\log K_{\text{oe}}$  est inférieur à 6.

## 2. LOG $K_{\text{oe}}$

234. Le logarithme du coefficient de partage octanol-eau ( $\log K_{\text{oe}}$ ) mesure la lipophilie d'une substance. En tant que tel,  $\log K_{\text{oe}}$  constitue un paramètre clé dans l'évaluation du devenir dans l'environnement. De nombreux processus de répartition sont commandés par  $\log K_{\text{oe}}$ , par exemple la sorption dans le sol et les sédiments et la bioconcentration dans les organismes.

235. La relation entre la bioconcentration et le  $\log K_{\text{oe}}$  repose sur l'analogie du processus de séparation entre la phase lipidique du poisson et l'eau, et du processus de séparation entre le *n*-octanol et l'eau. L'utilisation de  $K_{\text{oe}}$  se justifie par l'aptitude de l'octanol à représenter de manière satisfaisante les lipides des tissus de poisson. Il existe des relations hautement significatives entre  $\log K_{\text{oe}}$  et la solubilité des substances dans l'huile de foie de morue et la trioléine (Niimi, 1991). La trioléine est l'un des triacylglycérols les plus abondants dans les lipides de poisson d'eau douce (Henderson et Tocher, 1987).

236. La détermination du coefficient de partage *n*-octanol-eau ( $K_{\text{oe}}$ ) est indispensable pour constituer le jeu de données de base devant être soumis lors de la notification de nouvelles substances et de substances existantes prioritaires au sein de l'UE. La détermination expérimentale de  $K_{\text{oe}}$  n'étant pas toujours possible, par exemple, pour les substances très hydrosolubles et très lipophiles, il est possible d'utiliser une valeur de  $K_{\text{oe}}$  obtenue à partir de QSAR. Il convient cependant d'être extrêmement prudent

dans l'utilisation des QSAR dans le cas de substances pour lesquelles la détermination expérimentale du coefficient de partage est impossible (tensioactifs, par exemple).

## 2.1 Méthodes appropriées pour la détermination expérimentale de valeurs de $K_{oe}$

237. Pour déterminer expérimentalement des valeurs de  $K_{oe}$ , deux méthodes différentes, par agitation en flacon et par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), sont décrites dans les lignes directrices normalisées, notamment la Ligne directrice 107 de l'OCDE (1995), la Ligne directrice 117 de l'OCDE (1983), et les documents CEE A.8. (1992), EPA-OTS (1982), EPA-FIFRA (1982) et ASTM (1993). Les données obtenues selon la méthode par agitation en flacon ou la méthode par CLHP, conformément aux lignes directrices normalisées, ne sont pas les seules recommandées. Pour les substances hautement lipophiles, qui se dissolvent lentement dans l'eau, les données obtenues selon une méthode par agitation douce sont généralement plus fiables (De Bruijn *et al.*, 1989 ; Tolls et Sijm, 1993 ; Projet de Ligne directrice de l'OCDE, 1998). La méthode par agitation douce fait actuellement l'objet d'un essai circulaire, en vue de la mise au point d'une ligne directrice de l'OCDE définitive.

### *Méthode par agitation en flacon*

238. Le principe de base de cette méthode consiste à mesurer la dissolution de la substance dans deux phases différentes, l'eau et le *n*-octanol. Pour déterminer le coefficient de partage, l'équilibre entre tous les composants en interaction du système doit être atteint, après quoi on détermine la concentration des substances dissoutes dans les deux phases. La méthode par agitation en flacon est applicable lorsque  $\log K_{oe}$  est compris entre -2 et 4 (Ligne directrice 107 de l'OCDE, 1995). Elle ne s'applique qu'aux substances essentiellement pures, solubles dans l'eau et le *n*-octanol, et doit être mise en œuvre à une température constante ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), dans la plage 20-25°C.

### *Méthode par CLHP*

239. La chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) se pratique sur des colonnes analytiques garnies d'une phase solide disponible dans le commerce, présentant de longues chaînes d'hydrocarbures (par exemple,  $C_8$ ,  $C_{18}$ ) chimiquement liées au gel de silice. Les produits chimiques injectés sur une telle colonne migrent à des vitesses différentes en raison de leur degré de partage différent entre la phase aqueuse mobile et la phase hydrocarbonée stationnaire. La méthode par CLHP n'est pas applicable aux bases et aux acides forts, aux complexes métalliques, aux matériaux tensioactifs ou aux substances qui réagissent avec l'éluant. Elle est applicable lorsque la valeur de  $\log K_{oe}$  est comprise entre 0 et 6 (Ligne directrice 117 de l'OCDE, 1989). Cette méthode est moins sensible à la présence d'impuretés dans le composé d'essai que la méthode par agitation en flacon.

### *Méthode par agitation douce*

240. La méthode par agitation douce permet une détermination exacte et précise de  $K_{oe}$  pour des composés dont le  $\log K_{oe}$  va jusqu'à 8.2 (De Bruijn *et al.*, 1989). Dans le cas de composés fortement lipophiles, la méthode par agitation en flacon a tendance à produire des artefacts (formation de micro-gouttelettes) et la méthode par CLHP nécessite une extrapolation au-delà de la plage d'étalonnage pour obtenir une estimation de  $K_{oe}$ .

241. Pour déterminer un coefficient de partage, on met en contact l'eau, le *n*-octanol et le composé d'essai jusqu'à ce que l'équilibre entre eux soit atteint, après quoi on détermine la concentration du composé d'essai dans les deux phases. Dans l'expérience par agitation douce, on peut surmonter jusqu'à un certain point les difficultés expérimentales liées à la formation de micro-gouttelettes durant l'expérience par agitation en flacon, en amenant à l'équilibre l'eau, l'octanol et le composé d'essai dans un réacteur soumis à

une agitation douce. Cette agitation crée un écoulement plus ou moins laminaire entre l'octanol et l'eau, et améliore l'échange entre les phases, sans qu'il se forme de micro-gouttelettes.

### *Méthode sur colonne*

242. La méthode sur colonne constitue une autre méthode très polyvalente pour déterminer  $\log K_{oe}$ . Dans cette méthode, on utilise une colonne pour obtenir le partage de la substance d'essai entre les phases octanol et eau. La colonne est garnie avec un support solide et saturée avec une concentration fixée de la substance d'essai dans du *n*-octanol. La substance d'essai est éluée à partir de la colonne saturée en octanol par de l'eau. La solution aqueuse sortant de la colonne représente la concentration d'équilibre de la substance d'essai qui s'est partagée entre la phase octanol et la phase aqueuse. Le principal avantage de la méthode sur colonne par rapport à la méthode par agitation en flacon est qu'elle évite totalement la formation de micro-émulsions. Elle est donc particulièrement utile pour mesurer le  $K_{oe}$  de substances pour lesquelles  $\log K_{oe}$  est supérieur à 4.5. (Doucette et Andren, 1987 et 1988 ; Shiu *et al.*, 1988), ainsi que dans le cas de substances pour lesquelles  $\log K_{oe}$  est inférieur à 4.5. L'un des ses inconvénients tient à ce qu'elle nécessite un équipement complexe. On trouvera une description détaillée de la méthode sur colonne dans les "*Toxic Substances Control Act Test Guidelines*" (USEPA 1985).

## **2.2 Utilisation des QSAR pour la détermination de $\log K_{oe}$ (voir aussi le chapitre 6 : Utilisation des QSAR)**

243. De nombreuses QSAR ont été et continuent d'être élaborées pour estimer  $K_{oe}$ . Les méthodes couramment utilisées reposent sur les constantes fragmentaires. Les approches de type fragmentaire sont fondées sur la simple addition des lipophilies des différents fragments moléculaires d'une molécule donnée. Trois programmes sur PC disponibles dans le commerce sont recommandés par le document d'orientation technique de la Commission européenne pour l'évaluation des risques, partie III (Commission européenne, 1996) en l'absence de données déterminées expérimentalement.

244. Le programme CLOGP (Daylight Chemical Information Systems, 1995) a été initialement mis au point pour être appliqué à la conception de médicaments. Ce modèle repose sur la procédure de calcul de Hansch et Leo (Hansch et Leo, 1979). Le programme calcule  $\log K_{oe}$  pour des substances organiques contenant des atomes de C, H, N, O, halogène, P et/ou S. Il est impossible de calculer  $\log K_{oe}$  pour les sels et les substances comportant des charges formelles (excepté pour les composés nitro et les oxydes d'azote). Les résultats du calcul de  $\log K_{oe}$  pour des substances ionisables telles que les phénols, les amines et les acides carboxyliques sont représentatifs de la forme neutre ou non ionisée et dépendent du pH. En général, le programme fournit des estimations claires pour la gamme de  $\log K_{oe}$  comprise entre 0 et 5 (Commission européenne, 1996, partie III). Cependant, une étude de validation réalisée par Niemelä (1993), qui a comparé les valeurs de  $\log K_{oe}$  déterminées expérimentalement et des valeurs estimées, a montré que le programme prédisait avec précision le  $\log K_{oe}$  pour un grand nombre de produits chimiques organiques présentant une valeur de  $\log K_{oe}$  allant de moins de 0 à plus de 9 ( $n = 501$ ,  $r^2 = 0.967$ ). Dans une étude de validation similaire portant sur plus de 7 000 substances, les résultats obtenus avec le programme CLOGP (version PC 3.32, version EPA 1.2) étaient  $r^2 = 0.89$ , écart-type = 0.58,  $n = 7221$ . Ces validations montrent que le programme CLOGP peut être employé pour estimer des valeurs fiables de  $\log K_{oe}$  en l'absence de données expérimentales. Pour les agents chélatants et les tensioactifs, on considère que ce programme est d'une fiabilité limitée (OCDE, 1993). Toutefois, au sujet des tensioactifs anioniques (LAS), une méthode corrective a été proposée pour estimer des valeurs CLOGP ajustées (Roberts, 1989).

245. Le programme LOGKOW ou KOWWIN (Syracuse Research Corporation) utilise des fragments structuraux et des termes correctifs. Il calcule  $\log K_{oe}$  pour des composés organiques contenant des atomes de C, H, N, O, halogène, Si, P, Se, Li, Na, K et/ou Hg. Il permet également de calculer  $\log K_{oe}$  pour des composés comportant des charges formelles (tels que les oxydes d'azote et les composés nitro). Le calcul

de log  $K_{oe}$  pour les substances ionisables, tels que phénols, amines et acides carboxyliques, est représentatif de la forme neutre ou non ionisée et sa valeur dépendra donc du pH. Le programme LOGKOW (Pedersen *et al.*, 1995) peut fournir des prédictions pour certains tensioactifs [par exemple, éthoxylates d'alcool (Tolls, 1998), colorants et substances dissociées]. En général, il donne des estimations claires dans la plage de log  $K_{oe}$  comprise entre 0 et 9 (TemaNord 1995:581). Comme le programme CLOGP, LOGKOW a fait l'objet d'une validation (tableau 2) et il est recommandé pour la classification, en raison de sa fiabilité, de sa disponibilité dans le commerce et de sa facilité d'utilisation.

246. Le programme AUTOLOGP (Devilleers *et al.*, 1995) a été établi à partir d'un ensemble de données hétérogènes, couvrant 800 produits chimiques organiques et collectées dans la littérature. Il calcule des valeurs de log  $K_{oe}$  pour des substances organiques contenant des atomes de C, H, N, O, halogène, P et S. Il ne peut effectuer ce calcul pour les sels. Le calcul de log  $K_{oe}$  est également impossible pour certains composés comportant des charges formelles, à l'exception des composés nitro. Le programme est capable de calculer des valeurs de log  $K_{oe}$  pour des substances ionisables telles que phénols, amines et acides carboxyliques, bien qu'une dépendance de ces valeurs à l'égard du pH soit à noter. Des améliorations du programme AUTOLOGP sont en cours en vue d'étendre ses possibilités d'application. D'après les informations actuellement disponibles, ce programme fournit des valeurs précises, en particulier pour les substances très lipophiles (log  $K_{oe}$  > 5) (Commission européenne, 1996).

247. Le modèle SPARC est encore en cours de développement au Laboratoire de recherche environnementale de l'EPA à Athens, Géorgie, et n'est pas encore disponible pour le public. Il s'agit d'un modèle mécaniste, fondé sur des principes thermodynamiques, et non d'un modèle déterministe reposant sur des connaissances tirées des données d'observation. C'est pourquoi il diffère des modèles utilisant les QSAR (KOWWIN et LOGP) en ce qu'il ne nécessite pas de valeurs mesurées de log  $K_{oe}$  pour un jeu de produits chimiques d'entraînement. L'EPA fait parfois tourner ce modèle à la demande, pour une liste de numéros CAS. Les résultats fournis par le programme SPARC sont meilleurs que ceux des programmes KOWWIN et CLOGP uniquement pour les composés présentant une valeur de log  $K_{oe}$  supérieure à 5. D'une manière générale, seul SPARC peut être utilisé pour les composés inorganiques et organométalliques.

248. Le tableau 2 donne un aperçu des méthodes d'estimation de log  $K_{oe}$  dont la méthodologie repose sur la fragmentation des molécules. Il existe d'autres méthodes pour estimer log  $K_{oe}$ , mais leur utilisation ne doit être décidée qu'au cas par cas et sur la base d'arguments scientifiques appropriés seulement.

**Tableau 2** Aperçu des méthodes QSAR pour l'estimation de log  $K_{oe}$  dont la méthodologie repose sur la fragmentation des molécules [Howard et Meylan (1997)]

Méthode	Méthodologie	Données statistiques
CLOGP Hansch et Leo (1979), CLOGP Daylight (1995)	Fragments + termes correctifs	Total n = 8942, r2 = 0.917, écart-type = 0.482 Validation : n = 501, r2 = 0.967 Validation : n = 7221, r2 = 0.89, é.-t. = 0.58
LOGKOW (KOWWIN) Meylan et Howard (1995), SRC	140 fragments 260 termes correctifs	Calibrage : n = 2430, r2 = 0.981, é.-t. = 0.219, me = 0.161 Validation : n = 8855, r2 = 0.95, é.-t. = 0.427, me = 0.327
AUTOLOGP Devilleers <i>et al.</i> (1995)	66 contributions atomiques et de groupe d'après Rekker et Manhold (1992)	Calibrage : n=800, r2=0.96, é.-t. = 0.387
SPARC En cours de mise au point	Repose sur un algorithme théorique faisant	Aucune mesure de log $K_{oe}$ n'est nécessaire pour un jeu de produits chimiques d'entraînement



par l'EPA, Athens, Géorgie.	intervenir la structure chimique	
Rekker et De Kort (1979)	Fragments + termes correctifs	Calibrage : n = 1054, r2 = 0.99 Validation : n=20, r2 = 0.917, é.-t. = 0.53, me = 0.40
Niemi <i>et al.</i> (1992)	MCI	Calibrage : n=2039, r2=0.77 Validation : n=2039, r2=0.49
Klopman <i>et al</i> (1994)	98 fragments + termes correctifs	Calibrage : n = 1663, r2 = 0.928, é.-t. = 0.3817
Suzuki et Kudo (1990)	424 fragments	Total : n = 1686, me = 0.35 Validation : n = 221, me = 0.49
Ghose <i>et al.</i> (1988) ATOMLOGP	110 fragments	Calibrage : n = 830, r2 = 0.93, é.-t. = 0.47 Validation : n = 125, r2 = 0.87, é.-t. = 0.52
Bodor et Huang (1992)	Orbitale moléculaire	Calibrage : n=302, r2 = 0.96, é.-t. = 0.31, me = 0.24 Validation : n = 128, é.-t. = 0.38
Broto <i>et al.</i> (1984) ProLogP	110 fragments	Calibrage: n = 1868, me = environ 0.4

## ANNEXE 5.II

### INFLUENCE DES FACTEURS EXTERNES ET INTERNES SUR LE POTENTIEL DE BIOCONCENTRATION DES SUBSTANCES ORGANIQUES

#### 1. FACTEURS INFLUANT SUR L'ABSORPTION

249. Pour les composés lipophiles, la vitesse d'absorption est principalement fonction de la dimension de l'organisme (Sijm et Linde, 1995). Des éléments externes, tels que la taille de la molécule, les facteurs influant sur la biodisponibilité et divers facteurs environnementaux sont également d'une grande importance à l'égard de la vitesse d'absorption.

##### 1.1 Dimension de l'organisme

250. Les poissons de plus grande dimension présentant un rapport surface branchiale/poids relativement plus faible, on s'attend à observer une constante de vitesse d'absorption ( $k_1$ ) plus basse chez les gros poissons que chez les petits (Sijm et Linde, 1995 ; Opperhuizen et Sijm, 1990). L'absorption des substances chez le poisson est en outre régie par le flux d'eau qui traverse les branchies, la diffusion à travers les couches de diffusion aqueuses, au niveau de l'épithélium branchial, la perméation à travers l'épithélium branchial, le débit du flux sanguin à travers les branchies et la capacité de liaison des constituants sanguins (ECETOC, 1995).

##### 1.2 Taille moléculaire

251. Les substances ionisées ne pénètrent pas facilement dans les membranes, le pH en milieu aqueux pouvant influencer sur l'absorption de la substance. Il faut s'attendre à une perte de perméabilité membranaire pour les substances présentant une section transversale importante (Opperhuizen *et al.*, 1985 ; Anliker *et al.*, 1988) ou une grande longueur de chaîne (> 4.3 nm) (Opperhuizen, 1986). La perte de perméabilité membranaire due à la taille des molécules entraînera donc une perte totale d'absorption. L'effet de la masse moléculaire sur la bioconcentration résulte d'une influence sur le coefficient de diffusion de la substance, qui réduit les constantes de vitesse d'absorption (Gobas *et al.*, 1986).

##### 1.3 Disponibilité

252. Avant de pouvoir se concentrer dans un organisme, une substance doit être présente dans l'eau et disponible pour traverser les branchies. Des facteurs qui influent sur la disponibilité dans les conditions naturelles comme dans les conditions d'essai modifieront la bioconcentration réelle par rapport à la valeur estimée du FBC. Les poissons étant nourris pendant les études de bioconcentration, les concentrations de matières organiques dissoutes et particulaires devraient normalement être relativement élevées, d'où une réduction de la fraction de produit chimique effectivement disponible pour l'absorption directe via les branchies. McCarthy et Jimenez (1985) ont montré que l'adsorption de substances lipophiles sur des matières humiques dissoutes réduit la disponibilité de la substance, et ce d'autant plus que la substance est lipophile (Schrapp et Opperhuizen, 1990). En outre, l'adsorption sur des matières organiques dissoutes ou particulaires, ou sur des surfaces en général, peut interférer avec la mesure du FBC (et d'autres propriétés physico-chimiques) et rendre ainsi difficile la détermination du FBC et d'autres descripteurs appropriés. La bioconcentration chez le poisson étant directement corrélée avec la fraction disponible du produit chimique dans l'eau, il est nécessaire, pour les substances fortement lipophiles, de maintenir la concentration disponible du produit chimique d'essai dans des limites relativement étroites pendant la période d'absorption.

253. Les substances facilement biodégradables peuvent n'être présentes dans l'eau d'essai que pendant un bref laps de temps et la bioconcentration de ces substances peut ainsi être négligeable. De même, la volatilisation et l'hydrolyse réduiront la concentration de la substance et le temps pendant lequel elle sera disponible pour se concentrer dans les milieux biologiques.

#### 1.4 Facteurs environnementaux

254. Des paramètres environnementaux influant sur la physiologie de l'organisme peuvent aussi affecter l'absorption des substances. Par exemple, si la teneur en oxygène de l'eau baisse, le poisson doit faire passer davantage d'eau sur ses branchies pour satisfaire ses besoins respiratoires (McKim et Goeden, 1982). Cependant, le phénomène peut dépendre de l'espèce de poisson, comme l'indiquent Opperhuizen et Schrap (1987). Il a en outre été démontré que la température pouvait avoir une influence sur la constante de vitesse d'absorption dans le cas des substances lipophiles (Sijm *et al.* 1993), tandis que d'autres auteurs n'ont observé aucun effet cohérent des variations de température (Black *et al.* 1991).

## 2 FACTEURS INFLUANT SUR LA VITESSE D'ÉLIMINATION

255. La vitesse d'élimination est principalement fonction de la dimension de l'organisme, de sa teneur en lipides, du processus de biotransformation qui s'opère dans l'organisme et de la lipophilie du composé d'essai.

### 2.1 Dimension de l'organisme

256. Comme la vitesse d'absorption, la vitesse d'élimination dépend de la dimension de l'organisme. En raison du rapport surface branchiale/poids plus élevé dans les organismes de petite taille (par exemple, les larves de poisson) que dans les organismes de grande taille, on a montré que l'état stationnaire et donc "l'équilibre correspondant à la dose toxique" étaient atteints plus tôt aux premiers stades de la vie des poissons qu'au stade juvénile ou adulte (Petersen et Kristensen, 1998). Le temps requis pour atteindre les conditions d'équilibre étant fonction de  $k_2$ , la taille des poissons utilisés dans les études de bioconcentration a donc une influence importante sur le temps nécessaire pour obtenir ces conditions.

### 2.2 Teneur en lipides

257. En raison des relations régissant le partage, les organismes comportant une teneur élevée en matières grasses tendent à accumuler des concentrations plus fortes de substances lipophiles que les organismes maigres aux conditions d'équilibre. Les charges corporelles sont donc souvent plus élevées chez des poissons "gras" comme l'anguille que chez des poissons "maigres" comme le cabillaud. De plus, les "réservoirs" de lipides peuvent jouer un rôle de stockage pour les substances hautement lipophiles. Le jeûne ou d'autres modifications physiologiques peuvent faire varier le bilan lipidique et provoquer la libération de ces substances, entraînant des impacts différés.

### 2.3 Métabolisme

258. En général, le métabolisme ou la biotransformation conduisent à la conversion du composé parent en métabolites plus hydrosolubles. En conséquence, les métabolites plus hydrophiles peuvent être plus facilement excrétés du corps que le composé parent. Lorsque la structure chimique d'un composé est modifiée, de nombreuses propriétés de ce composé sont également altérées. Par conséquent, les métabolites se comporteront différemment au sein de l'organisme pour ce qui concerne la répartition dans les tissus, la bioaccumulation, la persistance, ainsi que la voie et la vitesse d'excrétion. La biotransformation peut aussi modifier la toxicité d'un composé. Cette modification de la toxicité peut être soit bénéfique soit nuisible pour l'organisme. La biotransformation peut empêcher la concentration dans l'organisme d'atteindre une valeur suffisamment élevée causer une réponse toxique (détoxication). Il peut

toutefois se former un métabolite plus toxique que le composé parent (bioactivation), comme c'est le cas pour le benzo(a)pyrène, par exemple.

259. Les organismes terrestres ont un système de biotransformation développé, qui est généralement meilleur que celui des organismes vivant dans l'environnement aquatique. Cette différence tient peut-être au fait que la biotransformation des xénobiotiques peut présenter un intérêt mineur pour les organismes à branchies, qui sont capables d'excréter relativement facilement le composé dans l'eau (Van Den Berg *et al.* 1995). Dans les organismes aquatiques, la capacité de biotransformation des xénobiotiques augmente généralement selon l'ordre suivant : mollusques < crustacés < poissons (Wofford *et al.*, 1981).

### **3. CARACTÈRE LIPOPHILE DE LA SUBSTANCE**

260. Une corrélation linéaire négative entre  $k_2$  (constante de dépuración) et le log  $K_{oe}$  (ou le FBC) a été mise en évidence chez le poisson par plusieurs auteurs (par exemple, Spacie et Hamelink, 1982 ; Gobas *et al.*, 1989 ; Petersen et Kristensen, 1998), tandis que  $k_1$  (constante de vitesse d'absorption) est plus ou moins indépendante du caractère lipophile de la substance (Connell, 1990). Le FBC résultant augmentera donc en général avec la lipophilie des substances, c'est-à-dire que log FBC et log  $K_{oe}$  seront corrélés pour les substances qui ne subissent pas un métabolisme poussé.

## ANNEXE 5.III

## LIGNES DIRECTRICES POUR LES ESSAIS

261. La plupart des lignes directrices mentionnées sont regroupées dans des compilations constituées par l'organisation qui les publie. Les principales références sont les suivantes :

- Lignes directrices de la CE : Commission européenne (1996). Classification, emballage et étiquetage des substances dangereuses dans l'Union européenne. Partie 2 – Méthodes d'essai. Commission européenne. 1997. ISBN 92-828-0077-6. (Page d'accueil : <http://ecb.ei.jrc.it/testing-methods/> - en anglais);
- Lignes directrices de l'ISO : disponibles auprès des organismes de normalisation nationaux ou de l'ISO (page d'accueil : <http://www.iso.ch/>);
- Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris. 1993, avec mises à jour régulières (page d'accueil : <http://www.oecd.org/ehs/>);
- Lignes directrices de l'OPPTS : page d'accueil de l'US-EPA : <http://www.epa.gov/opptsfrs/home/guidelin.htm>;
- ASTM : page d'accueil de l'ASTM : <http://www.astm.org>. Poursuivre la recherche via le terme "standards".

ASTM, 1993. ASTM Standards on Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. Sponsored by ASTM Committee E-47 on Biological Effects and Environmental Fate. American Society for Testing and Materials. 1916 Race Street, Philadelphia, PA 19103. ASTM PCN: 03-547093-16., ISBN 0-8032-1778-7.

ASTM E 1022-94. 1997. Standard Guide for Conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs. American Society for Testing and Materials.

CE, 1992. CE A.8. Coefficient de partage. Annexe V (Directive 67/548/CEE). Méthodes permettant de déterminer les propriétés physico-chimiques, la toxicité et l'écotoxicité (des substances et préparations)

CE, 1998. CE C.13. Bioconcentration : essai avec renouvellement continu sur les poissons.

EPA-OTS, 1982. Guidelines and support documents for environmental effects testing. Chemical fate test guidelines and support documents. United States Environmental Protection Agency. Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, D.C. 20960. EPA 560/6-82-002. (août 1982 et mises à jour), voir également Code of Federal Regulations. Protection of the Environment, partie 790 à la fin. Révisé le 1<sup>er</sup> juillet 1993. Informations en ligne sur les dernières mises à jour des lignes directrices pour les essais : US National Technical Information System.

EPA-FIFRA, 1982. The Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act. Pesticide Assessment Guidelines, subdivision N: chemistry: Environmental fate, and subdivision E, J & L: Hazard Evaluation. Office of Pesticide Programs. US Environmental Protection Agency, Washington D.C. (1982 et mises à jour). Informations en ligne sur les dernières mises à jour des lignes directrices pour les essais : US National Technical Information System.

Ligne directrice 107 de l'OCDE, 1995. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Coefficient de partage (*n*-octanol/eau) : Méthode par agitation en flacon.

Ligne directrice 117 de l'OCDE, 1989. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Coefficient de partage (*n*-octanol/eau), méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP).

Ligne directrice 305 de l'OCDE, 1996. Bioconcentration : Essai dynamique chez le poisson. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

Ligne directrice 305 A-E de l'OCDE, 1981. Bioaccumulation. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

Projet de ligne directrice de l'OCDE, 1998. Partition Coefficient n-Octanol/Water  $P_{ow}$ . Slow-stirring method for highly hydrophobic chemicals. Avant-projet de Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

## ANNEXE 5.IV

## REFERENCES

Anliker, R., Moser, P., Poppinger, D. 1988. Bioaccumulation of dyestuffs and organic pigments in fish. Relationships to hydrophobicity and steric factors. *Chem.* 17(8):1631-1644.

Bintein, S.; Devillers, J. et Karcher, W. 1993. Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research. Vol. 1. pp.29-39.

Black, M.C., Millsap, D.S., McCarthy, J.F. 1991. Effects of acute temperature change on respiration and toxicant uptake by rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Physiol. Zool.* 64:145-168.

Bodor, N., Huang, M.J. 1992. *J. Pharm. Sci.* 81:272-281.

Broto, P., Moreau, G., Vandycke, C. 1984. *Eur. J. Med. Chem.* 19:71-78.

Chiou, T. 1985. Partition coefficients of organic compounds in lipid-water systems and correlations with fish bioconcentration factors. *Environ. Sci. Technol* 19:57-62.

CLOGP. 1995. Daylight Chemical Information Systems, Inf. Sys. Inc. Irvine, Ca.

Commission européenne, 1996. Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/96/EEC on Risk Assessment for new notified substances and Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances. Bruxelles

Comotto, R.M., Kimerle, R.A., Swisher, R.D. 1979. Bioconcentration and metabolism of linear alkylbenzenesulfonate by Daphnids and Fathead minnows. L.L. Marking, R.A. Kimerle, Eds., *Aquatic Toxicology* (ASTM, 1979), vol. ASTM STP 667.

Connell, D.W., Hawker, D.W. 1988. Use of polynomial expressions to describe the bioconcentration of hydrophobic chemicals by fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 16:242-257.

Connell, D.W. 1990. Bioaccumulation of xenobiotic compounds, Florida: CRC Press, Inc. pp.1-213.

CSTEE (1999): DG XXIV Scientific Committee for Toxicity and Ecotoxicity and the Environment. Opinion on revised proposal for a list of Priority substances in the context of the water framework directive (COMMs Procedure) préparée par le Fraunhofer-Institute, Allemagne. Rapport final. Opinion adoptée lors de la 11<sup>e</sup> réunion plénière du CSTEE, le 28 septembre 1999.

De Bruijn, J., Busser, F., Seinen, W. & Hermens, J. 1989. Determination of octanol/water partition coefficients with the "slow stirring" method. *Environ. Toxicol. Chem.* 8:499-512.

Devillers, J., Bintein, S., Domine, D. 1996. Comparison of BCF models based on log P. *Chemosphere* 33(6):1047-1065.

DoE, 1996. Guidance on the aquatic toxicity testing of difficult substance. United Kingdom Department of the Environment, Londres.

Doucette, W.J., Andren, A.W. 1987. Correlation of octanol/water partition coefficients and total molecular surface area for highly hydrophobic aromatic compounds. *Environ. Sci. Technol.*, 21, pages 821-824.

Doucette, W.J., Andren, A.W. 1988. Estimation of octanol/water partition coefficients: evaluation of six methods for highly hydrophobic aromatic compounds. *Chemosphere*, 17, pages 345-359.

Driscoll, S.K., McElroy, A.E. 1996. Bioaccumulation and metabolism of benzo(a)pyrene in three species of polychaete worms. *Environ. Toxicol. Chem.* 15(8):1401-1410.7

ECETOC, 1995. The role of bioaccumulation in environmental risk assessment: The aquatic environment and related food webs, Bruxelles, Belgique.

ECETOC, 1996. Aquatic toxicity testing of sparingly soluble, volatile and unstable substances. ECETOC Monograph No. 26, ECETOC, Bruxelles.

Ghose, A.K., Protchet, A., Crippen, G.M. 1988. *J. Computational Chem.* 9:80-90.

Gobas, F.A.P.C., Opperhuizen, A., Hutzinger, O. 1986. Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish: Relationship with membrane permeation. *Environ. Toxicol. Chem.* 5:637-646.

Gobas, F.A.P.C., Clark, K.E., Shiu, W.Y., Mackay, D. 1989. Bioconcentration of polybrominated benzenes and biphenyls and related superhydrophobic chemicals in fish: Role of bioavailability and elimination into feces. *Environ. Toxicol. Chem.* 8:231-245.

Goodrich, M.S., Melancon, M.J., Davis, R.A., Lech J.J. 1991. The toxicity, bioaccumulation, metabolism, and elimination of dioctyl sodium sulfosuccinate DSS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Water Res.* 25: 119-124.

Hansch, C., Leo, A. 1979. Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. Wiley, New York, NY, 1979.

Henderson, R.J., Tocher, D.R. 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid. Res.* 26:281-347.

Howard, P.H. and Meyland, W.M., 1997. Prediction of physical properties transport and degradation for environmental fate and exposure assessments, QSAR in environmental science VII. Eds. Chen, F. and Schüürmann, G. pp. 185-205.

Kimerle, R.A., Swisher, R.D., Schroeder-Comotto, R.M. 1975. Surfactant structure and aquatic toxicity, Symposium on Structure-Activity correlations in Studies on Toxicity and Bioconcentration with Aquatic Organisms, Burlington, Ontario, Canada, pp. 22-35.

Klopman, G., Li, J.Y., Wang, S., Dimayuga, M. 1994. Computer automated log P calculations based on an extended group contribution approach. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 34:752-781.

Knezovich, J.P., Lawton, M.P., Inoue, L.S. 1989. Bioaccumulation and tissue distribution of a quaternary ammonium surfactant in three aquatic species. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42:87-93.

Knezovich, J.P., Inoue, L.S. 1993. The influence of sediment and colloidal material on the bioavailability of a quaternary ammonium surfactant. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 26:253-264.

Kristensen, P. 1991. Bioconcentration in fish: Comparison of BCFs derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.



- Mackay, D. 1982. Correlation of bioconcentration factors. *Environ. Sci. Technol.* 16:274-278.
- McCarthy, J.F., Jimenez, B.D. 1985. Reduction in bioavailability to bluegills of polycyclic aromatic hydrocarbons bound to dissolved humic material. *Environ. Toxicol. Chem.* 4:511-521.
- McKim, J.M., Goeden, H.M. 1982. A direct measure of the uptake efficiency of a xenobiotic chemical across the gill of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) under normoxic and hypoxic conditions. *Comp. Biochem. Physiol.* 72C:65-74.
- Meylan, W.M. and Howard, P.H., 1995. Atom/Fragment Contribution Methods for Estimating Octanol-Water Partition Coefficients. *J. Pharm.Sci.* 84, 83.
- Niemelä, J.R. 1993. QTOXIN-program (ver 2.0). Danish Environmental Protection Agency.
- Niemi, G.J., Basak, S.C., Veith, G.D., Grunwald, G. *Environ. Toxicol. Chem.* 11:893-900.
- Niimi, A.J. 1991. Solubility of organic chemicals in octanol, triolin and cod liver oil and relationships between solubility and partition coefficients. *Wat. Res.* 25:1515-1521.
- OCDE, 1993. Application of structure activity relationships to the estimation of properties important in exposure assessment. OECD Environment Directorate. Environment Monograph No. 67.
- OCDE, 1998. Harmonized integrated hazard classification system for human health and environmental effects of chemical substances. Tel qu'approuvé par la 28<sup>e</sup> réunion conjointe du Comité des produits chimiques et du Groupe de travail sur les produits chimiques en novembre 1998.
- OCDE, 2000. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OCDE, Paris.
- Opperhuizen, A., Van der Velde, E.W., Gobas, F.A.P.C., Liem, A.K.D., Van der Steen, J.M.D., Hutzinger, O. 1985. Relationship between bioconcentration in fish and steric factors of hydrophobic chemicals. *Chemosphere* 14:1871-1896.
- Opperhuizen, A. 1986. Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish. In: Poston T.M., Purdy, R. (eds), *Aquatic Toxicology and Environmental Fate : Ninth Volume*, ASTM STP 921. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, 304-315.
- Opperhuizen, A., Schrap, S.M. 1987. Relationship between aqueous oxygen concentration and uptake and elimination rates during bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chemosphere* 6:335-342.
- Opperhuizen, A., Sijm, D.T.H.M. 1990. Bioaccumulation and biotransformation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 9:175-186.
- Pedersen, F., Tyle, H., Niemelä, J.R., Guttmann, B., Lander, L. et Wedebrand, A., 1995. Environmental Hazard Classification – data collection and interpretation guide (2<sup>nd</sup> edition). *TemaNord* 1995:581.
- Petersen, G.I., Kristensen, P. 1998. Bioaccumulation of lipophilic substances in fish early life stages. *Environ. Toxicol. Chem.* 17(7):1385-1395.
- Rekker, R.F., de Kort, H.M. 1979. The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther.* 14:479-488.

Roberts, D.W. 1989. Aquatic toxicity of linear alkyl benzene sulphonates (LAS) – a QSAR analysis. Comunicaciones Presentadas a las Jornadas del Comité Español de la Detergencia, 20 (1989) 35-43. Egalement dans J.E. Turner, M.W. England, T.W. Schultz et N.J. Kwaak (eds.) QSAR 88. Proc. Third International Workshop on Qualitative Structure-Activity Relationships in Environmental Toxicology, 22-26 May 1988, Knoxville, Tennessee, pp. 91-98. Disponible auprès du National Technical Information Service, US Dept. of Commerce, Springfield, VA.

Schrap, S.M., Opperhuizen, A. 1990. Relationship between bioavailability and hydrophobicity: reduction of the uptake of organic chemicals by fish due to the sorption of particles. Environ. Toxicol. Chem. 9:715-724.

Shiu, WY, Doucette, W., Gobas, FAPC., Andren, A., Mackay, D. 1988. Physical-chemical properties of chlorinated dibenzo-p-dioxins. Environ. Sci. Technol. 22: pages 651-658.

Sijm, D.T.H.M., van der Linde, A. 1995. Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29:2769-2777.

Sijm, D.T.H.M., Pärt, P., Opperhuizen, A. 1993. The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gill of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25:1-14.

Spacie, A., Hamelink, J.L. 1982. Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1:309-320.

Suzuki, T., Kudo, Y.J. 1990. J. Computer-Aided Molecular Design 4:155-198.

Syracuse Research Corporation, 1999. [http://esc\\_plaza.syrres.com/interkow/logkow.htm](http://esc_plaza.syrres.com/interkow/logkow.htm)

Tas, J.W., Seinen, W., Opperhuizen, A. 1991. Lethal body burden of triphenyltin chloride in fish: Preliminary results. Comp. Biochem. Physiol. 100C(1/2):59-60.

Tolls J. & Sijm, D.T.H.M., 1993. Bioconcentration of surfactants, RITOX, Pays-Bas (9 nov. 1993). Procter and Gamble Report (ed.: M.Stalmans).

Tolls, J. 1998. Bioconcentration of surfactants. Ph.D. Thesis. Université d'Utrecht, Utrecht, Pays-Bas.

Toshima, S., Moriya, T. Yoshimura, K. 1992. Effects of polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate on the acute toxicity of linear alkylbenzenesulfonate (C<sub>12</sub>-LAS) to fish. Ecotoxicol. Environ. Safety 24: 26-36.

USEPA 1985. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Toxic Substances. Toxic Substances Control Act Test Guidelines. 50 FR 39252.

USEPA/EC, 1993. US EPA/EC Joint Project on the Evaluation of (Quantitative) Structure Activity Relationships.

USEPA, 1996. Ecological effects test guidelines – OPPTS 850.1000. Special considerations for conducting aquatic laboratory studies. Public Draft, EPA712-C-96-113. United States Environmental Protection Agency. [http://www.epa.gov/docs/OPTS\\_harmonized/](http://www.epa.gov/docs/OPTS_harmonized/)

Van Den Berg, M., Van De Meet, D., Peijnenburg, W.J.G.M., Sijm, D.T.H.M., Struijs, J., Tas, J.W. 1995. Transport, accumulation and transformation processes. In: Risk Assessment of Chemicals: An

Introduction. van Leeuwen, C.J., Hermens, J.L.M. (eds). Dordrecht, NL. Kluwer Academic Publishers, 37-102.

Wakabayashi, M., Kikuchi, M., Sato, A. Yoshida, T. 1987. Bioconcentration of alcohol ethoxylates in carp (*Cyprinus carpio*), *Ecotoxicol. Environ. Safety* 13, 148-163.

Wofford, H.W., C.D. Wilsey, G.S. Neff, C.S. Giam & J.M. Neff (1981): Bioaccumulation and metabolism of phthalate esters by oysters, brown shrimp and sheepshead minnows. *Ecotox. Environ. Safety* 5:202-210, 1981.

## 6. UTILISATION DES QSAR

### 6.1 HISTORIQUE

262. L'utilisation des relations quantitatives structure-activité (QSAR) en toxicologie aquatique remonte aux travaux réalisés à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle par Overton à Zurich (Lipnick, 1986) et Meyer à Marburg (Lipnick, 1989a). Ces chercheurs ont démontré que la capacité des substances de produire une narcose chez les têtards et les petits poissons était directement proportionnelle à leur coefficient de partage mesuré entre l'huile d'olive et l'eau. Overton a postulé dans sa monographie de 1901, "Studien über die Narkose", que cette corrélation reflétait la toxicité intervenant pour une concentration ou un volume molaires standard, au niveau d'un site moléculaire au sein de l'organisme (Lipnick, 1991a). Il a en outre conclu que cette toxicité correspondait à la même concentration ou au même volume pour divers organismes, que l'absorption s'effectue via l'eau ou par inhalation gazeuse. Cette corrélation est connue en anesthésie sous le nom de théorie de Meyer-Overton.

263. Corwin Hansch et ses collaborateurs du Pomona College ont proposé d'utiliser le système *n*-octanol/eau comme système de partage de référence, et découvert que les coefficients de partage étaient des propriétés additives et constitutives, pouvant être estimées directement à partir de la structure chimique. Ils ont également constaté que l'on pouvait utiliser une analyse par régression pour établir les modèles QSAR, à condition de procéder à une analyse statistique des résultats. En appliquant cette démarche, ces auteurs ont annoncé en 1972 la mise au point de 137 modèles QSAR, sous la forme  $\log(1/C) = A \log K_{oe} + B$ , où  $K_{oe}$  représente le coefficient de partage *n*-octanol-eau, et C la concentration molaire d'un produit chimique produisant une réponse biologique standard, pour décrire l'effet de composés organiques simples non réactifs et non-électrolytes sur des animaux entiers, des organes, des cellules ou même des enzymes pures. Cinq de ces équations, qui s'appliquent à la toxicité de cinq alcools monohydriques simples vis-à-vis de cinq espèces de poisson, présentent des pentes et des points d'interception avec les axes presque identiques, qui sont pratiquement les mêmes que ceux trouvés par Könemann en 1981, lequel n'était apparemment pas au courant des travaux antérieurs de Hansch. Könemann et d'autres ont démontré que de telles substances simples non-électrolytes et non réactives agissaient toutes par un mécanisme de narcose dans le cadre d'un essai de toxicité aiguë chez le poisson, en produisant une toxicité minimale ou de référence (Lipnick, 1989b).

### 6.2 Artefacts expérimentaux entraînant une sous-estimation du danger

264. Les autres substances non-électrolytes peuvent présenter une toxicité plus importante que celle prédite par ces QSAR, mais ne peuvent être moins toxiques, sauf en cas d'artefact expérimental. Les artefacts expérimentaux peuvent être des données obtenues pour des composés tels que des hydrocarbures ayant tendance à se volatiliser pendant l'expérience, ou des composés très hydrophobes, pour lesquels la durée de l'essai de toxicité aiguë peut être insuffisante pour atteindre le partage correspondant à l'équilibre stationnaire entre la concentration dans la phase aquatique (solution d'essai dans l'aquarium) et le site hydrophobe interne de l'action narcotique. Le tracé de la relation QSAR représentant  $\log K_{oe}$  en fonction de  $\log C$  pour ces substances simples non-électrolytes et non réactives met en évidence une relation linéaire tant que cet équilibre s'établit avant la fin de l'essai. Au-delà, on observe une relation bilinéaire, le produit chimique le plus toxique étant celui pour lequel on relève la valeur la plus élevée de  $\log K_{oe}$  pour laquelle cet équilibre s'établit (Lipnick, 1995).

265. Le phénomène de seuil de solubilité dans l'eau pose un autre problème expérimental. Si la concentration toxique nécessaire pour produire l'effet est supérieure à la solubilité du composé dans l'eau, on n'observera aucun effet, même à la saturation dans l'eau. Les composés pour lesquels la concentration toxique prévue est proche de la solubilité dans l'eau ne présenteront pas non plus d'effet si la durée de

l'essai est insuffisante pour atteindre le partage à l'équilibre. On observe un phénomène de seuil similaire dans le cas des tensioactifs, si la toxicité est prévue à une concentration supérieure à la concentration micellaire critique. Bien que de tels composés puissent ne pas manifester de toxicité dans ces conditions lorsqu'ils sont testés seuls, leurs contributions toxiques aux mélanges sont toujours présentes. Pour les composés présentant des valeurs identiques de  $\log K_{oe}$ , les différences d'hydrosolubilité traduisent des écarts entre les enthalpies de fusion rapportées au point de fusion. Le point de fusion reflète le degré de stabilité du réseau cristallin et sa valeur est régie par les liaisons hydrogène intermoléculaires, le manque de flexibilité conformationnelle et la symétrie. Plus un composé est symétrique, plus son point de fusion est élevé (Lipnick, 1990).

### 6.3 PROBLÈMES RENCONTRÉS DANS LA MODÉLISATION QSAR

266. Choisir un modèle QSAR approprié signifie que ce modèle fournira une prédiction fiable de la toxicité ou de l'activité biologique d'un produit chimique non testé. D'une manière générale, la fiabilité diminue lorsque la complexité de la structure chimique augmente, à moins qu'une relation QSAR ait été établie pour un ensemble étroitement défini de produits chimiques d'une structure semblable à celle de la substance candidate. Des modèles QSAR élaborés à partir de catégories de produits chimiques étroitement définies sont couramment employés dans la mise au point de produits pharmaceutiques, une fois que l'on a identifié une nouvelle tête de série et qu'il y a lieu d'apporter des modifications structurelles mineures pour optimiser son activité (et réduire sa toxicité). Globalement, l'objectif est de réaliser des estimations par interpolation plutôt que par extrapolation.

267. Par exemple, si nous disposons de données relatives à la  $CL_{50}$  à 96 h chez le vairon tête de boule (*Pimephales promelas*) pour l'éthanol, le n-butanol, le n-hexanol et le n-nonanol, nous avons une certaine confiance dans les prévisions concernant ce point final pour le n-propanol ou le n-pentanol. En revanche, nous éprouverions une confiance moindre en formulant une telle prédiction pour le méthanol qui, avec moins d'atomes de carbone que tous les produits chimiques testés, représente une extrapolation. De fait, le comportement du premier membre d'une telle série homologue est généralement le plus anormal et ne doit pas être prédit à partir de données relatives aux autres membres de la série. Même la toxicité des alcools à chaîne ramifiée peut constituer une extrapolation abusive, selon le point final considéré. Une telle extrapolation devient d'autant moins fiable que la toxicité est liée à la production de métabolites pour un point final particulier, et non aux propriétés du composé parent. De même, si la toxicité s'exerce par l'intermédiaire d'un mécanisme de liaison à un récepteur spécifique, les effets relevés pour de faibles modifications de la structure chimique peuvent être très importants.

268. La validité de telles prédictions dépend, en dernière analyse, de la mesure dans laquelle les composés utilisés pour établir le modèle QSAR pour un point final biologique spécifique agissent selon un mécanisme moléculaire commun. Dans de nombreux cas, sinon la plupart, une relation QSAR ne représente pas un modèle mécaniste, mais simplement un modèle corrélatif. Un modèle mécaniste véritablement valide doit être établi à partir d'une série de produits chimiques agissant tous selon un mécanisme moléculaire commun, et répondre à une équation utilisant un ou plusieurs paramètres directement liés à une ou plusieurs étapes du mécanisme en question. Ces paramètres ou propriétés sont plus généralement connus sous le nom de descripteurs moléculaires. Il importe également de garder à l'esprit que nombre de ces descripteurs moléculaires couramment en usage n'ont pas nécessairement d'interprétation physique directe. Pour un modèle corrélatif, l'accord statistique des données sera probablement moins bon que pour un modèle mécaniste, compte tenu de ces limitations. Les mécanismes ne sont pas nécessairement parfaitement compris, mais les informations connues peuvent être suffisantes pour donner confiance dans cette approche. Pour les modèles corrélatifs, la fiabilité des prédictions augmente avec l'étroitesse de la définition, par exemple, pour une catégorie d'électrophiles telle que les acrylates qui peuvent présenter un degré de réactivité similaire, et la toxicité peut être estimée pour un produit chimique "nouveau" à l'aide d'un modèle reposant uniquement sur le paramètre  $\log K_{oe}$ .

269. A titre d'exemple, les alcools primaires et secondaires contenant une liaison double ou triple conjuguée avec la fonction hydroxyle (alcool allylique ou propargylique) présentent une toxicité plus forte que celle prédite par un modèle QSAR pour les composés saturés correspondants. Ce comportement a été attribué à un mécanisme pro-électrophile faisant intervenir l'activation métabolique par l'enzyme alcool-déshydrogénase omniprésente en aldéhydes et cétones  $\alpha,\beta$ -insaturées correspondantes, qui peuvent agir comme électrophiles via un mécanisme de type Michael (Veith *et al.*, 1989). En présence d'un inhibiteur de l'alcool-déshydrogénase, ces composés se comportent comme d'autres alcools et ne présentent pas d'excès de toxicité, en accord avec l'hypothèse mécaniste.

270. La situation devient rapidement plus complexe dès que l'on sort de ces séries homologues de composés. Considérons, par exemple, les dérivés benzéniques simples. La série des chlorobenzènes peut être considérée comme semblable à une série homologue. Il n'y aura probablement guère de différence de toxicité entre les trois isomères du dichlorobenzène, de sorte qu'un modèle QSAR pour les chlorobenzènes reposant sur des données d'essai concernant l'un de ces isomères est susceptible de convenir. Que se passe-t-il en cas de substitution d'autres groupes fonctionnels sur le noyau benzénique ? L'addition d'une fonction hydroxyle sur un noyau benzénique donne un phénol qui, à la différence d'un alcool aliphatique, n'est plus une substance neutre, mais un composé acide ionisable, en raison de la stabilisation par résonance de la charge négative résultante. De ce fait, le phénol n'agit pas comme un véritable agent narcotique. Avec l'addition sur le phénol de substituants attracteurs d'électrons (par exemple, des atomes de chlore), on passe à des composés agissant comme découpleurs de la phosphorylation oxydative (par exemple, l'herbicide dinoseb). La substitution par un groupe aldéhyde entraîne une augmentation de la toxicité par un mécanisme électrophile car ces composés réagissent avec des groupes amino tels que le groupe lysine  $\epsilon$ -amino pour donner un adduit de type base de Schiff. De manière similaire, le chlorure de benzyle agit comme un composé électrophile pour former des adduits covalents avec des groupes sulfhydryle. Face à une prédiction relative à un composé non testé, il convient d'étudier avec soin la réactivité chimique de ces groupes fonctionnels et de beaucoup d'autres, ainsi que l'interaction de ces groupes entre eux, et de s'efforcer d'étayer ces informations à partir de la littérature dans le domaine chimique (Lipnick, 1991b).

271. Compte tenu de ces limitations dans l'utilisation des QSAR pour formuler des prédictions, il est préférable d'employer ces relations comme moyen de définir des priorités pour les essais plutôt que comme substitut des essais, à moins qu'on ne dispose de certaines données mécanistiques sur le composé non testé lui-même. De fait, l'incapacité de fournir une prédiction, associée à la connaissance de rejets et d'expositions dans l'environnement, peut par elle-même suffire à déclencher des essais ou la mise au point d'un nouveau modèle QSAR pour une catégorie de produits chimiques nécessitant de telles décisions. Il est possible d'établir un modèle QSAR par analyse statistique, notamment par analyse par régression, à partir d'un tel ensemble de données. On peut, à titre de premier essai, utiliser  $\log K_{oe}$ , le descripteur moléculaire le plus couramment employé.

272. A l'opposé, l'établissement d'un modèle QSAR mécaniste nécessite de comprendre le mécanisme moléculaire et de savoir quels paramètres modéliseraient de manière appropriée les actions, ou encore de disposer d'une hypothèse de travail à ce sujet. Il importe de garder à l'esprit qu'il ne s'agit pas d'une hypothèse portant sur le mode d'action, qui concerne la réponse biologique/physiologique mais non le mécanisme moléculaire.

#### 6.4 Utilisation des QSAR dans la classification des dangers pour le milieu aquatique

273. Les propriétés intrinsèques suivantes des substances sont pertinentes du point de vue de la classification pour l'environnement aquatique.

- coefficient de partage octanol-eau,  $\log K_{oe}$  ;
- facteur de bioconcentration, FBC ;

- dégradabilité abiotique et biodégradation ;
- toxicité aquatique aiguë pour les poissons, les daphnies et les algues ;
- toxicité prolongée pour les poissons et les daphnies.

274. A condition d'être valides, les données d'essai ont toujours la priorité sur les prédictions tirées des QSAR, ces dernières étant utilisées pour combler les lacunes en matière de données en vue de la classification. La fiabilité et le domaine d'application des QSAR disponibles étant variables, différentes restrictions s'appliquent à la prévision de chacun des points finaux. Néanmoins, si un composé testé appartient à une catégorie chimique ou à un type de structure (voir ci-dessus) pour lesquels on éprouve une certaine confiance dans l'utilité prédictive du modèle QSAR, il est intéressant de comparer cette prédiction avec les données expérimentales, dans la mesure où il n'est pas inhabituel d'utiliser cette approche pour détecter certains artefacts expérimentaux (volatilisation, durée de l'essai insuffisante pour atteindre l'équilibre, et phénomène de seuil lié à la solubilité dans l'eau) dans les données mesurées, qui dans la plupart des cas conduiraient à classer les substances à un niveau de toxicité plus faible que le niveau réel.

275. Lorsque deux QSAR ou plus sont applicables ou semblent l'être, il est utile de comparer les prévisions de ces divers modèles, de la même façon que les données prédites doivent être comparées aux données mesurées (comme indiqué précédemment). L'absence de divergence entre les modèles est un élément rassurant quant à la validité des prédictions. Elle peut aussi signifier, bien entendu, que les modèles ont été mis au point à partir de données concernant des composés similaires et de méthodes statistiques analogues. En revanche, si les prédictions sont très différentes, ce résultat doit faire l'objet d'un examen plus poussé. Il est toujours possible qu'aucun des modèles utilisés ne fournisse de prédiction valide. Il convient, dans une première étape, d'examiner la structure et les propriétés des produits chimiques utilisés pour établir chacun des modèles prédictifs afin de déterminer si l'un quelconque des modèles repose sur des produits chimiques similaires sur ces deux plans à celui pour lequel on a besoin d'une prévision. Si un jeu de données contient un analogue approprié ayant servi à établir le modèle, il convient de comparer la valeur mesurée pour ce composé dans la base de données, à la prédiction par le modèle. Si les résultats concordent avec le modèle global, ce modèle est probablement celui dont l'utilisation est la plus fiable. De même, si aucun des modèles ne contient de données d'essai pour un tel analogue, il est recommandé de tester le produit chimique en question.

276. L'USEPA a récemment placé sur son site Internet un projet de document, "Development of Chemical Categories in the HPV Challenge Program", qui propose d'utiliser des catégories de produits chimiques pour "... compiler volontairement un ensemble de données de dépistage (EDD) concernant la totalité des produits chimiques figurant sur la liste des substances chimiques produites en grandes quantités des Etats-Unis... [de manière à fournir] les données de dépistage de base nécessaires à une évaluation initiale des propriétés physico-chimiques, du devenir dans l'environnement et des effets sur la santé humaine et l'environnement des produits chimiques" (USEPA, 1999). Cette liste comprend "... environ 2 800 substances chimiques produites en grandes quantités, recensées en 1990 dans le cadre de la mise à jour de l'inventaire des substances toxiques au titre de la Toxic Substances Control Act".

277. Une approche proposée consiste, "...lorsque cela est scientifiquement justifiable, ... à considérer des produits chimiques étroitement apparentés comme un groupe, ou une catégorie, plutôt que de les tester individuellement. Dans cette optique, il n'est pas nécessaire de soumettre chaque produit chimique à des essais pour chaque point final EDD". Ces essais limités pourraient se justifier à condition que "...le jeu de données final permette d'évaluer les points finaux non testés, idéalement par interpolation [c'est nous qui soulignons] entre et parmi les membres d'une catégorie". Les procédés utilisés pour définir ces catégories et obtenir ces données sont décrits dans la proposition.

278. Une deuxième approche envisagée, qui nécessite potentiellement moins de données (USEPA, 2000a), consiste à "...appliquer des principes SAR (relations structure-activité) à un produit chimique isolé

étroitement apparenté à un ou plusieurs produits chimiques mieux caractérisés (“analogues”).” Une troisième approche consisterait à utiliser “... une combinaison des approches par analogues et par catégorie ... [pour des] produits chimiques isolés, ... [semblable à celle] adoptée dans ECOSAR (USEPA, 2000b), un programme informatique reposant sur les SAR, qui génère des valeurs d'écotoxicité". Le document présente aussi de manière détaillée l'historique de l'utilisation des SAR dans le programme de l'USEPA sur les nouveaux produits chimiques, et la marche à suivre pour collecter et analyser les données destinées à de telles approches SAR.

279. Le Conseil nordique des ministres a publié un rapport (Pedersen *et al.*, 1995), intitulé “Environmental Hazard Classification”, qui contient des informations sur la collecte et l'interprétation des données, et dont une section (5.2.8) est consacrée à l'estimation de la solubilité dans l'eau et de la toxicité aquatique aiguë à partir des QSAR. Cette section porte aussi sur l'estimation des propriétés physico-chimiques, y compris  $\log K_{oe}$ . Aux fins de la classification, le rapport recommande des méthodes d'estimation permettant de prédire une "toxicité aquatique aiguë minimale" pour "...des composés neutres, organiques, non réactifs et non ionisables comme les alcools, les cétones, les éthers et les halogénures d'alkyle et d'aryle, qui peuvent aussi être utilisés pour les hydrocarbures aromatiques, les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques halogénés, ainsi que les sulfures et les disulfures", comme indiqué dans un document d'orientation antérieur de l'OCDE (OCDE, 1995). Le document publié par le Conseil nordique s'accompagne aussi de disquettes renfermant une application informatique de certaines de ces méthodes.

280. Le Centre d'écologie et de toxicologie de l'industrie chimique européenne (ECETOC) a publié un rapport intitulé “QSARs in the Assessment of the Environmental Fate and Effects of Chemicals,” qui décrit l'utilisation des QSAR pour “...contrôler la validité des données ou combler les lacunes en matière de données, en vue de définir les priorités, d'évaluer les risques et de classer les substances (ECETOC, 1998). Les QSAR sont décrites comme des moyens de prédiction du devenir dans l'environnement et de la toxicité aquatique. Le rapport prend note de la nécessité de disposer d'un ensemble cohérent de données pour un point final donné, correspondant à une gamme bien définie de structures chimiques ("domaine"), à partir duquel on constitue un jeu de données d'entraînement. Le document examine aussi les avantages des modèles mécanistes, l'utilisation de l'analyse statistique dans le développement des QSAR et la façon d'évaluer les "cas aberrants".

#### 6.4.1 Coefficient de partage octanol-eau, $\log K_{oe}$

281. On dispose de programmes informatiques tels que CLOGP (USEPA, 1999), LOGKOW (USEPA, 2000a) et SPARC (USEPA, 2000b), pour calculer directement  $\log K_{oe}$  à partir de la structure chimique. CLOGP et LOGKOW reposent sur l'addition des contributions de groupe, tandis que SPARC est fondé sur un algorithme plus théorique simulant la structure chimique. Il faut user de prudence lorsqu'on se sert de valeurs calculées pour des composés susceptibles de subir une hydrolyse dans l'eau ou une autre réaction, car ces transformations doivent être prises en compte dans l'interprétation des données d'essai relatives à la toxicité aquatique de ces produits chimiques réactifs. D'une manière générale, seul le modèle SPARC peut être utilisé pour les composés inorganiques et organométalliques. L'estimation de  $\log K_{oe}$  ou de la toxicité aquatique pour les composés tensioactifs, les agents chélatants et les mélanges requiert des méthodes spéciales.

282. Il est possible de calculer des valeurs de  $\log K_{oe}$  pour le pentachlorophénol et des composés similaires, sous leur forme tant ionisée que non ionisée (neutre). On peut en principe faire de même pour certaines molécules réactives (comme le chlorure de benzényle), mais il faut aussi tenir compte de leur réactivité et de leur hydrolyse ultérieure. De même, pour ces phénols ionisables, le  $pK_a$  constitue un deuxième paramètre. Il est possible de recourir à des modèles spécifiques pour calculer des valeurs de  $\log K_{oe}$  pour des composés organométalliques, mais ces modèles doivent être appliqués avec circonspection, car certains de ces composés existent réellement sous la forme de paires d'ions dans l'eau.



283. Dans le cas de composés extrêmement lipophiles, on peut réaliser des mesures de  $\log K_{oe}$  allant jusqu'à environ 6 à 6.5, par agitation en flacon, et on peut étendre le domaine de mesure jusqu'à des valeurs de  $\log K_{oe}$  allant jusqu'à 8 environ, en utilisant la méthode par agitation douce (Bruijn *et al.*, 1989). Ces calculs sont considérés comme utiles, même en cas d'extrapolation au-delà des valeurs mesurables par l'une ou l'autre de ces méthodes. Bien entendu, il ne faut pas oublier que si les modèles QSAR de toxicité, etc., sont établis à partir de produits chimiques présentant des valeurs de  $\log K_{oe}$  plus faibles, la prédiction elle-même sera aussi une extrapolation ; de fait, on sait que dans le cas de la bioconcentration, la relation avec  $\log K_{oe}$  devient non linéaire pour les valeurs plus élevées. Pour les composés présentant une faible valeur de  $\log K_{oe}$ , il est également possible d'appliquer les contributions de groupe, mais cette méthode n'est pas très utile pour évaluer le danger car, pour de telles substances, en particulier pour celles associées à des valeurs négatives de  $\log K_{oe}$ , il ne peut se produire qu'un partage réduit, voire nul, au niveau des sites lipophiles et, comme le signale Overton, ces substances produisent une toxicité par l'intermédiaire d'effets osmotiques (Lipnick, 1986).

#### 6.4.2 Facteur de bioconcentration, FBC

284. Si l'on dispose de valeurs du FBC déterminées expérimentalement, il convient d'utiliser ces valeurs pour la classification. Les mesures de bioconcentration doivent être réalisées sur des échantillons purs, à des concentrations d'essai inférieures à la solubilité dans l'eau, et pendant une durée suffisante pour atteindre l'équilibre à l'état stationnaire entre la concentration du produit dans l'eau et celle dans les tissus de poisson. En outre, pour les essais de bioconcentration de durée prolongée, la corrélation avec les valeurs de  $\log K_{oe}$  se stabilise et finit par diminuer. Dans les conditions environnementales, la bioconcentration des produits chimiques fortement lipophiles s'opère par une absorption combinée à partir des aliments et de l'eau, le passage à l'absorption alimentaire intervenant pour  $\log K_{oe} \approx 6$ . On peut autrement utiliser les valeurs de  $\log K_{oe}$  en association avec un modèle QSAR afin de prédire le potentiel de bioaccumulation des composés organiques. Les écarts avec ces QSAR tendent à refléter les différences dans l'ampleur du métabolisme subi par les produits chimiques dans le poisson. C'est pourquoi certains produits chimiques, comme les phtalates, peuvent se concentrer dans les milieux biologiques de manière sensiblement moins importante que prévu. Il convient également d'être prudent en comparant les valeurs prédites du FBC et celles obtenues en utilisant des composés marqués, la concentration dans les tissus ainsi détectée pouvant représenter un mélange de composé parent et de métabolites, voire de composé parent ou de métabolite lié de manière covalente.

285. On utilisera de préférence des valeurs de  $\log K_{oe}$  obtenues expérimentalement. Cependant, les valeurs anciennement obtenues par agitation en flacon qui sont supérieures à 5.5 ne sont pas fiables et, dans de nombreux cas, il vaut mieux employer une moyenne de valeurs calculées ou refaire les mesures en utilisant la méthode par agitation douce (Bruijn *et al.*, 1989). En cas de doute raisonnable sur la précision des données mesurées, on utilisera des valeurs de  $\log K_{oe}$  calculées.

#### 6.4.3 Dégradabilité abiotique et biodégradation

286. Les QSAR destinées à évaluer la dégradation abiotique dans les phases aqueuses sont des relations linéaires d'enthalpie libre (LFER), étroitement définies pour des catégories spécifiques de produits chimiques et de mécanismes. Par exemple, de telles LFER sont disponibles pour l'hydrolyse de chlorures de benzyle comportant divers substituants sur le noyau aromatique. Ces modèles LFER étroitement définis tendent à être très fiables lorsqu'on dispose des paramètres nécessaires pour le ou les substituants en question. La photodégradation, c'est-à-dire la réaction avec des espèces réactives produites par les UV, peut être extrapolée à partir d'estimations portant sur le compartiment aérien. Bien que ces processus abiotiques n'entraînent généralement pas une dégradation complète des composés organiques, ils constituent souvent des points de départ importants et peuvent être limitants en termes de vitesse. Les QSAR servant au calcul de la biodégradabilité sont des modèles spécifiques d'un composé (OCDE, 1995)

ou des modèles utilisant les contributions de groupe, comme le programme BIODEG (Hansch et Leo, 1995 ; Meylan et Howard, 1995 ; Hilal *et al.*, 1994 ; Howard *et al.*, 1992 ; Boethling *et al.*, 1994 ; Howard et Meylan, 1992 ; Loonen *et al.*, 1999). Bien que le domaine d'application des modèles validés spécifiques d'une catégorie de composés soit très réduit, celui des modèles utilisant les contributions de groupe est potentiellement plus large, mais se limite aux composés contenant les sous-structures couvertes par le modèle. Des études de validation ont suggéré que les prédictions de biodégradabilité fournies par les modèles utilisant les contributions de groupe actuellement disponibles pouvaient servir à prévoir la "non-biodégradabilité facile" (Pedersen *et al.*, 1995 ; Langenberg *et al.*, 1996 ; USEPA, 1993) – et donc, en relation avec la classification des dangers pour l'environnement aquatique, la "non dégradabilité rapide."

#### 6.4.4 Toxicité aquatique aiguë pour les poissons, les daphnies et les algues

287. On peut prédire la toxicité aquatique aiguë de produits chimiques non réactifs et non-électrolytes (toxicité de référence) à partir de leur valeur de  $\log K_{oe}$  avec un degré élevé de confiance, sous réserve de ne pas avoir détecté la présence de groupes fonctionnels électrophiles, pro-électrophiles ou agissant selon un mécanisme spécial (voir ci-dessus). Des problèmes subsistent pour ces toxiques spécifiques, pour lesquels le modèle QSAR approprié doit être sélectionné de manière empirique. Dans la mesure où l'on manque encore de critères simples pour identifier les modes d'action pertinents, un jugement d'expert empirique doit être porté pour choisir un modèle convenable. Ainsi, si on utilise une relation QSAR inappropriée, l'erreur sur les prévisions peut atteindre plusieurs ordres de grandeur et, dans le cas de la toxicité de référence, aboutir à une valeur sous-estimée, plutôt qu'à une valeur en excès.

#### 6.4.5 Toxicité prolongée pour les poissons et les daphnies

288. Il convient de ne pas utiliser des valeurs calculées de toxicité chronique pour les poissons et les daphnies pour annuler un classement reposant sur des données de toxicité aiguë expérimentales. On ne dispose que d'un petit nombre de modèles validés pour calculer la toxicité prolongée pour les poissons et les daphnies. Ces modèles reposent uniquement sur des corrélations avec  $\log K_{oe}$ , ne s'appliquent qu'aux composés organiques non réactifs et non-électrolytes, et ne conviennent pas pour les produits chimiques présentant des modes d'action spécifiques en conditions d'exposition prolongée. La fiabilité de l'estimation des valeurs de toxicité chronique est tributaire d'une différenciation correcte entre les mécanismes de toxicité chronique spécifiques et non spécifiques, faute de quoi la toxicité prédite peut être erronée de plusieurs ordres de grandeur. Il convient de noter que si, pour un grand nombre de composés, un excès de toxicité<sup>1</sup> dans un essai de toxicité chronique correspond à un excès de toxicité dans un essai de toxicité aiguë, ce n'est pas toujours le cas.

---

<sup>1</sup> Toxicité en excès,  $T_e = (\text{toxicité de référence prédite}) / \text{toxicité observée}$

## ANNEXE 6.I

## RÉFÉRENCES

Boethling, R.S., Howard, P.H., Meylan, W.M. Stiteler, W.M., Beauman, J.A., et Tirado, N. (1994). Group contribution method for predicting probability and rate of aerobic biodegradation. *Envir. Sci. Technol.*, 28, 459-465.

De Bruijn, J, Busser, F., Seinen, W., et Hermens, J. (1989), Determination of octanol/water partition coefficients for hydrophobic organic chemicals with the "slow-stirring method," *Environ. Toxicol. Chem.*, 8, 499-512.

ECETOC (1998), QSARs in the Assessment of the Environmental Fate and Effects of Chemicals, Technical report No 74.

Hansch, C. et A. Leo (1995), *Exploring QSAR*, American Chemical Society.

Hilal, S. H., L. A. Carreira et S. W. Karickhoff (1994), *Quantitative Treatments of Solute/solvent Interactions, Theoretical and Computational Chemistry, Vol. 1*, 291-353, Elsevier Science.

Howard, P.H., Boethling, R.S, Stiteler, W.M., Meylan, W.M., Hueber, A.E., Beaumen, J.A. et Larosche, M.E. (1992). Predictive Model for aerobic biodegradation developed from a file of evaluated biodegradation data. *Envir. Toxicol. Chem.* 11, 593-603.

Howard, P. et Meylan, W.M. (1992). Biodegradation Probability Program, Version 3, Syracuse Research Corp., NY.

Langenberg, J.H., Peijnenburg, W.J.G.M. et Rorije, E. (1996). On the usefulness and reliability of existing QSARs for risk assessment and priority setting. *SAR QSAR Environ. Res.*, 5, 1-16.

R.L. Lipnick (1986). Charles Ernest Overton: Narcosis studies and a contribution to general pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.*, 7, 161-164.

R.L. Lipnick (1989a). Hans Horst Meyer and the lipid theory of narcosis, *Trends Pharmacol. Sci.*, 10 (7) July, 265-269; Erratum: 11 (1) Jan (1990), p. 44.

R.L. Lipnick (1989b). Narcosis, electrophile, and proelectrophile toxicity mechanisms. Application of SAR and QSAR. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8, 1-12 .

R.L. Lipnick (1990). Narcosis: Fundamental and Baseline Toxicity Mechanism for Nonelectrolyte Organic Chemicals. In: W. Karcher et J. Devillers (eds.) *Practical Applications of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in Environmental Chemistry and Toxicology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Pays-Bas, pp. 129-144.

R.L. Lipnick (ed.) (1991a). *Charles Ernest Overton: Studies of Narcosis and a Contribution to General Pharmacology*, Chapman and Hall, Londres, et Wood Library-Museum of Anesthesiology.

R.L. Lipnick (1991b). Outliers: their origin and use in the classification of molecular mechanisms of toxicity, *Sci. Tot. Environ.*, 109/110 131-153.

R.L. Lipnick (1995). Structure-Activity Relationships. In: Fundamentals of Aquatic Toxicology, 2nd edition, (G.R. Rand, ed.), Taylor & Francis, Londres, 609-655.

Loonen, H., Lindgren, F., Hansen, B., Karcher, W., Niemela, J., Hiromatsu, K., Takatsuki, M., Peijnenburg, W., Rorije, E., et Struijs, J. (1999). Prediction of biodegradability from chemical structure: modeling of ready biodegradation test data. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 1763-1768.

Meylan, W. M. et P. H. Howard (1995), *J. Pharm. Sci.*, 84, 83-92.

OCDE (1993), Structure-Activity Relationships for Biodegradation. OECD Environment Monograph No. 68 OCDE, Paris, France.

OCDE (1995). Environment Monographs No. 92. Guidance Document for Aquatic Effects Assessment. OCDE, Paris.

F. Pedersen, H. Tyle, J. R. Niemelä, B. Guttmann, L. Lander, et A. Wedebrand (1995), Environmental Hazard Classification: Data Collection and Interpretation Guide for Substances to be Evaluated for Classification as Dangerous for the Environment, 2<sup>nd</sup> Edition, TemaNord 1995:581, Nordic Council of Ministers, Copenhagen, janvier.

USEPA (1999) Development of Chemical Categories in the HPV Challenge Program, <http://www.epa.gov/chemrtk/categuid.htm>

USEPA (2000a), The Use of Structure-Activity Relationships (SAR) in the High Production Volume Chemicals Challenge Program, <http://www.epa.gov/chemrtk/sarfinl1.htm>

USEPA (2000b), ECOSAR, <http://www.epa.gov/oppt/newchems/21ecosar.htm>

USEPA/CE (1993): US EPA Joint Project on the Evaluation of (Quantitative) Structure Activity Relationships, Commission des Communautés européennes, Rapport final, juillet.

G.D. Veith, R.L. Lipnick, et C.L. Russom (1989). The toxicity of acetylenic alcohols to the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Narcosis and proelectrophile activation. *Xenobiotica*, 19(5), 555-565.

## 7. CLASSIFICATION DES MÉTAUX ET DES COMPOSÉS MÉTALLIQUES

### 7.1 INTRODUCTION

289. Le système harmonisé de classification des substances chimiques est un système fondé sur les dangers, et l'identification des dangers repose sur la toxicité aquatique des substances et sur les informations relatives à leur comportement en matière de dégradation et de bioaccumulation (OCDE, 1998). Le présent document traitant uniquement des dangers associés à une substance donnée lorsque cette substance est dissoute dans la colonne d'eau, l'exposition provenant de cette source est limitée par la solubilité dans l'eau de cette substance et par sa biodisponibilité chez les espèces présentes dans le milieu aquatique. Ainsi, les schémas de classification des dangers pour les métaux et les composés métalliques se limitent aux dangers présentés par les métaux et composés métalliques lorsqu'ils sont disponibles (c'est-à-dire lorsqu'ils existent sous forme d'ions métalliques dissous, par exemple, sous forme de  $M^+$  en présence de  $M-NO_3$ ), et ne tiennent pas compte des expositions à des métaux ou composés métalliques non dissous dans la colonne d'eau, mais pouvant quand même être biodisponibles, comme les métaux présents dans les aliments. Ce chapitre ne considère pas l'ion non métallique (par exemple,  $CN^-$ ) des composés métalliques, qui peut être toxique ou organique et comporter des dangers liés à la bioaccumulation ou à la persistance. Pour ces composés métalliques, il faut également prendre en compte les dangers liés aux ions non métalliques.

290. La quantité d'ions métalliques susceptible d'être présente en solution après l'addition du métal et/ou de ses composés sera en grande partie déterminée par deux paramètres : la mesure dans laquelle il peut se dissoudre, c'est-à-dire sa solubilité dans l'eau, et la mesure dans laquelle il peut réagir avec le milieu pour se transformer en formes hydrosolubles. La vitesse et l'ampleur de ce dernier processus, appelé "transformation" aux fins du présent document d'orientation, peuvent varier sous divers aspects entre les différents composés et le métal lui-même, et constituent un facteur important dans la détermination de la catégorie de danger appropriée. Lorsqu'on dispose de données de transformation, il convient de les prendre en compte dans la détermination du classement. Le protocole de détermination de cette vitesse est disponible dans un document d'orientation séparé (OCDE, 2001).

291. D'une manière générale, la vitesse à laquelle une substance se dissout n'est pas considérée comme pertinente pour la détermination de sa toxicité intrinsèque. Cependant, pour les métaux et de nombreux composés métalliques inorganiques peu solubles, les difficultés pour obtenir la dissolution par des techniques de solubilisation normales sont si grandes que les deux processus de solubilisation et de transformation deviennent indiscernables. Ainsi, lorsque le composé est suffisamment peu soluble pour que les quantités dissoutes à l'issue de tentatives normales de solubilisation ne dépassent pas la  $CL(E)_{50}$ , ce sont la vitesse et l'ampleur de la transformation qui doivent être prises en compte. La transformation sera affectée par un certain nombre de facteurs, en particulier les propriétés du milieu en termes de pH, de dureté de l'eau, de température, etc. Outre ces propriétés, d'autres facteurs tels que la dimension et la surface spécifique des particules testées, la durée d'exposition au milieu et, bien entendu, la masse ou la charge superficielle de substance dans le milieu, joueront tous un rôle dans la détermination de la quantité d'ions métalliques dissous dans l'eau. En règle générale, les données de transformation ne peuvent donc être considérées comme fiables aux fins de la classification que si les essais ont été menés conformément au protocole normalisé mentionné ci-dessus en référence.

292. Ce protocole vise à normaliser les principales variables, de manière à permettre de relier directement la quantité d'ions dissous à la charge de substance ajoutée. C'est cette charge qui donne la quantité d'ions métalliques équivalente à la  $CL(E)_{50}$  disponible, que l'on peut ensuite utiliser pour déterminer la plage de danger appropriée pour la classification. La méthodologie d'essai dépasse le cadre

de ce document d'orientation, mais la stratégie à adopter pour utiliser les données issues du protocole d'essai, et les données nécessaires au fonctionnement de cette stratégie, feront l'objet d'une description.

293. Pour envisager la classification des métaux et composés métalliques, qu'ils soient facilement solubles ou peu solubles, il faut tenir compte d'un certain nombre de facteurs. Tel qu'il est défini dans le glossaire de ce document, le terme "dégradation" désigne la décomposition de molécules organiques. Pour les composés inorganiques et les métaux, le concept de dégradabilité, tel qu'il est envisagé et utilisé pour les molécules organiques, n'a manifestement guère de sens, sinon aucun. Plus exactement, la substance peut être transformée par des processus environnementaux normaux, de sorte que la biodisponibilité des espèces toxiques augmente ou diminue. De même, le  $\log K_{oc}$  ne peut être considéré comme une mesure du potentiel d'accumulation. Néanmoins, l'idée qu'une substance ou un métabolite/produit de réaction toxique peut ne pas disparaître rapidement de l'environnement et/ou peut s'accumuler dans les organismes vivants s'applique tout aussi bien aux métaux et aux composés métalliques qu'aux substances organiques.

294. La spéciation de la forme soluble peut être affectée par le pH, la dureté de l'eau et d'autres variables, et peut donner des formes particulières de l'ion métallique qui sont plus ou moins toxiques. De plus, les ions métalliques peuvent être rendus indisponibles à la sortie de la colonne d'eau par un certain nombre de processus (minéralisation et séparation, par exemple). Ces processus peuvent parfois être suffisamment rapides pour être analogues à une dégradation pour l'évaluation de la classification sous l'angle de la toxicité chronique. Cependant, le passage de l'ion métallique de la colonne d'eau à d'autres milieux environnementaux ne signifie nécessairement ni qu'il n'est plus biodisponible, ni qu'il a été rendu indisponible de façon permanente.

295. Les informations concernant le degré de séparation d'un ion métallique de la colonne d'eau, ou la mesure dans laquelle un métal a été ou peut être converti en une forme moins toxique ou non toxique, ne sont souvent pas disponibles pour un éventail suffisamment large de conditions s'appliquant à l'environnement, aussi un certain nombre d'hypothèses devront-elles être formulées pour faciliter la classification. Ces hypothèses peuvent être modifiées si des données disponibles apparaissent par ailleurs. Dans le premier cas, il convient de supposer que les ions métalliques, une fois dans l'eau, ne se séparent pas rapidement de la colonne d'eau et qu'ainsi ces composés ne remplissent pas les critères. A la base de cette supposition, on trouve l'hypothèse selon laquelle, bien que la spéciation puisse se produire, les espèces resteront disponibles dans les conditions s'appliquant à l'environnement. Il se peut qu'il n'en soit pas toujours ainsi, comme nous l'avons expliqué précédemment, et tout élément qui indiquerait des modifications de la biodisponibilité en l'espace de 28 jours doit être examiné soigneusement. La bioaccumulation des métaux et des composés métalliques inorganiques est un processus complexe et les données de bioaccumulation doivent être utilisées avec précaution. L'application des critères relatifs à la bioaccumulation devra être envisagée au cas par cas, en tenant dûment compte de l'ensemble des données disponibles.

296. On peut en outre supposer, ce qui représente une approche prudente, qu'en l'absence de toute donnée de solubilité, mesurée ou calculée, pour un composé métallique particulier, la substance sera suffisamment soluble pour produire une toxicité au niveau de la  $CL(E)_{50}$ , et pourra donc être classée de la même façon que d'autres sels solubles. Encore une fois, ce n'est évidemment pas toujours le cas, et il peut être sage d'obtenir des données de solubilité appropriées.

297. Le présent chapitre traite des métaux et des composés métalliques. Dans le contexte de ce document d'orientation, les métaux et composés métalliques sont caractérisés comme suit, et les composés organométalliques sortent donc du cadre de ce chapitre :

(1) Les métaux,  $M^0$ , à l'état élémentaire ne sont pas solubles dans l'eau mais peuvent se transformer pour donner la forme disponible. Cela signifie qu'un métal à l'état élémentaire peut réagir avec

l'eau ou un électrolyte aqueux dilué pour former des produits cationiques ou anioniques solubles, et qu'au cours de ce processus, le métal s'oxydera ou se transformera, passant de l'état neutre ou du degré d'oxydation nul à un degré d'oxydation supérieur.

(2) Dans un composé métallique simple, tel qu'un oxyde ou un sulfure, le métal existe déjà à l'état oxydé, de sorte que l'oxydation du métal ne se poursuivra probablement pas lors de l'introduction du composé dans un milieu aqueux.

Cependant, bien que le degré d'oxydation puisse ne pas varier, l'interaction avec le milieu peut conduire à l'apparition de formes plus solubles. Un composé métallique modérément soluble peut être considéré comme un composé pour lequel il est possible de calculer un produit de solubilité, et qui donnera par dissolution une petite quantité de la forme disponible. Toutefois, il convient de reconnaître qu'un certain nombre de facteurs peuvent influencer sur la concentration finale, notamment le produit de solubilité de certains composés métalliques précipités au cours de l'essai de transformation/dissolution, par exemple, l'hydroxyde d'aluminium.

## **7.2 APPLICATION DES DONNÉES DE TOXICITÉ AQUATIQUE ET DE SOLUBILITÉ À LA CLASSIFICATION**

### **7.2.1 *Interprétation des données de toxicité aquatique***

298. Les études de toxicité aquatique réalisées selon un protocole reconnu devraient normalement pouvoir être acceptées comme valides à des fins de classification. On trouvera aussi au chapitre 3 une analyse des problèmes génériques communs à l'évaluation, aux fins de la classification, de tous les éléments de données sur la toxicité aquatique.

#### ***Complexation et spéciation des métaux***

299. La toxicité d'un métal particulier en solution semble dépendre principalement (sans que cela soit strictement restrictif) de la quantité d'ions métalliques libres dissous. Des facteurs abiotiques, y compris l'alcalinité, la force ionique et le pH, peuvent agir sur la toxicité des métaux de deux façons : en exerçant une influence sur la spéciation chimique du métal dans l'eau (et donc sur sa disponibilité) et en modulant l'absorption et la fixation du métal disponible par les tissus biologiques.

300. Lorsque la spéciation est importante, il peut être possible de modéliser les concentrations des différentes formes du métal, y compris celles susceptibles de produire une toxicité. Les méthodes analytiques permettant de quantifier les concentrations d'exposition, et de différencier les fractions complexées et non complexées de la substance d'essai, peuvent ne pas toujours être disponibles ou économiques.

301. La complexation des métaux avec des ligands organiques et inorganiques dans les milieux d'essai et les environnements naturels peut être évaluée à partir de modèles de spéciation des métaux. On peut utiliser des modèles de spéciation des métaux intégrant le pH, la dureté, le COD et les substances inorganiques, tels que les modèles MINTEQ (Brown et Allison, 1987), WHAM (Tipping, 1994) et CHESS (Santore et Driscoll, 1995) pour calculer les fractions non complexées et complexées d'ions métalliques. On peut aussi recourir au *Biotic Ligand Model* (BLM), qui permet de calculer la concentration d'ions métalliques responsable de l'effet toxique au niveau de l'organisme. Le modèle BLM n'a pour le moment été validé que pour un nombre limité de métaux, d'organismes et de points finaux (Santore et Di Toro, 1999). Il convient de toujours indiquer clairement les modèles et les formules utilisés pour caractériser la

complexation des métaux dans le milieu, ce qui permet leur retransposition aux environnements naturels (OCDE, 2000).

### **7.2.2 *Interprétation des données de solubilité***

302. Lorsqu'on examine les données de solubilité disponibles, il convient d'évaluer leur validité et leur applicabilité à l'identification des dangers associés aux composés métalliques. Il est en particulier nécessaire de connaître le pH auquel les données ont été produites.

#### ***Évaluation des données existantes***

303. Les données existantes pourront être de trois sortes. Pour certains métaux bien étudiés, on disposera des produits de solubilité et/ou de données de solubilité pour les divers composés inorganiques du métal. Il est également possible que la relation entre le pH et la solubilité soit connue. Cependant, pour de nombreux métaux ou composés métalliques, il est probable que les informations disponibles seront uniquement descriptives, comme par exemple, la mention "peu soluble". Malheureusement, il semble qu'il y ait très peu d'indications (cohérentes) sur les domaines de solubilité correspondant à ces termes descriptifs. Dans les cas où l'on ne dispose que de ce type d'information, il sera probablement nécessaire d'obtenir des données de solubilité en utilisant le Protocole de transformation/dissolution.

#### ***Essai préliminaire d'évaluation de la solubilité des composés métalliques***

304. En l'absence de données de solubilité, il est possible, pour les composés métalliques, d'utiliser un simple essai préliminaire de sélection, reposant sur le taux de charge élevé pendant 24 h, comme indiqué dans le Protocole de transformation/dissolution. La fonction de cet essai de "screening" est d'identifier les composés métalliques qui subissent une dissolution ou une transformation rapide, de sorte qu'ils sont indissociables des formes solubles et peuvent donc être classés sur la base de la concentration d'ions dissous. Lorsqu'on dispose de données provenant de l'essai de "screening" décrit de manière détaillée dans le Protocole de transformation/dissolution, il convient d'utiliser la solubilité maximale obtenue sur la plage de pH testée. En l'absence de données pour la plage complète de pH, il y a lieu de vérifier si cette solubilité maximale a été obtenue en se référant à des modèles thermodynamiques de spéciation convenables ou à d'autres méthodes appropriées (voir paragraphe 301). Il convient de noter que cet essai n'est destiné qu'aux composés métalliques.

#### **Essai proprement dit d'évaluation de la solubilité des métaux et des composés métalliques**

305. La première étape de cette partie de l'étude consiste, comme dans l'essai de "screening", à évaluer le ou les pH auxquels l'étude doit être menée. Normalement, l'essai proprement dit doit être réalisé à la valeur du pH qui maximise la concentration d'ions métalliques dissous dans la solution. Dans ce cas, la valeur du pH peut être sélectionnée selon les mêmes recommandations que celles formulées pour l'essai de "screening".

306. A partir des données provenant de l'essai proprement dit, il est possible de déterminer la concentration d'ions métalliques dans la solution après 7 jours pour chacune des trois charges (c'est-à-dire, 1 mg/L pour la charge "faible", 10 mg/l pour la charge "moyenne" et 100 mg/L pour la charge "élevée") utilisées dans l'essai. Si ce dernier a pour objet d'évaluer le danger à long terme associé à la substance, on peut prolonger jusqu'à 28 jours l'essai à faible charge, à une valeur convenable du pH.

### **7.2.3 *Comparaison des données de toxicité aquatique et de solubilité***

307. On décidera de classer ou non la substance en comparant les données de toxicité aquatique et les données de solubilité. Si la CL(E)<sub>50</sub> est dépassée, que les données de toxicité et de solubilité se rapportent



ou non au même pH et qu'il s'agisse ou non des seules données disponibles, il convient de classer la substance. Si l'on dispose d'autres données de solubilité montrant que la concentration après dissolution ne dépassera pas la  $CL(E)_{50}$  sur l'ensemble de la plage de pH, la substance ne doit pas faire l'objet d'un classement sous sa forme soluble. Cette décision peut supposer l'utilisation de données supplémentaires provenant soit d'essais écotoxicologiques, soit de modèles biodisponibilité-effet applicables.

### 7.3 ÉVALUATION DE LA TRANSFORMATION DANS L'ENVIRONNEMENT

308. La transformation dans l'environnement d'une espèce d'un métal en une autre espèce du même métal ne constitue pas une dégradation au sens pris par ce terme lorsqu'il s'applique aux composés organiques, et peut augmenter ou diminuer la disponibilité et la biodisponibilité des espèces toxiques. Cependant, sous l'effet de processus géochimiques naturels, les ions métalliques peuvent se partager à partir de la colonne d'eau. Les données relatives au temps de séjour dans la colonne d'eau, aux phénomènes se produisant à l'interface eau-sédiments (c'est-à-dire dépôt et remobilisation) sont assez nombreuses, mais n'ont pas été intégrées dans une véritable base de données. Néanmoins, il est possible d'intégrer cette démarche dans la classification en utilisant les principes et les hypothèses examinés plus haut dans la partie 7.1.

309. Il est très difficile de formuler des recommandations pour de telles évaluations, qui seront normalement traitées au cas par cas. Cependant, les éléments suivants peuvent être pris en compte :

- modifications de la spéciation si elles conduisent à des formes non disponibles, sachant toutefois que le potentiel de reconversion sous la forme première doit aussi être pris en considération ;
- transformations en un composé métallique considérablement moins soluble que le composé métallique considéré.

Il est recommandé de prendre certaines précautions (voir paragraphes 293 et 294).

### 7.4 BIOACCUMULATION

310. Bien que  $\log K_{oc}$  constitue un bon moyen de prédiction du FBC pour certains types de composés organiques, comme les substances organiques non polaires, il est bien entendu sans intérêt pour des substances telles que les composés métalliques inorganiques.

311. Les mécanismes régissant les vitesses d'absorption et de dépuration des métaux sont très complexes et divers, et il n'existe actuellement aucun modèle général pour les décrire. Il convient plutôt d'évaluer la bioaccumulation des métaux en fonction des critères de classification au cas par cas, en faisant appel à un jugement d'expert.

312. Bien que les FBC apportent des indications sur le potentiel de bioaccumulation, un certain nombre de complications peuvent intervenir dans l'interprétation des valeurs de FBC mesurées pour les métaux et les composés métalliques inorganiques. Pour certains métaux et composés métalliques inorganiques, la relation entre la concentration dans l'eau et le FBC dans certains organismes aquatiques est inverse, et il convient de faire preuve de discernement pour utiliser les données de bioconcentration. Il en est tout particulièrement ainsi pour les métaux essentiels sur le plan biologique. Ces métaux font l'objet d'une régulation active dans les organismes où ils ont une fonction essentielle. Les besoins alimentaires des organismes pouvant être supérieurs à la concentration du métal dans l'environnement, cette régulation active peut entraîner des valeurs élevées du FBC et une relation inverse entre le FBC et la concentration du métal dans l'eau. Lorsque les concentrations environnementales sont faibles, on peut s'attendre à de fortes valeurs du FBC, qui résultent naturellement de l'absorption du métal pour satisfaire les besoins

nutritionnels et qui, dans ce cas, peuvent être considérées comme un phénomène normal. De plus, si la concentration interne est régulée par l'organisme, les FBC mesurés peuvent diminuer lorsque la concentration externe augmente. Lorsque les concentrations externes sont si élevées qu'elles dépassent un niveau seuil ou qu'elles submergent le mécanisme de régulation, elles peuvent être préjudiciables pour l'organisme. Par ailleurs, un métal qui est essentiel pour un organisme particulier ne le sera pas nécessairement pour d'autres. Par conséquent, lorsque le métal n'est pas essentiel ou lorsque la bioconcentration d'un métal essentiel est supérieure aux niveaux nutritionnels, il convient d'accorder une attention particulière au potentiel de bioconcentration et aux problèmes environnementaux.

## **7.5 APPLICATION DES CRITÈRES DE CLASSIFICATION AUX MÉTAUX ET AUX COMPOSÉS MÉTALLIQUES**

### **7.5.1 Présentation de la stratégie de classification des métaux et des composés métalliques**

313. Les schémas de classification des métaux et des composés métalliques sont décrits ci-après et récapitulés sous forme de diagramme à la figure 1. Ces schémas comportent plusieurs étapes, dans lesquelles les données sont utilisées pour étayer des décisions. Les schémas de classification n'ont pas pour objet de générer de nouvelles données. En l'absence de données valides, il sera nécessaire d'employer toutes les données disponibles et de recourir à un jugement d'expert.

Dans les parties qui suivent, la référence à la  $CL(E)_{50}$  renvoie à l'élément ou aux éléments d'information qui seront utilisés pour sélectionner la plage de classification du métal ou du composé métallique.

314. Lorsqu'on examine des données relatives à la  $CL(E)_{50}$  pour des composés métalliques, il importe de s'assurer que l'élément de donnée devant être utilisé comme justification de la classification est exprimé en poids de la molécule du composé métallique à classer. Cette opération est connue sous le nom de correction en fonction de la masse moléculaire. Ainsi, bien que la plupart des données concernant les métaux soient exprimées, par exemple, en mg de métal/L, cette valeur devra être ajustée en fonction de la masse moléculaire correspondante du composé métallique. Ainsi :

$$\begin{aligned} & CL(E)_{50} \text{ d'un composé métallique} \\ & = CL(E)_{50} \text{ du métal} \times (\text{Masse moléculaire du composé métallique} / \text{masse atomique du métal}) \end{aligned}$$

Il peut aussi être nécessaire d'ajuster les données relatives à la CSEO en fonction de la masse moléculaire des composés métalliques.

### **7.5.2 Stratégie de classification des métaux**

315. Lorsque la  $CL(E)_{50}$  pour les ions métalliques considérés est supérieure à 100 mg/L, il est inutile de poursuivre l'application du schéma de classification aux métaux correspondants.

316. Lorsque la  $CL(E)_{50}$  pour les ions métalliques considérés est inférieure ou égale à 100mg/L, il convient d'examiner les données disponibles concernant la vitesse et l'ampleur de la production d'ions à partir du métal. Pour être valides et utilisables, ces données doivent avoir été obtenues à l'aide du Protocole de transformation/dissolution.

317. Lorsqu'on ne dispose pas de telles données, c'est-à-dire en l'absence de données claires et suffisamment valides pour montrer que la transformation en ions métalliques ne se produira pas, il convient d'appliquer la classification constituant un filet de sécurité (chronique IV), car la toxicité catégorisable connue de ces formes solubles est considérée comme suffisamment préoccupante.

318. Lorsqu'on dispose de données provenant d'un protocole de dissolution, il convient d'utiliser les résultats pour faciliter la classification en respectant les règles suivantes :

Essai de transformation de 7 jours

319. Si la concentration d'ions métalliques dissous après une période de 7 jours (ou moins) dépasse la  $CL(E)_{50}$ , le classement par défaut du métal est remplacé par le classement suivant :

- i) Si la concentration d'ions métalliques dissous au faible taux de charge est supérieure ou égale à la  $CL(E)_{50}$ , le métal sera classé dans la catégorie de danger aigu I. Il sera également placé dans la catégorie de danger chronique I, à moins qu'on ait la preuve à la fois d'un partage rapide à partir de la colonne d'eau et d'une absence de bioaccumulation ;
- ii) Si la concentration d'ions métalliques dissous au taux de charge moyen est supérieure ou égale à la  $CL(E)_{50}$ , le métal sera classé dans la catégorie de danger aigu II. Il sera également placé dans la catégorie de danger chronique II, à moins qu'on ait la preuve à la fois d'un partage rapide à partir de la colonne d'eau et d'une absence de bioaccumulation ;
- iii) Si la concentration d'ions métalliques dissous au taux de charge élevé est supérieure ou égale à la  $CL(E)_{50}$ , le métal sera classé dans la catégorie de danger aigu III. Il sera également placé dans la catégorie de danger chronique III, à moins qu'on ait la preuve à la fois d'un partage rapide à partir de la colonne d'eau et d'une absence de bioaccumulation.

Essai de transformation de 28 jours

320. Si le processus décrit au paragraphe 319 aboutit à la classification dans la catégorie de danger chronique I, aucune évaluation supplémentaire n'est nécessaire, car le métal sera classé indépendamment de toute information supplémentaire.

321. Dans tous les autres cas, des données supplémentaires peuvent avoir été obtenues à l'aide de l'essai de dissolution/transformation, en vue de montrer que le classement peut être modifié. Si, pour des substances classées dans les catégories de danger chronique II, III ou IV, la concentration d'ions métalliques dissous au faible taux de charge, après une durée totale de 28 jours, est inférieure ou égale à la CSEO à long terme, le classement peut être supprimé.

### **7.5.3 Stratégie de classification des composés métalliques**

322. Lorsque la  $CL(E)_{50}$  pour les ions métalliques considérés est supérieure à 100 mg/L, il est inutile de poursuivre l'application du schéma de classification aux composés métalliques.

***Si la solubilité est  $\geq CL(E)_{50}$ , le classement doit être réalisé en fonction de l'ion soluble.***

323. Tous les composés métalliques présentant une solubilité dans l'eau (mesurée, par exemple à l'aide de l'essai préliminaire de dissolution de 24 h ou estimée, par exemple à partir du produit de solubilité) supérieure ou égale à la  $CL(E)_{50}$  de l'ion métallique dissous sont considérés comme des composés métalliques facilement solubles. Il convient d'être prudent dans le cas des composés dont la solubilité est proche de la valeur de toxicité aiguë, car les conditions dans lesquelles la solubilité est mesurée peuvent différer sensiblement de celles de l'essai de toxicité aiguë. Dans ce cas, il est préférable d'utiliser les résultats de l'essai préliminaire de dissolution.

324. Les composés métalliques facilement solubles sont classés sur la base de la  $CL(E)_{50}$  (corrigée si nécessaire en fonction de la masse moléculaire) :

- i) Si la  $CL(E)_{50}$  de l'ion métallique dissous est inférieure ou égale à 1 mg/L, le composé sera classé dans la catégorie de danger aigu I. Il sera également placé dans la catégorie de danger chronique I, à moins qu'on ait la preuve à la fois d'un partage rapide à partir de la colonne d'eau et d'une absence de bioaccumulation ;
- ii) Si la  $CL(E)_{50}$  de l'ion métallique dissous est supérieure à 1 mg/L, mais inférieure ou égale à 10 mg/L, le composé sera classé dans la catégorie de danger aigu II. Il sera également placé dans la catégorie de danger chronique II, à moins qu'on ait la preuve à la fois d'un partage rapide à partir de la colonne d'eau et d'une absence de bioaccumulation ;
- iii) Si la  $CL(E)_{50}$  de l'ion métallique dissous est supérieure à 10 mg/L, mais inférieure ou égale à 100 mg/L, le composé sera classé dans la catégorie de danger aigu III. Il sera également placé dans la catégorie de danger chronique III, à moins qu'on ait la preuve à la fois d'un partage rapide à partir de la colonne d'eau et d'une absence de bioaccumulation .

***Si la solubilité est  $< CL(E)_{50}$ , le composé sera classé par défaut dans la catégorie de danger chronique IV***

325. Dans le contexte des critères de classification, les composés métalliques peu solubles sont définis comme ceux présentant une solubilité connue (mesurée, par exemple à l'aide de l'essai préliminaire de dissolution de 24 h ou estimée, par exemple à partir du produit de solubilité) inférieure à la  $CL(E)_{50}$  de l'ion métallique soluble. Dans les cas où les formes solubles du métal des composés métalliques peu solubles présentent une  $CL(E)_{50}$  inférieure ou égale à 100 mg/L et où la substance peut être considérée comme peu soluble, le classement constituant un filet de sécurité (danger chronique IV) doit être appliqué.

#### Essai de transformation de 7 jours

326. Pour les composés métalliques peu solubles classés dans la catégorie par défaut constituant un filet de sécurité, il est aussi possible d'utiliser les informations supplémentaires pouvant être apportées par l'essai de transformation/dissolution de 7 jours. Ces informations devraient inclure les taux de transformation pour les niveaux de charge faible, moyen et élevé.

327. Si la concentration d'ions métalliques dissous après une période de 7 jours (ou moins) dépasse la  $CL(E)_{50}$ , le classement par défaut des métaux est remplacé par le classement suivant :

- i) Si la concentration d'ions métalliques dissous au faible taux de charge est supérieure ou égale à la  $CL(E)_{50}$ , le composé sera classé dans la catégorie de danger aigu I. Il sera également classé dans la catégorie de danger chronique I, à moins qu'on ait la preuve d'un partage rapide à partir de la colonne d'eau et d'une absence de bioaccumulation ;
- ii) Si la concentration d'ions métalliques dissous au taux de charge moyen est supérieure ou égale à la  $CL(E)_{50}$ , le composé sera classé dans la catégorie de danger aigu II. Il sera également classé dans la catégorie de danger chronique II, à moins qu'on ait la preuve d'un partage rapide à partir de la colonne d'eau et d'une absence de bioaccumulation ;
- iii) Si la concentration d'ion métallique dissous au taux de charge élevé est supérieure ou égale à la  $CL(E)_{50}$ , le composé sera classé dans la catégorie de danger aigu III. Il sera également classé dans la catégorie de danger chronique III, à moins qu'on ait la preuve d'un partage rapide à partir de la colonne d'eau et d'une absence de bioaccumulation.

#### Essai de transformation de 28 jours

328. Si le processus décrit au paragraphe 327 aboutit à un classement dans la catégorie de danger chronique I, aucune évaluation supplémentaire n'est nécessaire, dans la mesure où le composé métallique sera classé indépendamment de toute information supplémentaire.

329. Dans tous les autres cas, des données supplémentaires peuvent avoir été obtenues à l'aide de l'essai de dissolution/transformation de 28 jours, en vue de montrer que le classement peut être modifié. Si, pour des composés peu solubles classés dans les catégories de danger chronique II, III ou IV, la concentration d'ions métalliques dissous au faible taux de charge, après une période totale de 28 jours, est inférieure ou égale à la CSEO à long terme, ce classement peut être supprimé.

#### 7.5.4 Dimension et surface spécifique des particules

330. La dimension ou, a fortiori, la surface spécifique des particules constitue un paramètre crucial, dans la mesure où toute variation de la taille ou de la surface spécifique des particules testées peut provoquer une modification importante des quantités d'ions métalliques libérées dans un intervalle de temps donné. Cette dimension ou surface spécifique des particules est donc fixée pour l'essai de transformation, ce qui permet aux classements comparatifs de reposer uniquement sur le taux de charge. Normalement, les données de classification produites auront utilisé la plus petite dimension de particule commercialisée pour déterminer l'ampleur de la transformation. Il peut exister des cas où les données obtenues pour une poudre métallique particulière ne sont pas considérées comme appropriées pour la classification des formes massives. Par exemple, lorsqu'il peut être démontré que la poudre testée est structurellement un matériau différent (présentant par exemple une structure cristallographique différente) et/ou lorsqu'elle a été produite par un procédé spécial et ne peut être obtenue à partir du métal massif, la classification du métal massif peut s'appuyer sur l'essai d'une dimension ou d'une surface spécifique de particule plus représentative, si l'on dispose de telles données. La poudre peut être classée séparément sur la base des données obtenues pour elle. Cependant, dans des circonstances normales, il n'est pas prévu que plus de deux propositions de classement soient formulées pour le même métal.

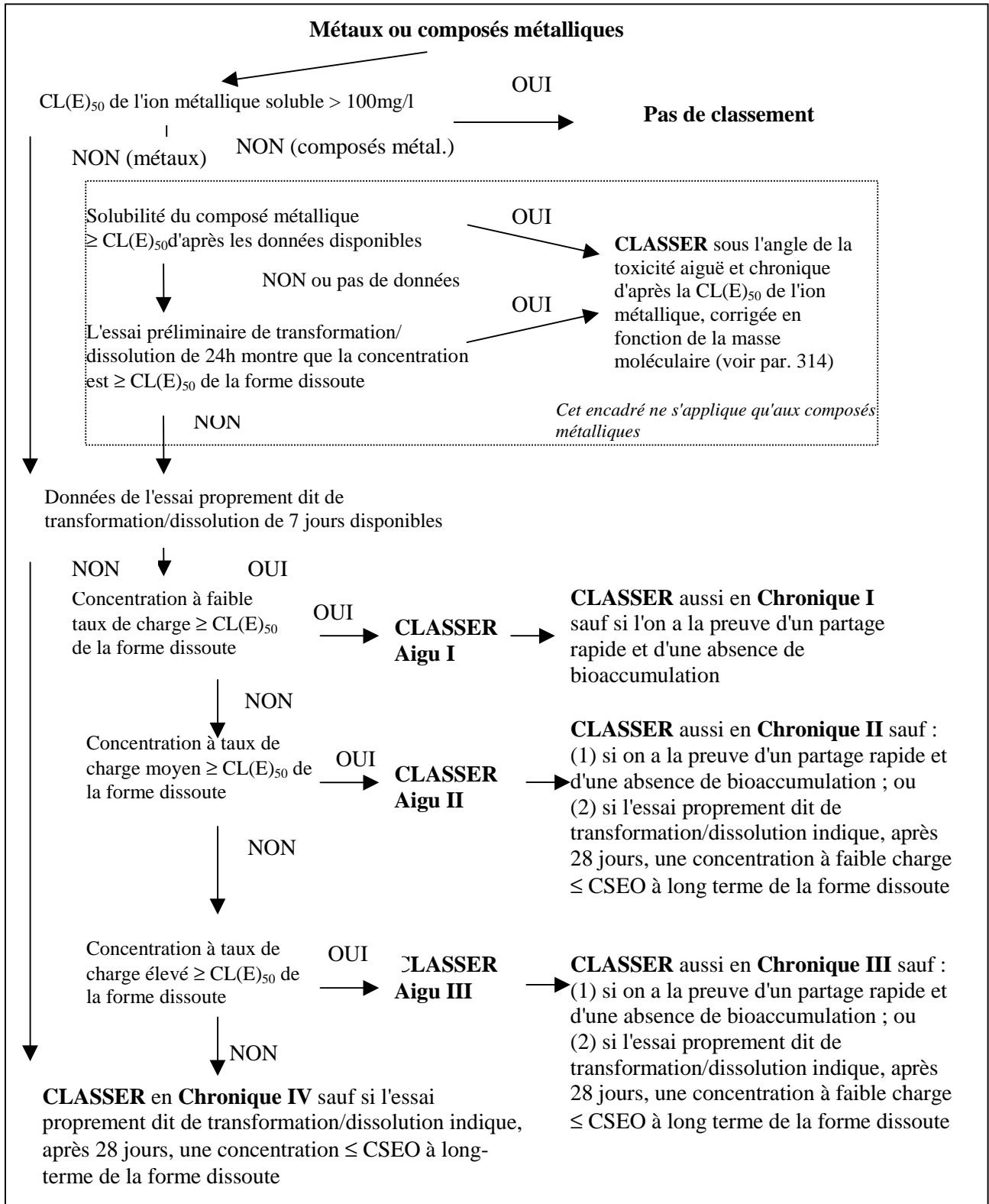
331. Les métaux présentant une dimension de particule inférieure au diamètre par défaut de 1 mm peuvent être testés au cas par cas. On peut citer l'exemple de poudres métalliques produites selon une technique de production différente, ou de poudres donnant lieu à une vitesse de dissolution (ou de réaction) plus élevée que la forme massive, ce qui conduit à un classement plus sévère.

332. Les dimensions de particule testées dépendent de la substance évaluée et sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Type	Dimension de particule	Commentaires
Composés métalliques	Plus petite dimension représentative commercialisée	Jamais supérieure à 1 mm
Poudres métalliques	Plus petite dimension représentative commercialisée	Il peut être nécessaire de prendre en compte différentes sources si les poudres présentent des propriétés cristallographiques/ morphologiques différentes.
Métaux massifs	1 mm	La valeur par défaut peut être modifiée en cas de justification suffisante.

333. Pour certaines formes de métaux, il peut être possible, en utilisant le Protocole de transformation/dissolution (OCDE, 2001), d'obtenir une corrélation entre la concentration de l'ion métallique après un intervalle de temps spécifié et les charges superficielles des formes testées. Dans de tels cas, il pourrait alors être possible d'estimer la concentration d'ions métalliques dissous pour le métal avec différentes particules, en employant une approche reposant sur la surface spécifique critique proposée par Skeaff *et. al.* (2000). C'est à dire qu'à partir de cette corrélation et d'une relation avec les données de toxicité appropriées, il est sans doute possible de déterminer une surface spécifique critique de la substance qui fournit la CL(E)<sub>50</sub> au milieu, puis de convertir cette surface spécifique pour les charges massiques faible, moyenne ou élevée utilisées dans l'identification des dangers. Si cette approche n'est pas utilisée normalement pour la classification, elle peut apporter des informations utiles pour l'étiquetage et les décisions en aval.

**FIGURE 1: Stratégie de classification des métaux et composés métalliques**



**ANNEXE 7.I**

**RÉFÉRENCES**

Brown, D.S. et Allison, J.D. (1987). MINTEQA1 Equilibrium Metal Speciation Model: A user's manual. Athens, Georgia, USEPA Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development.

OCDE (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, <http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>

OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures.

OCDE (2001). Guidance Document on Transformation/Dissolution of Metals and Metals Compounds in Aqueous Media.

Santore, R.C. et Driscoll, C.T. (1995). The CHESS Model for Calculating Chemical Equilibria in Soils and Solutions, Chemical Equilibrium and Reaction Models. The Soil Society of America, American Society of Agronomy.

Santore, R.C. et Di Toro, D.M. *et al* (1999). A biotic ligand model of the acute toxicity of metals. II. Application to fish and daphnia exposure to copper. Environ. Tox. Chem. Submitted.

Skeaff, J., Delbeke, K., Van Assche, F. et Conard, B. (2000) A critical surface area concept for acute hazard classification of relatively insoluble metal-containing powders in aquatic environments. Environ. Tox. Chem. 19:1681-1691.

Tipping, E. (1994). WHAM – A computer equilibrium model and computer code for waters, sediments, and soils incorporating discrete site/electrostatic model of ion-binding by humic substances. Computers and Geoscience 20 (6): 073-1023.



## APPENDICE

<b>SYSTÈME HARMONISÉ DE CLASSIFICATION DES SUBSTANCES CHIMIQUES DANGEREUSES POUR L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE</b>
--

**OBJECTIF, FONDEMENT ET APPLICABILITÉ**

1. Le système harmonisé de classification des substances chimiques en fonction des dangers qu'elles représentent pour l'environnement aquatique repose sur la prise en compte des systèmes existants énumérés ci-après. Par "environnement aquatique", on peut entendre les organismes aquatiques qui vivent dans l'eau et l'écosystème dont ils font partie. Dans ce contexte, la proposition ne concerne pas les polluants aquatiques dont il pourrait être nécessaire de considérer les effets au-delà de l'environnement aquatique, par exemple sur la santé humaine, etc. L'identification des dangers repose donc sur la toxicité de la substance pour l'environnement aquatique, même si celle-ci peut être modifiée par d'autres informations sur le comportement en matière de dégradation et de bioaccumulation.

2. Le système proposé concerne expressément les substances chimiques et n'est pas conçu, à ce stade, pour couvrir les préparations ou d'autres mélanges tels que les pesticides du commerce. Son application aux mélanges est renvoyée au groupe de travail de l'OCDE sur les critères de classification pour les mélanges. Bien que le schéma soit destiné à s'appliquer à toutes les substances, il est reconnu que, pour certaines substances, telles que les métaux, les substances peu solubles, etc., des directives particulières seront nécessaires. Un document d'orientation sera donc préparé pour couvrir des questions telles que l'interprétation des données et l'application des critères définis ci-après à de tels groupes de substances. Compte tenu de la complexité de ce point final et de l'étendue du domaine d'application du système, ce document d'orientation est considéré comme un élément important dans le fonctionnement du schéma harmonisé.

3. Les systèmes de classification actuellement en usage ont été pris en compte, notamment le système européen applicable à l'approvisionnement et à l'utilisation des produits chimiques, la procédure révisée d'évaluation des risques du GESAMP, le dispositif de l'OMI applicable aux polluants marins, le Schéma européen de transport routier et ferroviaire (RID/ADR), les systèmes canadien et américain de classification des pesticides et le *Land Transport Scheme* des Etats-Unis. Le schéma harmonisé est considéré comme s'appliquant de manière appropriée aux marchandises emballées, dans le cadre aussi bien de l'approvisionnement et de l'utilisation que des systèmes de transport multimodaux, et certains de ses éléments peuvent être utilisés pour le transport en vrac terrestre et maritime, aux termes de l'annexe II de la convention MARPOL 73/78, dans la mesure où celle-ci fait appel à la toxicité aquatique.

**DÉFINITIONS ET DONNÉES REQUISES**

4. Les éléments de base devant être utilisés dans le système harmonisé sont :

- la toxicité aquatique aiguë ;
- le potentiel de bioaccumulation ou la bioaccumulation réelle ;
- la dégradabilité (biotique ou abiotique) dans le cas des produits chimiques organiques ; et
- la toxicité aquatique chronique.

5. La préférence sera accordée aux données obtenues à l'aide de méthodes d'essai harmonisées au plan international, mais les données provenant de méthodes d'essai nationales pourront aussi être utilisées lorsqu'elles seront considérées comme équivalentes. D'une manière générale, il a été convenu que les données relatives à la toxicité pour les espèces d'eau douce et les espèces d'eau de mer pouvaient être considérées comme équivalentes, et devaient être obtenues de préférence en utilisant les lignes directrices

de l'OCDE ou des règles équivalentes, pour autant que les principes de BPL soient respectés. Lorsqu'on ne dispose pas de telles données, le classement sera établi en fonction des meilleures données disponibles.

### **Toxicité aiguë**

6. La toxicité aquatique aiguë est normalement déterminée à partir d'une CL<sub>50</sub> à 96 h pour les poissons (ligne directrice 203 de l'OCDE ou équivalent), d'une CE<sub>50</sub> à 48 h pour une espèce de crustacé (Ligne directrice 202 de l'OCDE ou équivalent) et/ou d'une CE<sub>50</sub> à 72 ou 96 h pour une espèce d'algue (Ligne directrice 201 de l'OCDE ou équivalent). Ces espèces sont considérées comme représentatives de l'ensemble des organismes aquatiques, et des données relatives à d'autres espèces telles que *Lemna* peuvent aussi être prises en compte si la méthodologie d'essai s'y prête.

### **Potentiel de bioaccumulation**

7. Le potentiel de bioaccumulation doit normalement être déterminé à partir du coefficient de partage octanol-eau, qui se présente généralement sous la forme du log K<sub>oc</sub> déterminé conformément à la Ligne directrice 107 ou 117 de l'OCDE. Bien que cette valeur représente le potentiel d'accumulation de la substance dans les milieux biologiques, le facteur de bioconcentration (FBC) déterminé expérimentalement fournit une meilleure mesure et doit être utilisé en priorité lorsqu'il est disponible. Il convient de déterminer le FBC conformément à la Ligne directrice 305 de l'OCDE.

### **Dégradabilité rapide**

8. La dégradation dans l'environnement peut être biotique ou abiotique (par exemple, par hydrolyse) et les critères utilisés doivent en être l'illustration (annexe 1). Le plus simple pour définir la biodégradation facile est d'utiliser la Ligne directrice 301 (A-F) de l'OCDE. L'obtention d'un niveau de seuil dans ces essais peut être considérée comme indiquant une dégradation rapide dans la plupart des environnements. Etant donné que ces essais sont effectués en eau douce, il est aussi tenu compte des résultats des essais effectués conformément à la Ligne directrice 306 de l'OCDE, mieux adaptée aux milieux marins. En l'absence de telles données, un rapport DBO(à 5 jours)/DCO > 0.5 est considéré comme indiquant une dégradation rapide.

9. La dégradation abiotique telle que l'hydrolyse, la dégradation primaire tant biotique qu'abiotique, la dégradation en milieu non aquatique et la dégradation rapide avérée dans l'environnement peuvent toutes être considérées comme répondant à la notion de dégradabilité rapide. Des indications particulières sur l'interprétation des données sont fournies dans le document d'orientation.

### **Toxicité chronique**

10. Les données de toxicité chronique sont plus difficiles à obtenir que les données de toxicité aiguë, et l'éventail des protocoles d'essai est moins normalisé. Les données obtenues conformément aux lignes directrices 210 (Poisson, Essai de toxicité aux premiers stades de la vie), 202 (partie 2) ou 211 (Reproduction des daphnies) et 201 (Algues, Essai d'inhibition de la croissance) de l'OCDE peuvent être acceptées. D'autres essais validés et internationalement acceptés peuvent aussi être utilisés. Il convient d'utiliser les CSEO ou d'autres CL(E)<sub>x</sub> équivalentes.

## **CATÉGORIES ET CRITÈRES DE CLASSIFICATION**

11. Les substances répondant aux critères suivants seront classées comme "dangereuses pour l'environnement aquatique". Ces critères décrivent en détail les catégories de classification détaillées sous forme de diagramme dans l'annexe 2 à l'appendice.

**Toxicité aiguë****Catégorie : danger aigu I**

Toxicité aiguë :

CL<sub>50</sub> à 96 h (pour les poissons) ≤ 1 mg/L et/ouCE<sub>50</sub> à 48 h (pour les crustacés) ≤ 1 mg/L et/ouCEr<sub>50</sub> à 72 ou 96 h (pour les algues et autres végétaux aquatiques) ≤ 1 mg/L.

La catégorie danger aigu I peut être subdivisée pour certains systèmes réglementaires de manière à intégrer une plage inférieure correspondant à CL(E)<sub>50</sub> ≤ 0,1 mg/l.

**Catégorie : danger aigu II**

Toxicité aiguë :

CL<sub>50</sub> à 96 h (pour les poissons) 1 < - ≤ 10 mg/L et/ouCE<sub>50</sub> à 48 h (pour les crustacés) 1 < - ≤ 10 mg/L et/ouCEr<sub>50</sub> à 72 ou 96 h (pour les algues et autres végétaux aquatiques) 1 < - ≤ 10 mg/L.**Catégorie : danger aigu III**

Toxicité aiguë :

CL<sub>50</sub> à 96 h (pour les poisson) 10 < - ≤ 100 mg/L et/ouCE<sub>50</sub> à 48 h (pour les crustacé) 10 < - ≤ 100 mg/L et/ouCEr<sub>50</sub> à 72 ou 96 h (pour les algues et autres végétaux aquatiques) 10 < - ≤ 100 mg/L.

Certains systèmes réglementaires peuvent prévoir une extension de la plage de CL(E)<sub>50</sub> au-delà de 100 mg/L en introduisant une autre catégorie.

**Toxicité chronique****Catégorie : danger chronique I**

Toxicité aiguë :

CL<sub>50</sub> à 96 h (pour les poissons) ≤ 1 mg/L et/ouCE<sub>50</sub> à 48 h (pour les crustacés) ≤ 1 mg/L et/ouCEr<sub>50</sub> à 72 ou 96 h (pour les algues et autres végétaux aquatiques) ≤ 1 mg/L

et la substance n'est pas rapidement dégradable et/ou le log K<sub>oe</sub> est ≥ 4 (à moins que le FBC déterminé expérimentalement ne soit < 500).

**Catégorie : danger chronique II**

Toxicité aiguë

CL<sub>50</sub> à 96 h (pour les poissons) 1 < - ≤ 10 mg/L et/ouCE<sub>50</sub> à 48 h (pour les crustacés) 1 < - ≤ 10 mg/L et/ouCEr<sub>50</sub> à 72 ou 96 h (pour les algues et autres végétaux aquatiques) 1 < - ≤ 10 mg/L

et la substance n'est pas rapidement dégradable et/ou le log K<sub>oe</sub> est ≥ 4 (à moins que le FBC déterminé expérimentalement ne soit < 500), sauf si la CSEO pour la toxicité chronique est > 1 mg/L.

**Catégorie : danger chronique III**

Toxicité aiguë :

CL<sub>50</sub> à 96 h (pour les poissons) 10 < - ≤ 100 mg/L et/ouCE<sub>50</sub> à 48 h (pour les crustacés) 10 < - ≤ 100 mg/L et/ouCer<sub>50</sub> à 72 ou 96 h (pour les algues et autres végétaux aquatiques) 10 < - ≤ 100 mg/L

et la substance n'est pas rapidement dégradable et/ou le log K<sub>oe</sub> est ≥ 4 (à moins que le FBC déterminé expérimentalement ne soit < 500), sauf si la CSEO pour la toxicité chronique est > 1 mg/L.

**Catégorie : danger chronique IV**

Les substances peu solubles pour lesquelles on n'enregistre aucune toxicité aiguë jusqu'au niveau de la solubilité dans l'eau, qui ne sont pas rapidement dégradables et qui présentent une valeur de log K<sub>oe</sub> ≥ 4, indiquant un potentiel de bioaccumulation, seront classées dans cette catégorie, à moins qu'il existe une autre preuve scientifique de l'inutilité de ce classement. Cette preuve pourrait être notamment un FBC déterminé expérimentalement comme < 500, une CSEO pour la toxicité chronique > 1 mg/L ou la mise en évidence d'une dégradation rapide dans l'environnement.

**JUSTIFICATION DU SYSTÈME**

12. Le système de classification tient compte du fait que le danger intrinsèque essentiel pour les organismes aquatiques est représenté à la fois par la toxicité aiguë et par la toxicité chronique d'une substance, l'importance relative de ces termes étant déterminée par le système réglementaire spécifique en vigueur. Il est possible d'opérer une distinction entre danger aigu et danger chronique, et donc de définir des catégories de danger séparées pour ces deux propriétés, qui représentent une gradation du niveau de danger identifié. On utilisera normalement la plus faible des valeurs de toxicité disponibles pour définir la ou les classes de danger appropriées. Dans certaines circonstances, cependant, il est possible d'appliquer une démarche fondée sur le "poids de la preuve". Les données de toxicité aiguë sont les plus facilement disponibles et les essais utilisés pour les obtenir sont les plus normalisés. C'est pourquoi ces données forment la clé de voûte du système de classification.

13. La toxicité aiguë est un paramètre fondamental pour la définition des dangers lorsque le transport de grandes quantités d'une substance peut comporter des dangers à court terme d'accident ou de déversement important. Il est donc défini des catégories de danger correspondant à des valeurs de la CL(E)<sub>50</sub> allant jusqu'à 100 mg/l, voire 1000 mg/L dans certains cadres réglementaires. La catégorie de danger aigu I peut être encore subdivisée de manière à intégrer une catégorie supplémentaire de toxicité aiguë correspondant à CL(E)<sub>50</sub> ≤ 0.1 mg/L dans certains systèmes réglementaires tels que celui défini dans l'annexe II de la Convention MARPOL 73/78. En principe, son utilisation est restreinte aux systèmes réglementaires s'appliquant au transport en vrac.

14. Pour les substances emballées, on considère que le principal danger vient de la toxicité chronique, encore qu'une toxicité aiguë correspondant à des niveaux de la CL(E)<sub>50</sub> ≤ 1 mg/L soit aussi jugée dangereuse. Des concentrations de substances pouvant aller jusqu'à 1 mg/L dans des conditions normales d'utilisation ou de rejet sont considérées comme normales. Au-dessus de ce niveau de toxicité, on considère que la toxicité à court terme ne renseigne pas sur le danger principal, qui est dû à de faibles concentrations agissant à plus longue échéance. Un certain nombre de catégories de danger sont ainsi définies sur la base des niveaux de toxicité aquatique chronique. Les données de toxicité chronique ne sont cependant disponibles que pour un petit nombre de substances, et il est donc nécessaire de se fonder sur les données disponibles concernant la toxicité aiguë pour évaluer la toxicité chronique. Les propriétés intrinsèques que sont une absence de biodégradabilité rapide et/ou un potentiel de bioconcentration peuvent être utilisées en association avec la toxicité aiguë pour classer une substance dans une catégorie de danger chronique. Lorsque

les données de toxicité chronique correspondent à une CSEO > 1 mg/L, la substance n'a pas à être classée dans une catégorie de danger chronique. De même, pour les substances présentant une CL(E)<sub>50</sub> >100 mg/L, la toxicité est considérée comme insuffisante pour justifier un classement dans la plupart des systèmes réglementaires.

15. Si le système actuel continue de se fonder sur l'utilisation de données de toxicité aiguë, combinées à une absence de dégradation rapide et/ou à un potentiel de bioaccumulation, pour justifier le classement d'une substance dans une catégorie de danger chronique, on admet qu'il est préférable, pour un tel classement, de s'appuyer sur des données de toxicité chronique réelles lorsque celles-ci sont disponibles. On envisage donc de développer encore le système de classification afin qu'il intègre ces données. Les données de toxicité chronique disponibles seraient alors utilisées de préférence aux éléments combinant la toxicité aiguë à une absence de dégradation rapide et/ou un potentiel de bioaccumulation pour classer les substances dans une catégorie de danger chronique.

16. Le système tient compte des objectifs en matière de classification définis à l'annexe II de la convention MARPOL 73/78 couvrant le transport maritime de vrac en citerne, qui visent à réglementer les rejets des navires en exploitation et à définir les types de navire appropriés. Ces objectifs vont au-delà de la protection des écosystèmes aquatiques, qu'ils incluent toutefois clairement. Il est ainsi possible d'utiliser des catégories de danger supplémentaires, prenant en compte des facteurs tels que les propriétés physico-chimiques et la toxicité pour les mammifères.

## NOTES EXPLICATIVES

17. Les poissons, crustacés et algues utilisés pour les essais appartiennent à des espèces représentatives d'une gamme de niveaux trophiques et de taxons, et les méthodes d'essai sont hautement normalisées. Cependant, on peut aussi prendre en compte des données portant sur d'autres organismes, à condition qu'elles représentent des espèces et des points finaux d'essai équivalents. L'essai d'inhibition de la croissance algale est un essai de toxicité chronique, alors que la CE<sub>50</sub> est traitée comme une valeur de toxicité aiguë aux fins de la classification. Cette CE<sub>50</sub> devrait normalement être déterminée d'après l'inhibition de la vitesse de croissance. Si la seule valeur disponible est la CE<sub>50</sub> déterminée d'après la réduction de la biomasse, ou si l'origine de la CE<sub>50</sub> mentionnée n'est pas précisée, cette valeur peut être utilisée de la même façon.

18. L'essai de toxicité aquatique implique par nature la dissolution de la substance testée dans le milieu aqueux utilisé et le maintien d'une concentration d'exposition biodisponible stable pendant la durée de l'essai. Certaines substances sont difficiles à tester dans le cadre des protocoles normalisés et des règles particulières seront donc élaborées pour l'interprétation des données concernant ces substances et pour l'utilisation de ces données lors de l'application des critères de classification.

19. C'est la bioaccumulation des substances au sein des organismes aquatiques qui donne lieu à des effets toxiques à longue échéance, même lorsque les concentrations réelles dans l'eau sont faibles. Le potentiel de bioaccumulation est déterminé par le partage entre le *n*-octanol et l'eau. La relation entre le coefficient de partage d'une substance organique et sa bioconcentration, telle que mesurée par le FBC chez le poisson, est abondamment commentée dans la littérature scientifique. L'emploi d'une valeur de seuil de log P(o/e) ≥ 4 doit permettre d'identifier les substances possédant un véritable potentiel de bioconcentration. Sachant que le log P(o/e) n'est qu'un substitut imparfait du FBC mesuré, c'est cette dernière valeur qui devra toujours prévaloir. Pour les poissons, un FBC < 500 indique un faible niveau de bioconcentration.

20. Les substances qui se dégradent rapidement sont éliminées en peu de temps de l'environnement. Bien que des effets puissent s'exercer, notamment en cas de déversement ou d'accident, ils seront localisés et de courte durée. L'absence de dégradation rapide dans l'environnement peut signifier qu'une substance

présente dans l'eau peut exercer sa toxicité sur une vaste échelle temporelle et spatiale. L'une des façons de démontrer une dégradation rapide consiste à réaliser un essai préliminaire de biodégradation, conçu pour déterminer si une substance est "facilement biodégradable". Ainsi, une substance qui obtient un résultat positif à cet essai de "screening" est une substance susceptible de se dégrader "rapidement" dans l'environnement aquatique, et qui a donc peu de chances d'être persistante. Toutefois, un échec à l'essai de "screening" ne signifie pas nécessairement que la substance ne se dégradera pas rapidement dans l'environnement. Aussi a-t-on ajouté un critère supplémentaire, permettant d'utiliser des données pour montrer que la substance subit effectivement une dégradation biotique ou abiotique dans l'environnement aquatique, à plus de 70 % en l'espace de 28 jours. De la sorte, si la dégradation peut être démontrée dans des conditions d'environnement réalistes, la substance satisfait à la définition de la "dégradabilité rapide". De nombreuses données de dégradation sont disponibles sous la forme de demi-vies de dégradation et peuvent aussi être utilisées pour définir la dégradation rapide. Des précisions concernant l'interprétation de ces données seront fournies de manière plus complète dans le document d'orientation. Certains essais permettent de mesurer la biodégradation ultime des substances, c'est-à-dire l'obtention de la minéralisation totale. La biodégradation primaire n'entre normalement pas en ligne de compte dans l'évaluation de la dégradabilité rapide, à moins qu'il puisse être démontré que les produits de dégradation ne remplissent pas les critères de classification comme substances dangereuses pour l'environnement aquatique.

21. Il faut tenir compte du fait que la dégradation dans l'environnement peut être biotique ou abiotique (par exemple, par hydrolyse), et les critères utilisés reflètent cet aspect. De même, si une substance ne répond pas aux critères de biodégradabilité facile des essais de l'OCDE, cela ne signifie pas qu'elle ne se dégradera pas rapidement dans l'environnement réel. Ainsi, lorsqu'une telle dégradation rapide peut être mise en évidence, la substance doit être considérée comme rapidement dégradable. L'hydrolyse peut être prise en compte si les produits qui en découlent ne peuvent pas être considérés comme dangereux pour l'environnement aquatique. On trouvera à l'annexe I une définition spécifique de la dégradabilité rapide. D'autres preuves de la dégradation rapide dans l'environnement peuvent aussi être prises en considération et revêtir une importance particulière lorsque les substances exercent un effet inhibiteur sur l'activité microbienne aux niveaux de concentration utilisés dans les essais normalisés. Le document d'orientation présentera l'éventail des données disponibles et donnera des conseils pour leur interprétation.

22. Dans le cas des composés inorganiques et des métaux, la notion de dégradabilité tel qu'elle s'applique aux substances organiques, n'a guère de sens, sinon aucun. Plus exactement, la substance peut être transformée par des processus environnementaux normaux, de sorte que la biodisponibilité des espèces toxiques augmente ou diminue. De même, les données de bioaccumulation doivent être utilisées avec précaution. Des orientations spécifiques seront formulées sur la façon d'utiliser les données relatives à de tels matériaux pour répondre aux exigences des critères de classification.

23. Les composés inorganiques et les métaux peu solubles peuvent présenter une toxicité aiguë ou chronique dans l'environnement aquatique, selon la toxicité intrinsèque des espèces inorganiques biodisponibles et selon le taux de charge et la quantité de ces espèces pouvant passer en solution. Un protocole pour l'essai de ces matières peu solubles est en cours d'élaboration et sera examiné plus en détail dans le document d'orientation qui leur sera spécialement consacré.

24. Le système introduit également un classement de type "filet de sécurité" (catégorie : danger chronique IV), applicable lorsque les données disponibles ne permettent pas une classification selon les critères formels, mais qu'il existe néanmoins des motifs d'inquiétude. Les critères précis de classification dans cette catégorie ne sont pas définis, à une exception près. Pour les substances organiques faiblement hydrosolubles pour lesquelles aucune toxicité n'a été démontrée, ce classement peut intervenir si la substance n'est pas rapidement dégradée et possède un potentiel de bioconcentration. Pour ces substances peu solubles, on considère que la toxicité peut n'avoir pas été évaluée convenablement dans l'essai à court terme, en raison des faibles niveaux d'exposition et de l'absorption potentiellement lente dans l'organisme. Ce classement

peut être rendu caduc par la démonstration d'une absence d'effets à long terme, c'est-à-dire d'une CSEO à long terme supérieure à la solubilité dans l'eau ou à 1 mg/L, ou encore d'une dégradation rapide dans l'environnement.

25. Les données d'essai obtenues expérimentalement sont préférables, mais s'il n'en existe pas, il est possible de faire appel, dans le processus de classification, à des relations quantitatives structure-activité (QSAR) validées pour la toxicité aiguë et le log  $K_{oe}$ . Ces QSAR validées peuvent être utilisées sans modification des critères convenus, si elles se limitent à des produits chimiques pour lesquels leur mode d'action et leur applicabilité sont bien caractérisés. Leur validité peut être jugée d'après les critères définis dans le cadre du projet de collaboration USEPA/UE/Japon. Des valeurs calculées et fiables de la toxicité et du log  $K_{oe}$  devraient être utiles dans le contexte du classement "filet de sécurité". Les QSAR servant à prédire la biodégradation facile ne sont pas encore assez précises pour prévoir la dégradation rapide.

## **ANNEXE 1 à l'appendice 2**

### **DÉGRADABILITÉ RAPIDE**

Une substance est considérée comme rapidement dégradable dans l'environnement si les critères suivants sont vérifiés :

a) si, lors d'études de biodégradation facile sur 28 jours, on obtient les taux de dégradation suivants :

- essais de dosage du carbone organique dissous : 70 %
- essais de déperdition d'oxygène ou de production de dioxyde de carbone : 60 % des valeurs maximales théoriques.

Ces niveaux doivent être atteints dans les 10 jours suivant le début de la dégradation, c'est-à-dire le moment où 10 % de la substance a été dégradée.

ou

b) si, lorsqu'on dispose seulement de données sur la DBO et la DCO, le rapport  $BDO_5/DCO$  est  $\geq 0.5$

ou

c) si l'on dispose d'autres éléments scientifiques convaincants montrant que la substance peut être dégradée (de façon biotique et/ou abiotique) dans l'environnement aquatique, à plus de 70 % en l'espace de 28 jours.



