

II

(Actes non législatifs)

RÈGLEMENTS

RÈGLEMENT (UE) 2016/266 DE LA COMMISSION

du 7 décembre 2015

modifiant, aux fins de son adaptation au progrès technique, le règlement (CE) n° 440/2008 établissant des méthodes d'essai conformément au règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH)

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne,

vu le règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission ⁽¹⁾, et notamment son article 13, paragraphe 2,

considérant ce qui suit:

- (1) Le règlement (CE) n° 440/2008 de la Commission ⁽²⁾ définit les méthodes d'essai à appliquer pour déterminer les propriétés physicochimiques ainsi que la toxicité et l'écotoxicité des substances chimiques, aux fins du règlement (CE) n° 1907/2006.
- (2) Il est nécessaire de mettre à jour le règlement (CE) n° 440/2008 pour y inclure les méthodes d'essai nouvelles et actualisées qui ont été adoptées récemment par l'OCDE afin de tenir compte du progrès technique et de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales, conformément à la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil ⁽³⁾. Les parties concernées ont été consultées sur le présent projet.
- (3) Cette adaptation contient vingt méthodes d'essai: une nouvelle méthode de détermination d'une propriété physicochimique, onze méthodes d'essai nouvelles et trois méthodes d'essai actualisées pour l'évaluation de l'écotoxicité, ainsi que cinq nouvelles méthodes d'essai destinées à analyser le devenir et le comportement dans l'environnement.
- (4) Il convient dès lors de modifier le règlement (CE) n° 440/2008 en conséquence.
- (5) Les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité institué par l'article 133 du règlement (CE) n° 1907/2006,

⁽¹⁾ JO L 396 du 30.12.2006, p. 1.

⁽²⁾ Règlement (CE) n° 440/2008 de la Commission du 30 mai 2008 établissant des méthodologies d'essai conformément au règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH) (JO L 142 du 31.5.2008, p. 1).

⁽³⁾ Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (JO L 276 du 20.10.2010, p. 33).

A ADOPTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

L'annexe du règlement (CE) n° 440/2008 est modifiée conformément à l'annexe du présent règlement.

Article 2

Le présent règlement entre en vigueur le troisième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 7 décembre 2015

Par la Commission
Le président
Jean-Claude JUNKER

ANNEXE

L'annexe du règlement (CE) n° 440/2008 est modifiée comme suit:

- (1) Une note est insérée au début de l'annexe, avant la partie 1:

«Note:

avant d'utiliser une des méthodes d'essai décrites ci-après pour tester une substance multiconstituants (MCS), une substance de composition inconnue ou variable, un produit de réaction complexe ou une matière biologique (UVCB), ou un mélange, et lorsque l'applicabilité de la méthode d'essai n'a pas été clairement établie pour les MCS, les UVCB ou les mélanges, il convient de se demander si la méthode est appropriée aux fins réglementaires prévues.

Si la méthode d'essai est utilisée pour tester une MCS, une UVCB ou un mélange, il y a lieu de mettre à disposition, dans la mesure du possible, suffisamment d'informations sur la composition, notamment en indiquant la nature chimique des constituants, leurs proportions et leurs propriétés pertinentes.»

- (2) Le chapitre A.24 suivant est ajouté:

«A.24. COEFFICIENT DE PARTAGE (N-OCTANOL/EAU), MÉTHODE HPLC (CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE)

INTRODUCTION

La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 117 (2004) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

1. Le coefficient de partage (P) est le rapport des concentrations d'équilibre d'une substance dissoute dans un système à deux phases composé de deux solvants largement non miscibles. Dans le cas du n-octanol et de l'eau:

$$P_{oe} = \frac{C_n - \text{octanol}}{C_{\text{eau}}}$$

Étant le quotient de deux concentrations, le coefficient de partage est sans dimension et il est généralement donné sous la forme de son logarithme en base dix.

2. P_{oe} est un paramètre clé des études du devenir des substances chimiques dans l'environnement. On a mis en évidence l'existence d'une relation hautement significative entre le P_{oe} de substances sous forme non ionisées et leur bio-accumulation dans les poissons. De même, il a été démontré que le P_{oe} était un paramètre utile pour prédire l'adsorption sur les sols et sédiments, mais aussi pour établir une relation structure-activité quantitative pour un large éventail d'effets biologiques.
3. La proposition originale de la présente méthode d'essai est basée sur un article de C.V. Eadsforth et P. Moser (1). L'élaboration de la méthode d'essai et la conduite d'un essai comparatif inter-laboratoires à l'échelle de l'OCDE ont été coordonnées par le Umweltbundesamt de la République fédérale d'Allemagne au cours de l'année 1986 (2).

CONSIDÉRATIONS INITIALES

4. La méthode par agitation en flacon (Shake-Flask) permet de déterminer de manière expérimentale les valeurs $\log P_{oe}$ dans la plage - 2 à 4 (et à l'occasion jusqu'à 5 et plus) ⁽¹⁾ (Chapitre A.8 de la présente annexe, ligne directrice 107 de l'OCDE). La méthode HPLC couvre le $\log P_{oe}$ dans la plage de 0 à 6 (1)(2)(3)(4)(5). Le cas échéant, cette méthode peut nécessiter une estimation de P_{oe} de façon à attribuer des substances de référence appropriées, mais aussi appuyer les conclusions éventuellement tirées des résultats de cet essai. Les méthodes de calcul sont succinctement abordées dans l'appendice de la présente méthode d'essai. Le mode opératoire HPLC est isocratique.
5. Les valeurs de P_{oe} dépendant des conditions environnementales (température, pH, force ionique, etc.), il convient de définir ces dernières dans l'expérience pour que les résultats P_{oe} soient ensuite correctement interprétés. Pour les substances ionisables, une autre méthode (par exemple, celle décrite dans le projet de ligne directrice de l'OCDE relative à une méthode pHmétrique pour les substances ionisables) pourrait devenir disponible et être utilisée en remplacement (6). Cela étant, si ce projet de ligne directrice de l'OCDE peut convenir pour déterminer le P_{oe} des substances ionisables, il est néanmoins préférable de recourir dans certains cas à la méthode HPLC à un pH pertinent du point de vue de l'environnement (voir le paragraphe 9).

⁽¹⁾ L'application d'une limite supérieure est imposée par la nécessité de réaliser une phase de séparation complète après ajustements de l'équilibre de partition et avant prélèvement des échantillons pour détermination analytique. En apportant un soin particulier à l'opération, on peut porter la limite supérieure à des valeurs supérieures de P_{oe} .

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

6. La HPLC phase inverse est effectuée sur des colonnes analytiques remplies de phase silice (achetée dans le commerce) greffée avec de longues chaînes hydrocarbonées (C₈ ou C₁₈, par exemple).
7. Une substance chimique injectée sur une telle colonne se partage entre la phase mobile du solvant et la phase stationnaire hydrocarbonée, et elle est transportée le long de la colonne par la phase mobile. Les substances sont retenues en proportion de leur coefficient de partage hydrocarbone-eau, les substances hydrophiles étant éluées les premières et les substances lipophiles les dernières. Le temps de rétention est décrit par le facteur de capacité k, donné par l'expression suivante:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

où t_R est le temps de rétention de la substance d'essai, et t_0 le temps mort, c'est-à-dire le temps moyen nécessaire à une molécule du solvant pour passer la colonne. Aucune méthode analytique quantitative n'est requise et seule la détermination des temps de rétention est nécessaire.

8. Le coefficient de partage octanol/eau d'une substance d'essai peut être calculé de manière expérimentale, en déterminant tout d'abord son facteur de capacité k que l'on intègre ensuite dans l'équation suivante:

$$\log P_{oe} = a + b \times \log k$$

où

a, b = coefficients de régression linéaire.

L'équation ci-avant peut être obtenue par régression linéaire logarithmique des coefficients de partage octanol/eau des substances de référence par rapport au logarithme des facteurs de capacité de ces mêmes substances.

9. La méthode de la HPLC phase inverse permet d'estimer les coefficients de partage dans une plage de $\log P_{oe}$ allant de 0 à 6, mais cette plage peut être étendue (de 6 à 10) dans certains cas exceptionnels. Dans ces derniers cas, la phase mobile est modifiée (3). Cette méthode n'est pas applicable aux bases et acides forts, aux complexes métalliques, aux substances réagissant avec l'éluant, ou aux agents tensio-actifs. Des mesures peuvent être effectuées sur des substances ionisables sous leur forme non ionisée (acide ou base libre), mais uniquement en utilisant un tampon avec un pH inférieur au pK_a pour un acide libre, ou supérieur au pK_a pour une base libre. Il se peut que la méthode pHmétrique devienne disponible et elle pourrait aussi être utilisée en remplacement pour les substances ionisables (6). Si la valeur $\log P_{oe}$ est déterminée en vue d'une classification des dangers environnementaux ou d'une évaluation des risques pour l'environnement, l'essai doit être conduit dans la plage de pH pertinente pour l'environnement naturel, c'est-à-dire pour des pH de 5 à 9.
10. Dans certains cas, des impuretés peuvent compliquer l'interprétation des résultats, du fait des incertitudes dans l'affectation des pics. Pour les mélanges dont le résultat comporte une bande non résolue, les limites supérieure et inférieure de $\log P_{oe}$, ainsi que le pourcentage de surface de chaque pic de $\log P_{oe}$ doivent être indiqués. Pour les mélanges constitués d'un groupe d'homologues, la moyenne pondérée $\log P_{oe}$ doit également être précisée (7), et calculée sur la base des valeurs P_{oe} individuelles et des pourcentages de surface correspondants (8). Tous les pics contribuant à une surface de 5 pour cent ou plus de la surface totale de tous les pics doivent être pris en compte dans le calcul (9):

$$\text{moyenne pondérée } \log P_{oe} = \frac{\sum_i (\log P_{oei})(\text{surface})}{\text{surface totale des pics}} = \frac{\sum_i (\log P_{oei})(\text{surface}_i)}{\sum_i \text{surface}}$$

La moyenne pondérée $\log P_{oe}$ est valide uniquement pour les substances ou les mélanges ("tall-oils" par exemple) composés d'homologues (série d'alcane par exemple). Des mesures et résultats probants peuvent être obtenus avec les mélanges, à condition que le détecteur analytique utilisé ait la même sensibilité envers toutes les substances du mélange et qu'elles puissent être analysées de manière adéquate.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

11. La constante de dissociation, la formule structurale et la solubilité dans la phase mobile doivent être connues avant toute utilisation de la méthode. Par ailleurs, des informations sur l'hydrolyse seraient utiles.

CRITÈRES DE QUALITÉ

12. Pour accroître la confiance dans la mesure, des déterminations dupliquées doivent être effectuées.
- Répétabilité: la valeur de $\log P_{oe}$ dérivée de mesures répétées effectuées dans des conditions identiques, et en utilisant le même ensemble de substances de référence, doit être identique à $\pm 0,1$ unité logarithmiques près.
 - Reproductibilité: si les mesures sont répétées avec un autre ensemble de substances de référence, les résultats peuvent être différents. Généralement, le coefficient de corrélation R pour la relation entre $\log k$ et $\log P_{oe}$ pour un ensemble de substances d'essai est d'environ 0,9, ce qui correspond à des coefficients de partage octanol/eau de $\log P_{oe}$ identiques à $\pm 0,5$ unité logarithmiques près.
13. L'essai comparatif inter-laboratoires a montré que, avec la méthode HPLC, les valeurs $\log P_{oe}$ peuvent être obtenues à $\pm 0,5$ unité des valeurs de Shake-Flask (2). La littérature propose d'autres comparaisons (4)(5)(10)(11)(12). Ce sont les graphiques de corrélation basés sur des substances de référence structurellement proches qui produisent les résultats les plus précis (13).

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

14. Pour corréler le facteur de capacité mesuré k d'une substance avec son P_{oe} , il convient d'établir un graphique d'étalonnage utilisant au moins 6 points (voir le paragraphe 24). Il appartient à l'utilisateur de choisir les substances de référence appropriées. Normalement, celles-ci doivent avoir des valeurs $\log P_{oe}$ qui englobent le $\log P_{oe}$ de la substance d'essai. Autrement dit, au moins une substance de référence doit avoir un P_{oe} supérieur à celui de la substance d'essai, et une autre un P_{oe} inférieur à celui de la substance d'essai. L'extrapolation ne doit être utilisée que dans des cas exceptionnels. Il est préférable que ces substances de référence soient structurellement proches de la substance d'essai. Les valeurs $\log P_{oe}$ des substances de référence utilisées pour l'étalonnage doivent être basées sur des données expérimentales fiables. Toutefois, pour les substances avec un $\log P_{oe}$ élevé (normalement supérieur à 4), des valeurs calculées peuvent être utilisées, sauf s'il existe des données expérimentales disponibles fiables. Si des valeurs extrapolées sont utilisées, une valeur limite doit être précisée.
15. Des listes de valeurs $\log P_{oe}$ pour de nombreux groupes de substances chimiques sont disponibles (14)(15). Si aucune donnée n'est disponible sur les coefficients de partage de substances structurellement proches, un étalonnage plus général, établi avec d'autres substances de référence, peut être utilisé. Le Tableau 1 présente les substances de référence recommandées, avec leurs valeurs de P_{oe} . Pour les substances ionisables, les valeurs données s'appliquent à leur forme non ionisée. La plausibilité et la qualité de ces valeurs ont été contrôlées au cours de l'essai comparatif inter-laboratoires.

Tableau 1

Substances de référence recommandées

	Numéro CAS	Substances de référence	$\log P_{oe}$	pKa
1	78-93-3	2-Butanone (Méthyl éthyl cétone)	0,3	
2	1122-54-9	4-Acétylpyridine	0,5	
3	62-53-3	Aniline	0,9	
4	103-84-4	Acétanilide	1,0	
5	100-51-6	Alcool benzylique	1,1	
6	150-76-5	Éther monométhylique d'hydroquinone	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Acide phénoxyacétique	1,4	pKa = 3,12

	Numéro CAS	Substances de référence	log P _{oe}	pKa
8	108-95-2	Phénol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	Dinitro-2,4 phénol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benzonitrile	1,6	
11	140-29-4	Phényl acétonitrile	1,6	
12	589-18-4	Alcool méthyl-4 benzylique	1,6	
13	98-86-2	Acétophénone	1,7	
14	88-75-5	Nitro-2 phénol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	Acide 3-nitrobenzoïque	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	Chloro-4 aniline	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenzène	1,9	
18	104-54-1	alcool cinnamique	1,9	
19	65-85-0	Acide benzoïque	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	Crésol (para-)	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3	Acide cinnamique (trans)	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Anisole	2,1	
23	93-58-3	Benzoate de méthyle	2,1	
24	71-43-2	Benzène	2,1	
25	99-04-7	Acide toluïque (méta-)	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	Chlorophénol (para-)	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trichloroéthylène	2,4	
28	1912-24-9	Atrazine	2,6	
29	93-89-0	Benzoate d'éthyle	2,6	
30	1194-65-6	2,6-Dichlorobenzonitrile	2,6	
31	535-80-8	Acide chloro-3-benzoïque	2,7	pKa = 3,82

	Numéro CAS	Substances de référence	log P _{oe}	pKa
32	108-88-3	Toluène	2,7	
33	90-15-3	Naphthol-1	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-Dichloroaniline	2,8	
35	108-90-7	Chlorobenzène	2,8	
36	1746-13-0	Phénoxyate d'allyle	2,9	
37	108-86-1	Bromobenzène	3,0	
38	100-41-4	Éthylbenzène	3,2	
39	119-61-9	Benzophénone	3,2	
40	92-69-3	4-Phénylphénol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Thymol	3,3	
42	106-46-7	Dichloro-1,4 benzène	3,4	
43	122-39-4	Diphénylamine	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naphthalène	3,6	
45	93-99-2	Phényl benzoate	3,6	
46	98-82-8	Cumène	3,7	
47	88-06-2	Trichloro-2,4,6 phénol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Biphényle	4,0	
49	120-51-4	Benzoate de benzyle	4,0	
50	88-85-7	Dinosèbe	4,1	
51	120-82-1	Trichloro-1,2,4 benzène	4,2	
52	143-07-7	Acide dodécanoïque	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Éther diphénylique	4,2	
54	85-01-8	Phénanthrène	4,5	
55	104-51-8	Butylbenzène normal	4,6	

	Numéro CAS	Substances de référence	log P _{oc}	pKa
56	103-29-7	Dibenzyle	4,8	
57	3558-69-8	2,6-Diphénylpyridine	4,9	
58	206-44-0	Fluoranthène	5,1	
59	603-34-9	Triphénylamine	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Estimation préliminaire du coefficient de partage

16. Si besoin est, le coefficient de partage de la substance d'essai peut être estimé, de préférence par une méthode de calcul (voir l'appendice), ou le cas échéant, en utilisant le rapport de solubilité de la substance d'essai dans les solvants purs.

Appareillage

17. Un chromatographe en phase liquide équipé d'une pompe à basse impulsion et d'un système de détection approprié est nécessaire. Un détecteur UV, utilisant une longueur d'ondes de 210 nm, ou un détecteur RI conviennent pour une large gamme de groupes chimiques. La présence de groupes polaires dans la phase stationnaire peut gravement perturber les performances de la colonne HPLC. Par conséquent, il convient que les phases stationnaires comptent un pourcentage aussi réduit que possible de groupes polaires (16). Des ensembles phase inverse à microparticules ou des colonnes prêtes à l'emploi proposés dans le commerce peuvent être utilisés. Une colonne de garde peut être positionnée entre le système d'injection et la colonne analytique.

Phase mobile

18. On utilise du méthanol pour HPLC et de l'eau distillée ou dé-ionisée pour préparer le solvant d'élution, qui est ensuite dégazé avant utilisation. Il convient d'employer l'élution isocratique. Des rapports méthanol/eau avec une teneur minimale en eau de 25 pour cent doivent être utilisés. Généralement, un mélange méthanol-eau 3:1 (v/v) convient pour les substances éluantes avec un log P de 6 en une heure, à un débit de 1 ml/min. Pour les substances avec un log P supérieur à 6, il peut être nécessaire de raccourcir le temps d'élution (et ceux des substances de référence) en diminuant la polarité de la phase mobile ou la longueur de la colonne.
19. La substance d'essai et les substances de référence doivent être solubles dans la phase mobile, à une concentration suffisante pour permettre leur détection. Des additifs peuvent être utilisés avec le mélange méthanol-eau, mais dans des cas exceptionnels uniquement dans la mesure où ils modifient les propriétés de la colonne. Dans ces cas-là, il faut confirmer que le temps de rétention des substances d'essai et de référence ne sont pas influencés. Si un mélange méthanol-eau n'est pas approprié, d'autres mélanges solvant organique-eau peuvent être utilisés, par exemple, éthanol-eau, acétonitrile-eau ou alcool isopropylique (2-propanol)-eau.
20. Le pH de l'éluant est un facteur critique pour les substances ionisables. Il doit être compris dans la plage opérationnelle de la colonne, soit généralement entre 2 et 8. Le tamponnage est recommandé. Toutes les précautions doivent être prises pour éviter la précipitation saline et la détérioration de la colonne qui peuvent survenir avec certains mélanges phase organique/tampon. Les mesures HPLC effectuées avec des phases stationnaires à base de silice au-delà d'un pH 8 ne sont pas recommandées, du fait que l'emploi d'une phase mobile alcaline est susceptible d'entraîner une détérioration rapide des performances de la colonne.

Solutés

21. Les substances d'essai et de référence doivent être suffisamment pures pour permettre l'attribution précise des pics figurant sur les chromatogrammes aux différentes substances. Si possible, les substances utilisées en essai ou pour l'étalonnage sont dissoutes dans la phase mobile. Si un solvant autre que la phase mobile est utilisé pour dissoudre les substances d'essai et de référence, la phase mobile doit être utilisée pour la dilution finale avant injection.

Conditions expérimentales

22. Au cours des mesures, la température ne doit pas varier de plus de ± 1 °C.

Détermination du temps mort t_0

23. Le temps mort t_0 peut être mesuré à partir des substances organiques non retenues (thiourée ou formamide, par exemple). Un temps mort plus précis peut être dérivé des temps de rétention mesurés ou d'un ensemble d'approximativement sept membres d'une série homologue (cétones n-alkyl méthyl, par exemple) (17). Un tracé des temps de rétention $t_R(n_C + 1)$ est relevé en fonction de $t_R(n_C)$, où n_C est le nombre d'atomes de carbone. On obtient une droite, $t_R(n_C + 1) = A t_R(n_C) + (1 - A)t_0$, où A , représentant $k(n_C + 1)/k(n_C)$, est constant. Le temps mort t_0 est obtenu à partir du point de rencontre $(1 - A)t_0$ et de la pente A .

Équation de régression

24. L'étape suivante consiste à tracer un log de corrélation k en fonction d'un log P pour les substances de référence appropriées avec des valeurs log P proches de la valeur attendue pour la substance d'essai. Dans la pratique, entre 6 et 10 substances de référence sont injectées simultanément. Les temps de rétention sont déterminés, de préférence sur un intégrateur d'enregistrement raccordé au système de détection. Les logarithmes correspondants des facteurs de capacité, log k , sont tracés comme une fonction de log P . L'équation de régression est exécutée à intervalles réguliers, au moins une fois par jour, de façon à prendre en compte les modifications éventuelles des performances de la colonne.

DÉTERMINATION DU P_{oe} DE LA SUBSTANCE D'ESSAI

25. On injecte la substance d'essai dans les plus petites quantités décelables. Le temps de rétention est déterminé lors d'une procédure identique. Le coefficient de partage de la substance d'essai est obtenu par interpolation du facteur de capacité calculé sur le graphique d'étalonnage. Pour les coefficients de partage très bas ou très élevés, l'extrapolation est nécessaire. Dans ces cas, une attention particulière doit être portée aux limites de confiance de la ligne de régression. Si le temps de rétention de l'échantillon est en dehors de la plage des temps de rétention obtenus pour les standards, une valeur limite doit être précisée.

RÉSULTATS ET RAPPORT**Rapport d'essai**

26. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:
- le cas échéant, l'estimation préliminaire du coefficient de partage, les valeurs estimées et la méthode utilisée; et si une méthode de calcul a été utilisée, sa description complète, avec l'identification de la base de données et une information détaillée sur le choix des fragments;
 - substances d'essai et de référence: pureté, formule structurale et numéro CAS;
 - description de l'équipement et des conditions opérationnelles: colonne analytique, colonne de garde;
 - phase mobile, moyens de détection, plage de températures, pH;
 - profils d'élution (chromatogrammes);
 - temps mort et méthode de mesure;
 - données de rétention et valeurs log P_{oe} dans la littérature pour les substances de référence utilisées lors de l'étalonnage;
 - détails sur la ligne de régression ajustée (log k en fonction de log P_{oe}) et le coefficient de corrélation de la ligne, avec les intervalles de confiance;
 - données moyennes de rétention et valeur log P_{oe} interpolée pour la substance d'essai;
 - dans le cas d'un mélange: chromatogramme du profil d'élution avec valeurs de seuil indiquées;

- valeurs $\log P_{oe}$ par rapport au pourcentage de surface du pic $\log P_{oe}$;
- calcul à l'aide d'une ligne de régression;
- valeurs $\log P_{oe}$ moyennes pondérées calculées, le cas échéant.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) C.V. Eadsforth et P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere. Soc.* 12, 1459.
- (2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss et H.J. Poremski. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. *Chemosphere. Soc.* 17, 361.
- (3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. *Pesticide Science. Soc.* 17, 311.
- (4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt et R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. *Pesticide. Science. Soc.* 12, 219.
- (5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. *Chemosphere. Soc.* 10, 73.
- (6) OCDE (2000). Ligne directrice pour les essais de produits chimiques — Partition Coefficient (n- octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Projet de Ligne directrice Novembre 2000.
- (7) OSPAR (1995). "Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995", Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20-24 février 1995.
- (8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez et C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. Août.
- (9) E. A. Vik, S. Bakke et K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. *Environmental Modelling & Software* Vol. 13, pp. 529-537.
- (10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem et K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. *Chemosphere. Soc.* 9, 683.
- (11) W.E. Hammers, G.J.Meurs et C.L. De-Ligny (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. *J. Chromatography* 247, 1.
- (12) J.E. Haky et A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. *J. Liq. Chromatography. Soc.* 7, 675.
- (13) S. Fujisawa et E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography *Journal of Biomedical Materials Research.* 15, 787.
- (14) C. Hansch et A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Wiley, New York.

-
- (15) C. Hansch, président; A.J. Leo, dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity — Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, Californie 91711.
- (16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther. 14, 479.
- (17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, et J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.
-

Appendice

Méthodes de calcul du P_{oe}

INTRODUCTION

1. Cette appendice propose une rapide introduction au calcul du P_{oe} . Pour plus d'informations, se reporter aux ouvrages (1)(2).
2. Les valeurs calculées du P_{oe} sont utilisées pour:
 - choisir la méthode expérimentale à utiliser: méthode Shake Flask pour un $\log P_{oe}$ entre - 2 et 4, et méthode HPLC pour un $\log P_{oe}$ entre 0 et 6;
 - sélectionner les conditions à utiliser en HPLC (substances de référence, ratio méthanol/eau);
 - contrôler la plausibilité des valeurs obtenues par les méthodes expérimentales;
 - proposer une estimation lorsque les méthodes expérimentales ne peuvent pas être appliquées.

Principe des méthodes de calcul

3. Les méthodes de calcul proposées ici sont basées sur la fragmentation théorique de la molécule en sous-structures pour lesquelles on connaît des incréments $\log P_{oe}$ fiables. Le $\log P_{oe}$ est obtenu par addition des valeurs fragmentales et des termes correctifs pour les interactions intramoléculaires. Des listes de constantes fragmentales et de termes correctifs sont données dans les ouvrages (1)(2)(3)(4)(5)(6). Certaines sont régulièrement mises à jour (3).

Fiabilité des valeurs calculées

4. En général, la fiabilité des méthodes de calcul diminue à mesure qu'augmente la complexité de la substance étudiée. Dans le cas des molécules simples, de faible poids moléculaire et avec un ou deux groupes fonctionnels, on peut tabler sur une déviation de 0,1 à 0,3 unité de $\log P_{oe}$ entre les résultats des différentes méthodes de fragmentation et les valeurs mesurées. La marge d'erreur dépend de la fiabilité des constantes fragmentales utilisées, de la capacité à reconnaître les interactions intramoléculaires (liaisons hydrogène, par exemple) et de l'utilisation appropriée des termes correctifs. Dans le cas des substances ionisantes, la charge et le degré de l'ionisation doivent être prises en compte (10).

Méthode π de Fujita-Hansch

5. La constante du substituant hydrophobe, π , introduite à l'origine par Fujita et al. (7) est définie de la manière suivante:

$$\pi_X = \log P_{oe}(\text{PhX}) - \log P_{oe}(\text{PhH})$$

où PhX est un dérivé aromatique et PhH la substance mère.

$$\begin{aligned} \text{par exemple, } \pi_{\text{Cl}} &= \log P_{oe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}) - \log P_{oe}(\text{C}_6\text{H}_6) \\ &= 2,84 - 2,13 \\ &= 0,71 \end{aligned}$$

La méthode π est avant tout intéressante pour les substances aromatiques. Les valeurs π d'un grand nombre de substituants sont disponibles dans la littérature (4)(5).

Méthode de Rekker

6. Avec la méthode de Rekker (8), la valeur $\log P_{oe}$ est calculée de la manière suivante:

$$\log P_{oe} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{termes d'interaction})$$

où a_i est le nombre de fragments identiques dans une molécule, et f_i l'incrément $\log P_{oe}$ du fragment. Les termes d'interaction peuvent être exprimés sous forme d'un multiple intégral d'une constante C_m (la fameuse "constante magique"). Les constantes fragmentales f_i et C_m ont été déterminées à partir d'une liste de 1 054 valeurs P_{oe} expérimentales de 825 substances à l'aide d'une analyse de régression multiple (6)(8). La détermination des termes d'interaction est menée selon les règles fixées (6)(8)(9).

Méthode de Hansch-Leo

7. Avec la méthode de Hansch et Leo (4), la valeur $\log P_{oe}$ est calculée de la manière suivante:

$$\text{Log } P_{oe} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

où f_i est une constante fragmentale, F_j un terme correctif (facteur), a_i et b_j les fréquences d'occurrence correspondantes. Les listes des valeurs fragmentales atomiques et de groupe, et des termes correctifs F_j , ont été dérivées par une méthode empirique à partir de valeurs P_{oe} expérimentales. Les termes correctifs ont été divisés en plusieurs classes différentes (1)(4). Des logiciels prenant en compte l'ensemble des règles et termes correctifs ont été développés (3).

MÉTHODE COMBINÉE

8. Le calcul du $\log P_{oe}$ des molécules complexes peut être considérablement amélioré, si ces molécules sont disséquées en sous-structures importantes pour lesquelles on dispose de valeurs $\log P_{oe}$ fiables, soit proposées dans la littérature (3)(4) soit provenant de mesures. Ces fragments (hétérocycles, anthraquinone, azobenzène, par exemple) peuvent ensuite être combinés avec les valeurs de Hansch- π , ou avec les constantes fragmentales de Rekker ou Leo.

Remarques

- Les méthodes de calcul sont applicables uniquement à des substances partiellement ou complètement ionisées, lorsque les facteurs correctifs nécessaires ont été pris en compte.
- Dans l'hypothèse qu'il existe des liaisons hydrogène intramoléculaires, les termes correctifs correspondants (approximativement + 0,6 à + 1,0 unité $\log P_{oe}$) doivent être ajoutés (1). Des modèles stéréo et autres données spectroscopiques peuvent donner des indications sur la présence éventuelle de telles liaisons.
- Si plusieurs formes tautomériques sont possibles, la forme la plus probable doit être utilisée comme base pour le calcul.
- Les révisions des listes de constantes fragmentales doivent être suivies avec attention.

BIBLIOGRAPHIE SUR LES MÉTHODES DE CALCUL

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).
- (2) W.J. Dunn, J.H. Block et R.S. Pearlman (dir. publ.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) et Oxford (1986).
- (3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, Californie 91711, Etats-Unis, Log P Database and Med. Chem Software (Program CLOGP-3).
- (4) C. Hansch et A.J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).
- (5) Leo, C. Hansch et D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews.* 71, 525.
- (6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther.* 14, 479.

- (7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 5175.
- (8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, *Pharmacochemistry Library*, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).
- (9) C.V. Eadsforth et P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere*. 12, 1459.
- (10) R.A. Scherrer. ACS — Symposium Series 255, p. 225, American Chemical Society, Washington, D. C. (1984).»

(3) Le chapitre C.3 est remplacé par le texte suivant:

«C.3. ALGUES D'EAU DOUCE ET CYANOBACTÉRIES, ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 201 (2006, annexe corrigée en 2011) de l'OCDE. Une révision de cette méthode d'essai s'est révélée nécessaire afin d'ajouter des espèces et d'actualiser la méthode pour tenir compte des exigences en matière d'évaluation des dangers et de classification des substances chimiques. Cette révision s'est appuyée sur la somme des informations tirées, depuis son adoption, d'une solide expérience concrète, des avancées scientifiques dans le domaine des études de toxicité sur les algues et d'une longue pratique réglementaire.
2. Les définitions utilisées sont présentées à l'Appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Cet essai vise à déterminer les effets d'une substance chimique sur la croissance d'algues microscopiques dulcicoles et/ou de cyanobactéries. Les organismes d'essai en phase de croissance exponentielle sont exposés à la substance chimique d'essai dans des cultures en lots sur une période durant normalement 72 heures. La relative brièveté de l'essai permet néanmoins d'évaluer les effets sur plusieurs générations.
4. L'effet observé est la réduction de la croissance dans une série de cultures d'algues (unités expérimentales) exposées à différentes concentrations de la substance chimique d'essai. L'effet est évalué en fonction de la concentration d'exposition, en comparaison avec la croissance moyenne d'une série de cultures témoins identiques et non traitées. Afin que les effets toxiques ne soient nullement restreints (sensibilité optimale des cultures), les cultures d'algues sont placées dans des conditions propres à une croissance exponentielle non limitée: éléments nutritifs en suffisance et lumière continue, et ce, sur une période assez longue pour que la réduction du taux de croissance spécifique puisse être mesurée.
5. La croissance et l'inhibition de la croissance sont quantifiées d'après des mesures de la biomasse des algues en fonction du temps. La biomasse des algues est définie en poids sec par volume, par exemple des milligrammes d'algues par litre de solution expérimentale. Le poids sec étant difficile à mesurer, on recourt à d'autres paramètres, tels que la numération cellulaire, qui est le plus souvent utilisé, ou le volume, la fluorescence et la densité optique cellulaires, etc. Le facteur de conversion du paramètre de substitution mesuré en biomasse doit être connu.
6. L'effet étudié est l'inhibition de la croissance, exprimée par l'accroissement logarithmique de la biomasse (taux de croissance spécifique moyen) durant la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage donné d'inhibition du taux de croissance (par exemple 50 %) est déterminée en fonction des taux de croissance spécifiques moyens relevés dans une série de solutions expérimentales et exprimée sous la forme $C_x E_t$ (par exemple $C_{50} E_t$).
7. Cette méthode d'essai comporte une variable étudiée supplémentaire, le rendement, requise par la réglementation de certains pays. Il est défini comme étant la différence entre la valeur de la biomasse à la fin de la période d'exposition et cette valeur au début de la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage donné d'inhibition du rendement (par exemple 50 %) est calculée à partir du rendement enregistré dans une série de solutions expérimentales et exprimée en termes de $C_x E_r$ (par exemple $C_{50} E_r$).

8. En outre, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la concentration sans effet observé (CSEO) peuvent être déterminées par un calcul statistique.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

9. Les informations sur la substance chimique d'essai pouvant être utiles à l'établissement des conditions expérimentales comprennent la formule structurale, la pureté, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pouvoir d'absorption lumineuse, le pK_a et les résultats d'études de transformation, notamment la biodégradabilité dans l'eau.
10. Il faut connaître l'hydrosolubilité, le coefficient de partage octanol-eau (P_{oe}) et la pression de vapeur de la substance chimique d'essai et disposer d'une méthode validée pour quantifier la substance dans les solutions expérimentales, méthode dont le rendement de récupération et le seuil de détection seront mentionnés dans le rapport.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

11. La validité de l'essai repose sur les critères de performance suivants:
- L'accroissement exponentiel de la biomasse des cultures témoins doit être d'un facteur au moins égal à 16 en l'espace de 72 heures (durée de l'essai). Ce qui correspond à un taux de croissance spécifique de $0,92/\text{jour}^{-1}$. Le taux de croissance des espèces les plus fréquemment utilisées est généralement nettement supérieur (voir Appendice 2). Ce critère ne sera pas forcément rempli avec les espèces à croissance plus lente que celles énumérées à l'Appendice 2. Dans ce cas, il convient d'allonger la durée de l'essai, afin d'obtenir un facteur de multiplication de la croissance au moins égal à 16 dans les cultures témoins, la croissance devant être exponentielle tout au long de l'essai. La durée de l'essai peut être ramenée à au moins 48 heures pour maintenir une croissance exponentielle non limitée durant l'essai, pourvu que le facteur de multiplication minimal, à savoir 16, soit atteint.
 - Le coefficient de variation moyen des taux de croissance spécifiques section par section (jours 0-1, 1-2 et 2-3, pour les essais de 72 heures) dans les cultures témoins (voir le "coefficient de variation" à l'Appendice 1) ne peut pas excéder 35 %. Le calcul du taux de croissance spécifique section par section est exposé au paragraphe 49. Ce critère s'applique à la valeur moyenne des coefficients de variation calculés pour les expériences identiques du groupe témoin.
 - Le coefficient de variation des taux de croissance spécifiques moyens sur toute la durée de l'essai les cultures témoins identiques ne peut pas dépasser 7 % dans les essais menés sur *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Desmodesmus subspicatus*. S'agissant des autres espèces moins souvent testées, cette valeur ne doit pas dépasser 10 %.

SUBSTANCE CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

12. Le procédé expérimental peut être vérifié au moyen de substance(s) chimiques de référence telle(s) que le 3,5-dichlorophénol, utilisé dans l'essai tournant international (1). Le dichromate de potassium peut également servir de substance de référence pour les algues vertes. Il est recommandé de mettre une substance de référence à l'essai au moins deux fois par an.

APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

13. La présente méthode d'essai se prête mieux aux substances hydrosolubles qui, dans les conditions de l'essai, sont susceptibles de rester dans l'eau. Les substances volatiles, s'adsorbant fortement, colorées, peu solubles dans l'eau ou les substances susceptibles d'affecter la disponibilité des nutriments ou des minéraux dans le milieu d'essai appellent éventuellement certaines modifications du procédé décrit (par exemple un système fermé, le conditionnement des récipients d'essai). Certaines modifications appropriées sont abordées dans les références (2)(3) et (4).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Appareillage

14. Les récipients expérimentaux et les autres appareils entrant en contact avec les solutions d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte. Il convient de les nettoyer à fond afin qu'aucun contaminant organique ou minéral n'interfère avec la croissance des algues ou la composition des solutions expérimentales.

15. Généralement en verre, les récipients d'essai possèdent des dimensions autorisant un volume de culture suffisant pour les mesures à effectuer durant l'essai et un transfert massique suffisant de CO₂ depuis l'atmosphère (voir paragraphe 30). Notons que le volume de liquide doit être assez grand pour les déterminations analytiques (voir paragraphe 37).
16. Une partie ou la totalité du matériel suivant peut également être nécessaire:
 - Appareillage destiné aux cultures: il est recommandé d'utiliser une armoire ou une enceinte dans laquelle la température d'incubation choisie peut être maintenue à ± 2 °C près.
 - Instruments de mesure de la lumière: il est important de savoir que la méthode de mesure de l'intensité lumineuse, et en particulier le type de capteur (collecteur), peut affecter la valeur mesurée. Il est préférable d'effectuer les mesures à l'aide d'un capteur sphérique 4π (sensible à la lumière directe et réfléchie provenant de tous les angles situés au-dessus et en dessous du plan de mesure) ou d'un capteur 2π (sensible à la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus du plan de mesure).
 - Dispositif permettant de déterminer la biomasse des algues: la numération cellulaire, qui est le paramètre de substitution le plus fréquemment utilisé pour déterminer la biomasse des algues, peut être effectuée avec un compteur électronique de particules, un microscope équipé d'une enceinte de comptage ou un cytomètre à flux. D'autres paramètres de substitution de la biomasse peuvent être mesurés au moyen d'un cytomètre à flux, d'un fluorimètre, d'un spectrophotomètre ou d'un colorimètre. Il est utile de calculer le facteur de conversion du nombre de cellules en poids sec de biomasse. Afin d'obtenir des mesures utiles pour les faibles concentrations de biomasse quand on utilise un spectrophotomètre, il peut s'avérer nécessaire d'employer des cuves avec une longueur d'au moins 4 cm.

Organismes d'essai

17. Plusieurs espèces d'algues microscopiques et de cyanobactéries ne formant pas d'agrégats peuvent être utilisées. Les souches énumérées à l'Appendice 2 se sont avérées convenir au protocole expérimental de la présente méthode d'essai.
18. Si l'on utilise d'autres espèces, il faut mentionner leur souche et/ou leur origine. Il y a lieu de confirmer que la croissance exponentielle des algues d'essai sélectionnées peut être maintenue tout au long de l'essai dans les conditions appliquées.

Milieu de croissance

19. Deux milieux de croissance possibles sont préconisés: celui de l'OCDE et le milieu AAP. Les compositions de ces milieux sont détaillées à l'Appendice 3. Il est à noter que la valeur initiale du pH et le pouvoir tampon (régulation de l'augmentation du pH) de ces deux milieux sont différents. En conséquence, les résultats des essais risquent d'être différents suivant le milieu employé, notamment avec des substances d'essai ionisantes.
20. Il peut parfois s'avérer nécessaire de modifier le milieu de croissance, par exemple si la substance d'essai est un métal ou un agent chélatant ou si l'essai est mené à différents pH. L'utilisation d'un milieu modifié est décrite en détail et justifiée (3)(4).

Concentration initiale de la biomasse

21. La biomasse initiale doit être identique dans toutes les cultures de l'essai et suffisamment basse pour autoriser une croissance exponentielle tout au long de la période d'incubation sans risque d'épuisement des éléments nutritifs. La biomasse initiale ne dépassera pas 0,5 mg/l en poids sec. On recommande les concentrations cellulaires initiales suivantes:

Pseudokirchneriella subcapitata: $5 \times 10^3 - 10^4$ cellules/ml

Desmodesmus subspicatus: $2-5 \times 10^3$ cellules/ml

Navicula pelliculosa: 10^4 cellules/ml

Anabaena flos-aquae: 10^4 cellules/ml

Synechococcus leopoliensis: $5 \times 10^4 - 10^5$ cellules/ml

Concentrations de la substance chimique d'essai

22. La gamme de concentrations dans laquelle des effets sont susceptibles de se produire peut être déterminée d'après les résultats d'essais de détermination de l'ordre de grandeur. L'essai proprement dit comprend au moins cinq concentrations formant une série géométrique et séparées par un facteur n'excédant pas 3,2. Un facteur supérieur peut se justifier pour les substances chimiques d'essai dont la courbe concentration-effet a une pente nulle. Il est préférable que la gamme de concentrations couvre des valeurs entraînant une inhibition de 5 à 75 % du taux de croissance des algues.

Expériences identiques et témoins

23. La conception de l'essai inclut trois expériences identiques à chaque concentration expérimentale. S'il n'est pas nécessaire de déterminer la CSEO, l'essai peut être modifié de manière à inclure un plus grand nombre de concentrations et un plus petit nombre d'expériences identiques par concentration. Le nombre d'expériences identiques pour le témoin est au moins trois et, idéalement, le double du nombre d'expériences identiques utilisées à chaque concentration expérimentale.
24. Un ensemble séparé de solutions d'essai peut être préparé pour les déterminations analytiques des concentrations de la substance chimique d'essai (voir paragraphes 36 et 38).
25. Si la substance chimique d'essai est solubilisée à l'aide d'un solvant, on inclut des témoins supplémentaires contenant le solvant à la même concentration que celle appliquée dans les cultures expérimentales.

Préparation de la culture de l'inoculum

26. Afin que les algues soumises à l'essai soient adaptées aux conditions expérimentales et soient bien en phase de croissance exponentielle lorsqu'on les utilise pour ensemercer les solutions d'essai, on prépare une culture d'inoculum dans le milieu expérimental 2 à 4 jours avant le début de l'essai. La biomasse des algues doit être ajustée afin que la culture de l'inoculum présente une croissance exponentielle jusqu'au moment où l'essai débute. La culture de l'inoculum est incubée dans les mêmes conditions que les cultures expérimentales. On mesure l'accroissement de la biomasse dans la culture de l'inoculum pour vérifier qu'elle présente une croissance normale pour la souche expérimentale en question dans les conditions de culture. Un exemple de méthode de culture des algues est décrit à l'Appendice 4. Pour éviter des divisions cellulaires synchrones durant l'essai, il est parfois nécessaire de lancer une seconde étape de propagation de la culture de l'inoculum.

Préparation des solutions expérimentales

27. Toutes les solutions expérimentales doivent contenir les mêmes concentrations de milieu de croissance et la même biomasse initiale d'algues d'essai. On prépare généralement les solutions expérimentales aux concentrations choisies en mélangeant une solution mère de la substance chimique d'essai avec le milieu de croissance et la culture de l'inoculum. Les solutions mères sont normalement préparées par dissolution de la substance dans le milieu d'essai.
28. Des solvants, par exemple de l'acétone, de l'alcool t-butylique et du diméthylformamide, peuvent être utilisés comme véhicules pour ajouter des substances peu solubles dans l'eau au milieu expérimental (2)(3). La concentration de solvant ne doit pas excéder 100 µl/l et doit être identique dans toutes les cultures (y compris les témoins) de l'essai.

Incubation

29. Les récipients expérimentaux sont munis de bouchons perméables à l'air. Les récipients sont agités et placés dans l'appareil destiné aux cultures. Durant l'essai, il est nécessaire de garder les algues en suspension et de faciliter le transfert de CO₂. À cette fin, les récipients sont agités, ou leur contenu est remué, en permanence. Les cultures doivent être maintenues à une température comprise entre 21 et 24 °C, maintenue à ± 2 °C près. Des températures plus élevées peuvent être appliquées pour des espèces autres que celles énumérées à l'Appendice 2, par exemple des espèces tropicales, à condition que les critères de validité soient respectés. Il est recommandé de disposer les récipients de façon aléatoire et de modifier quotidiennement leur emplacement dans l'incubateur.
30. Le pH du milieu des témoins ne doit pas s'accroître de plus de 1,5 unité durant l'essai. Dans le cas des métaux et des substances chimiques qui s'ionisent partiellement à un pH proche de celui de l'essai, il peut s'avérer nécessaire de limiter l'évolution du pH, afin d'obtenir des résultats reproductibles et bien définis. Il est techniquement possible de limiter l'évolution du pH à < 0,5 unité en induisant un taux adéquat de transfert massique de CO₂ de l'air environnant à la solution d'essai, par exemple en augmentant l'intensité de l'agitation. Une autre possibilité consiste à diminuer la demande en CO₂ en réduisant la biomasse initiale ou la durée de l'essai.

31. La surface sur laquelle les cultures sont incubées reçoit un éclairage continu, uniforme et fluorescent, par exemple "blanche froide" ou de type "lumière naturelle". Les besoins lumineux varient selon les souches d'algues et de cyanobactéries. L'intensité lumineuse est choisie en fonction de l'organisme d'essai utilisé. Pour les espèces d'algues vertes recommandées, l'intensité lumineuse au niveau des solutions d'essai doit être choisie dans l'intervalle $60\text{--}120\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ lorsqu'elle est mesurée dans le domaine de longueur d'onde autorisant la photosynthèse (400 à 700 nm) avec un capteur approprié. Certaines espèces, en particulier *Anabaena flos-aquae*, se développent bien sous des intensités lumineuses plus faibles et peuvent être endommagées par des intensités plus fortes. Pour ces espèces, il convient d'appliquer une intensité lumineuse moyenne comprise dans la gamme $40\text{--}60\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (En ce qui concerne les instruments de mesure de la lumière étalonnés en lux, la gamme de 4 440–8 880 lux pour la lumière blanche froide correspond approximativement à l'intensité lumineuse recommandée de $60\text{--}120\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). L'intensité lumineuse ne s'écarte pas de plus de $\pm 15\%$ de l'intensité lumineuse moyenne dans la zone de l'incubation.

Durée de l'essai

32. L'essai dure normalement 72 heures. Néanmoins des durées plus ou moins longues peuvent être appliquées, à condition que tous les critères de validité mentionnés au paragraphe 11 soient respectés.

Mesures et déterminations analytiques

33. La biomasse des algues contenue dans chaque flacon est déterminée au moins une fois par jour durant la période d'essai. Si les mesures sont effectuées sur de petits volumes extraits de la solution d'essai avec une pipette, ceux-ci ne doivent pas être réintroduits dans le récipient d'essai.
34. La biomasse est mesurée par comptage manuel des cellules au microscope ou au moyen d'un compteur électronique de particules (dénombrement des cellules et/ou biovolume). D'autres techniques, par exemple la cytométrie à flux, la fluorescence chlorophyllienne *in vitro* ou *in vivo* (5)(6) ou la densité optique, peuvent être utilisées, à condition de pouvoir démontrer qu'il existe une corrélation satisfaisante avec la biomasse dans la gamme de valeurs de la biomasse de l'essai.
35. Le pH des solutions est mesuré au début et à la fin de l'essai.
36. Si l'on dispose d'une méthode permettant d'analyser la substance chimique d'essai dans la gamme de concentrations appliquées, il faut analyser les solutions expérimentales afin de vérifier les concentrations initiales et le maintien des concentrations d'exposition durant l'essai.
37. L'analyse de la concentration de la substance chimique d'essai, au début et à la fin de l'essai, dans des récipients renfermant une concentration élevée, une concentration faible et une concentration proche de la CE_{50} escomptée peut suffire, si les concentrations d'exposition ne sont pas censées s'écarter de plus de 20 % des valeurs nominales durant l'essai. Il est préconisé d'analyser toutes les concentrations d'essai au début et à la fin de l'essai, si les concentrations ne sont pas supposées demeurer dans l'intervalle de 80–120 % de la concentration nominale. S'agissant des substances chimiques d'essai volatiles, instables ou s'adsorbant fortement, on recommande de prélever des échantillons à analyser toutes les 24 heures durant la période d'exposition, afin de préciser la perte de substance d'essai. Pour ces substances chimiques, il pourrait être nécessaire d'augmenter le nombre d'expériences identiques. Dans tous les cas, il suffira de déterminer la concentration de la substance d'essai dans un seul récipient traité de manière identique pour chaque concentration expérimentale (ou dans le mélange du contenu de tous les récipients traités de manière identique).
38. Les milieux d'essai destinés spécialement à l'analyse des concentrations d'exposition durant l'essai doivent être traités de la même manière que les milieux utilisés pour l'essai: ils doivent êtreensemencés avec les algues et incubés dans des conditions identiques. Si l'on doit analyser la concentration de la substance chimique d'essai dissoute, les algues devront peut-être être séparées du milieu. À cette fin, il est préférable de procéder par centrifugation à une faible force d'accélération, suffisante pour sédimenter les algues.
39. S'il s'avère que la concentration de la substance d'essai a pu se maintenir tout au long de l'essai dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale ou mesurée initialement, l'analyse des résultats peut s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement. Si l'écart à la concentration nominale ou mesurée initialement est supérieur à $\pm 20\%$, l'analyse des résultats devra reposer sur la moyenne géométrique de la concentration relevée durant l'exposition ou sur des modèles décrivant la baisse de la concentration de la substance chimique d'essai (3)(7).
40. L'essai d'inhibition de la croissance des algues est un système expérimental plus dynamique que la plupart des autres essais de toxicité à court terme sur des organismes aquatiques. Aussi, les concentrations d'exposition

réelles risquent d'être difficiles à définir, en particulier pour les substances s'adsorbant testées à faibles concentrations. Dans ces circonstances, la disparition de la substance de la solution par adsorption sur la biomasse croissante des algues ne signifie pas que la substance d'essai soit absente du système d'essai. En analysant le résultat de l'essai, il y a lieu de vérifier si la diminution de la concentration de la substance chimique d'essai au cours de l'essai s'est accompagnée d'une baisse de l'inhibition de la croissance. Si tel est le cas, on peut envisager d'appliquer un modèle décrivant convenablement la baisse de la concentration de la substance chimique d'essai (7). Dans le cas contraire, il sera peut-être pertinent de fonder l'analyse des résultats sur les concentrations initiales (nominales ou mesurées).

Autres observations

41. On observe au microscope la culture de l'inoculum pour vérifier si elle présente un aspect normal et sain ainsi que l'aspect des algues pour détecter la présence éventuelle d'anomalies (susceptibles de résulter de l'exposition à la substance chimique d'essai) à la fin de l'essai.

Essai limite

42. Dans certaines circonstances, par exemple lorsqu'un essai préliminaire indique que la substance chimique d'essai n'exerce aucun effet toxique à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/l ou à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (suivant celle qui est la plus basse), on peut conduire un essai limite afin de comparer les réactions d'un groupe témoin avec celles d'un groupe traité (à 100 mg/l ou à une concentration égale à la limite de solubilité). Il est fortement recommandé d'étayer cet essai par une analyse de la concentration d'exposition. Tous les critères de validité et conditions expérimentales décrits précédemment s'appliquent à l'essai limite, si ce n'est que le nombre de récipients traités de manière identique doit être au moins égal à six. Les variables étudiées dans le groupe témoin et le groupe traité peuvent être analysées au moyen d'un test statistique permettant de comparer les moyennes, par exemple un test t de Student. Si les variances des deux groupes sont inégales, on effectue un test t ajusté en fonction des variances inégales.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Courbes de croissance

43. La biomasse des récipients d'essai peut être exprimée en unités du paramètre de substitution utilisé pour la mesurer (nombre de cellules, fluorescence, par exemple)
44. Porter dans un tableau la concentration estimée de la biomasse dans les cultures expérimentales et les cultures témoins, les concentrations de la substance d'essai et les moments des mesures, enregistrés avec une précision minimale de l'ordre de l'heure, afin d'obtenir les points des courbes de croissance. Les échelles tant logarithmiques que linéaires peuvent être utiles à ce premier stade, mais les échelles logarithmiques sont indispensables et représentent généralement mieux les variations du rythme de la croissance durant l'essai. Notons que la croissance exponentielle produit une droite lorsqu'elle est portée sur une échelle logarithmique et que la pente de cette droite indique le taux de croissance spécifique.
45. À l'aide des points portés sur le graphique, examiner si les cultures témoins se développent au rythme exponentiel prévu tout au long de l'essai. Étudier attentivement tous les points et l'allure des graphiques et vérifier si les données brutes et les méthodes employées ne sont entachées d'aucune erreur. Vérifier en particulier tous les points qui semblent s'écarter du tracé suivant une erreur systématique. Si, à l'évidence, la manière dont on a procédé comporte des erreurs identifiables ou très probables, le point concerné est à signaler comme une valeur nettement divergente et ne doit pas être pris en compte dans l'analyse statistique ultérieure (une concentration nulle d'algues dans un sur deux ou trois récipients traités de manière identique peut révéler que le récipient n'a pas étéensemencé correctement ou qu'il n'a pas été suffisamment bien nettoyé.) Les raisons pour lesquelles on a décidé d'exclure un point parce qu'on le considère comme une valeur nettement divergente sont exposées clairement dans le rapport d'essai. Les raisons acceptées ne représentent que des erreurs méthodologiques (rares) et non un manque de précision. Les méthodes statistiques d'identification des valeurs nettement divergentes sont d'un usage limité pour ce type de problème et ne peuvent remplacer le jugement d'un expert. Il est préférable de conserver les valeurs nettement divergentes (signalées comme telles) parmi les données présentées ultérieurement sur un graphique ou un tableau.

Variables étudiées

46. Cet essai est destiné à déterminer les effets de la substance chimique d'essai sur la croissance des algues. La présente méthode d'essai décrit deux variables étudiées, de manière à répondre aux différentes préférences et exigences réglementaires de juridictions distinctes. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables par toutes les juridictions, les effets doivent être évalués en fonction des deux variables étudiées (a) et (b) définies ci-dessous.
 - a) taux de croissance spécifique moyen: cette variable étudiée est calculée d'après l'accroissement logarithmique de la biomasse pendant la durée de l'essai, exprimé par jour.
 - b) rendement: cette variable étudiée correspond à la valeur de la biomasse à la fin de l'essai diminuée de la valeur de la biomasse au début de l'essai.

47. Notons que les valeurs de toxicité calculées avec ces deux variables étudiées ne sont pas comparables et qu'il faut tenir compte de cette différence lorsqu'on utilise les résultats de l'essai. Les valeurs de la CE_x basées sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) seront généralement supérieures à celles basées sur le rendement (C_xE_r), si les conditions expérimentales de la présente méthode d'essai sont appliquées, en raison de la base mathématique de chacune de ces approches. Cette différence n'est due qu'au calcul mathématique, il ne s'agit pas d'une différence de sensibilité entre les deux variables étudiées. Le concept du taux de croissance spécifique moyen repose sur l'allure générale de la croissance exponentielle des algues dans des cultures non limitées, où la toxicité est estimée d'après les effets sur le taux de croissance, sans tenir compte du niveau absolu du taux de croissance spécifique du témoin, de la pente de la courbe concentration-effet, ni de la durée de l'essai. En revanche, les résultats basés sur la variable de rendement dépendent de toutes ces autres variables. La C_xE_r dépend du taux de croissance spécifique de l'espèce d'algue utilisée dans chaque essai et du taux de croissance maximum spécifique susceptible de varier entre les espèces, voire entre différentes souches. Cette variable ne doit pas être utilisée pour comparer la sensibilité aux agents toxiques de différentes espèces d'algues, voire de différentes souches. S'il est préférable, du point de vue scientifique, d'estimer la toxicité d'après le taux de croissance spécifique moyen, la présente méthode d'essai inclut également l'estimation basée sur le rendement afin de satisfaire à la réglementation en vigueur dans certains pays.

Taux de croissance spécifique moyen

48. Le taux de croissance spécifique moyen durant une période donnée est calculé comme l'accroissement logarithmique de la biomasse, pour chaque expérience identique des groupes traités et témoins, au moyen de l'équation présentée ci-dessous (1):

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{jour}^{-1}) \quad [1].$$

où:

μ_{i-j} est le taux de croissance spécifique moyen du temps i au temps j ;

X_i est la biomasse au temps i ;

X_j est la biomasse au temps j .

Pour chaque groupe traité et témoin, calculer un taux de croissance moyen et les estimations de la variance.

49. Calculer le taux de croissance spécifique moyen sur l'ensemble de la durée de l'essai (normalement du jour 0 au jour 3), en prenant comme valeur de départ, la valeur nominale de la biomasse ensemencée plutôt que sa valeur mesurée, car cela permet généralement d'obtenir une plus grande précision. Si l'instrument utilisé pour mesurer la biomasse autorise des déterminations suffisamment précises d'une petite biomasse d'inoculum (par exemple un cytomètre à flux), la concentration initiale mesurée de la biomasse peut alors être utilisée. Évaluer également les taux de croissance section par section, en considérant, pour ce calcul, qu'ils équivalent aux taux de croissance spécifiques de chaque jour de l'essai (jours 0-1, 1-2 et 2-3) et vérifier si le taux de croissance des témoins reste constant (voir critères de validité, paragraphe 11). Le fait que le taux de croissance spécifique du premier jour soit sensiblement inférieur au taux de croissance spécifique moyen peut indiquer une phase de latence. S'il est possible de réduire presque à néant la phase de latence dans les cultures témoins par une propagation appropriée de la préculture, la présence d'une phase de latence dans les cultures exposées peut refléter un rétablissement après un choc toxique initial ou une exposition réduite due à une perte de substance chimique d'essai (notamment par sorption sur la biomasse des algues) après l'exposition initiale. Le taux de croissance section par section permet ainsi d'étudier les différents effets de la substance chimique d'essai durant la période d'exposition, d'où son intérêt. Des différences sensibles entre le taux de croissance section par section et le taux de croissance moyen traduisent un écart à la croissance exponentielle constante et appellent un examen attentif des courbes de croissance.
50. Calculer le pourcentage d'inhibition du taux de croissance pour chaque expérience identique de chaque groupe traité selon l'équation suivante:

$$\%I_r = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100 \quad [2],$$

où:

% I_r est le pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique moyen;

μ_c est la valeur moyenne du taux de croissance spécifique moyen (μ) dans le groupe témoin;

μ_T est le taux de croissance spécifique moyen d'une des expériences identiques du groupe traité.

51. Si les solutions d'essai sont préparées à l'aide d'un solvant, c'est le témoin au solvant plutôt que le témoin sans solvant qui doit être utilisé pour calculer le pourcentage d'inhibition.

Rendement

52. Le rendement est calculé d'après la différence entre la valeur de la biomasse à la fin de l'essai et sa valeur au début de l'essai pour chaque expérience identique des groupes traités et témoins. Pour chaque concentration expérimentale et le témoin, calculer un rendement moyen ainsi que les estimations de la variance. Le pourcentage d'inhibition du rendement (% I_y) peut être calculé pour chaque expérience identique de chaque groupe traité d'après la formule suivante:

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \quad [3]$$

où:

% I_y est le pourcentage d'inhibition du rendement

R_c est la valeur moyenne du rendement dans le groupe témoin

R_T est la valeur du rendement dans l'une des expériences identiques du groupe traité.

Courbes concentration-effet

53. Porter sur un graphique le pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration de la substance chimique d'essai et examiner les points attentivement, sans tenir compte des points ayant été éliminés parce que considérés comme des valeurs nettement divergentes au cours de la première phase. Faire passer une courbe régulière entre les points, à vue d'œil ou par interpolation informatique, afin d'obtenir une première impression de la relation concentration-effet et poursuivre par une méthode plus détaillée, de préférence une méthode statistique informatisée. En fonction de l'usage auquel on destine les données, de la qualité (précision) et de la quantité des données ainsi que de la disponibilité des outils d'analyse des données, on pourra décider (et bien justifier certains cas) d'arrêter l'analyse des données à ce stade et de ne retenir que les chiffres clés, à savoir la CE_{50} et la CE_{10} (et/ou la CE_{20}), de la courbe ajustée à vue d'œil (voir également la section ci-après sur les effets stimulants). Citons quelques raisons valables de ne pas recourir à une méthode statistique:

- traitées par des méthodes informatisées, les données ne livreront pas de résultats plus fiables que ceux obtenus par une analyse d'expert — dans ces circonstances, certains programmes informatiques risquent même d'être incapables de produire une solution fiable (les itérations peuvent ne pas converger, etc.)
- les effets stimulant la croissance ne peuvent être traités correctement par les programmes informatiques disponibles (voir plus bas).

Méthodes statistiques

54. L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de la régression. Il est possible d'appliquer une régression linéaire pondérée après avoir effectué une transformation linéarisant les valeurs décrivant l'effet observé — par exemple en unités probit ou logit ou Weibull (8), mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression non linéaire, celles-ci traitant mieux les irrégularités inévitables des valeurs et les écarts par rapport aux distributions régulières. Proches de zéro ou de l'inhibition totale, ces irrégularités risquent d'être amplifiées par la transformation et d'interférer avec l'analyse (8). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull se prêtent aux effets par tout ou rien (mortalité ou survie, par exemple) et doivent être modifiées pour pouvoir être utilisées avec les valeurs de croissance ou de biomasse. Les références (9)(10) et (11) décrivent des procédures permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues. L'utilisation d'une analyse de la régression non linéaire est détaillée à l'Appendice 5.

55. Pour chaque variable étudiée à analyser, utiliser la relation concentration-effet pour calculer des estimations ponctuelles des valeurs de CE_x . Déterminer, si possible, les limites de confiance à 95 % pour chaque estimation. La validité de l'ajustement des données décrivant les effets au modèle de régression est à évaluer par un procédé statistique ou graphique. L'analyse de la régression doit s'appuyer sur les effets relevés dans chaque récipient traité de manière identique et non sur les moyennes des groupes traités. Si toutefois, l'ajustement d'une courbe non linéaire est difficile ou échoue parce que les données sont trop dispersées, une régression peut alors être effectuée sur les moyennes des groupes, ce qui permet de réduire l'influence des valeurs soupçonnées d'être nettement divergentes. Le recours à cette option doit être signalé dans le rapport d'essai en tant qu'écart à la procédure normale, écart dû au fait que l'ajustement de la courbe avec les valeurs individuelles des expériences identiques n'a pas livré un bon résultat.
56. Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec bootstrap (rééchantillonnage) (13), si les modèles ou les méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.
57. Afin d'estimer la CME0, et par conséquent la CSEO, pour les effets de la substance chimique d'essai sur le taux de croissance, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par des techniques d'analyse de la variance (ANOVA). La moyenne de chaque concentration doit ensuite être comparée avec la moyenne du témoin à l'aide d'un test approprié à comparaisons multiples ou de tendance. Les tests de Dunnett ou de William peuvent être utiles (12)(14)(15)(16)(17). Il est nécessaire de vérifier si l'hypothèse de l'ANOVA de l'homogénéité de la variance tient. Cette vérification peut être pratiquée par un procédé graphique ou par un test formel (17), notamment les tests de Levene ou de Bartlett. L'infirmité de l'hypothèse de l'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance est extrême et ne peut être rectifiée par une transformation, on envisagera des méthodes d'analyse telles que les tests de tendance régressifs de Jonkheere. La référence (11) livre des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.
58. Des découvertes récentes ont conduit les scientifiques à préconiser d'abandonner la notion de CSEO et de la remplacer par des estimations ponctuelles de la CE_x fondées sur la régression. Aucune valeur de x appropriée n'a encore été établie pour cet essai sur les algues. Néanmoins, une gamme de 10 à 20 % semble convenir (suivant la variable étudiée sélectionnée) et il est préférable de mentionner à la fois la CE_{10} et la CE_{20} dans le rapport.

Stimulation de la croissance

59. On observe quelquefois une stimulation de la croissance (inhibition négative) aux faibles concentrations. Ce phénomène peut résulter d'une hormèse ("stimulation toxique") ou de l'introduction de facteurs de stimulation de la croissance, véhiculés par la substance d'essai, dans le milieu minimal utilisé. Notons que l'addition de nutriments minéraux ne devrait exercer aucun effet direct étant donné que le milieu d'essai doit contenir un excès de nutriments tout au long de l'essai. La stimulation à faible dose peut habituellement être ignorée dans les calculs de la CE_{50} , à moins qu'elle ne soit très prononcée. Néanmoins, si cette stimulation est extrême ou s'il faut calculer une valeur de CE_x pour une faible valeur de x , des procédures particulières pourraient être requises. On évitera, dans la mesure du possible, de soustraire les effets stimulants à l'analyse des données et, si le logiciel permettant d'ajuster la courbe ne peut pas accepter une stimulation mineure, une interpolation linéaire avec bootstrap peut être employée. Si la stimulation est extrême, l'utilisation d'un modèle d'hormèse est envisageable (18).

Inhibition non toxique de la croissance

60. Les substances d'essai absorbant la lumière peuvent abaisser le taux de croissance, car l'obscurcissement diminue la quantité de lumière disponible. Il y a lieu de séparer ces types d'effets physiques des effets toxiques en modifiant les conditions expérimentales et de rapporter les premiers séparément. Les références (2) et (3) donnent des indications à ce sujet.

RAPPORT D'ESSAI

61. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

Substance chimique d'essai:

- état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes, y compris la limite de solubilité dans l'eau;
- données d'identification chimique (par exemple, numéro CAS), notamment la pureté (impuretés).

Espèce soumise à l'essai:

- souche, fournisseur ou source et conditions de culture utilisées.

Conditions expérimentales:

- date du début de l'essai et durée de l'essai;
- description de la conception de l'essai: récipients d'essai, volumes des cultures, densité de la biomasse au début de l'essai;
- composition du milieu;
- concentrations expérimentales et expériences identiques (par exemple nombre d'expériences identiques, nombre de concentrations expérimentales et progression géométrique appliquée);
- description de la préparation des solutions expérimentales, y compris l'utilisation de solvants, etc.
- appareillage destiné aux cultures;
- intensité et qualité lumineuses (source, homogénéité);
- température;
- concentrations mises à l'essai: concentrations d'essai nominales et tous les résultats d'analyses pour déterminer la concentration de la substance chimique d'essai dans les récipients expérimentaux. Le rendement de récupération de la méthode et le seuil de quantification dans la matrice expérimentale doivent être mentionnés;
- tous les écarts par rapport à la présente méthode d'essai;
- méthode de détermination de la biomasse et démonstration de la corrélation entre le paramètre mesuré et le poids sec.

Résultats:

- valeurs du pH au début et à la fin de l'essai dans tous les récipients traités;
- biomasse dans chaque récipient à chaque point de mesure et méthode de mesure de la biomasse;
- courbes de croissance (biomasse en fonction du temps);
- calcul des variables étudiées pour chaque expérience identique de chaque traitement ainsi que des moyennes et du coefficient de variation des expériences identiques;
- représentation graphique de la relation concentration-effet;
- estimation de la toxicité pour les variables étudiées, par exemple la CE_{50} , la CE_{10} et la CE_{20} et intervalles de confiance associés. CMEQ et CSEO, si elles ont été calculées, et méthodes statistiques appliquées à leur détermination;
- si une analyse de la variance (ANOVA) a été pratiquée, puissance de l'effet détectable (par exemple la différence la moins significative);
- stimulation de la croissance éventuellement observée dans un groupe traité;
- tout autre effet observé, par exemple changement morphologique des algues;
- analyse des résultats, y compris l'incidence sur les résultats de l'essai d'éventuels écarts par rapport à la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Organisation internationale de normalisation (1993) ISO 8692 Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires.
- (2) Organisation internationale de normalisation (1998) ISO/DIS 14442 Qualité de l'eau — Lignes directrices pour essais d'inhibition de la croissance algale avec des matières peu solubles, des composés volatils, des métaux et des eaux résiduaires.
- (3) OCDE 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement. Série sur les essais et l'évaluation n° 23. Organisation pour la coopération et le développement économiques, Paris.
- (4) Organisation internationale de normalisation (1998) ISO 5667-16 Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 16: Lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons.

-
- (5) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.
 - (6) Slovencey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22: 919-925
 - (7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.
 - (8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19: 713-718.
 - (9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 157-167.
 - (10) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 1485-1494.
 - (11) OCDE (2006): Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation pour la Coopération et le Développement Economiques, Paris.
 - (12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121
 - (13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
 - (14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
 - (15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
 - (16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519-531.
 - (17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, New York.
 - (18) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96. États-Unis.
-

Appendice 1

Définitions

Les définitions et abréviations suivantes sont utilisées aux fins de la présente méthode d'essai:

Biomasse: poids sec de la matière vivante présente dans une population, exprimé en fonction d'un volume donné, par exemple en mg d'algues/litre de solution d'essai. D'habitude la biomasse est définie comme une masse, mais, dans cet essai, le terme "biomasse" se réfère à une masse par unité de volume. Remarquons également que, dans cet essai, la biomasse est en général mesurée indirectement, par la numération des cellules, la fluorescence, etc., si bien que le terme "biomasse" recouvre également ces mesures de substitution.

Substance chimique: une substance ou un mélange

Coefficient de variation: mesure sans dimension de la variabilité d'un paramètre, définie par le rapport de l'écart-type à la moyenne. Il s'exprime également en pourcentage. Le coefficient moyen de variation du taux de croissance spécifique moyen des expériences identiques du groupe témoin se calcule comme suit:

1. Calculer le coefficient de variation (en %) du taux de croissance spécifique moyen en fonction des taux de croissance quotidiens (section par section) pour chaque expérience identique.
2. Calculer la valeur moyenne de toutes les valeurs calculées au point 1, afin d'obtenir le coefficient moyen de variation du taux de croissance spécifique quotidien (section par section) des cultures témoins identiques.

CE_x: concentration de la substance chimique d'essai dissoute dans le milieu d'essai entraînant une réduction de x % (par exemple 50 %) de la croissance des organismes d'essai durant une période d'exposition définie (à mentionner explicitement si elle s'écarte de la durée normale ou totale de l'essai). Afin de distinguer les valeurs de la CE mesurées en fonction du taux de croissance de celles mesurées en fonction du rendement, on utilise les abréviations CE_c, s'agissant du taux de croissance, et CE_r, s'agissant du rendement.

Milieu de croissance: milieu de culture synthétique complet dans lequel les algues se développent lorsqu'elles sont exposées à la substance chimique d'essai, celle-ci étant généralement dissoute dans le milieu d'essai.

Taux de croissance (taux de croissance spécifique moyen): accroissement logarithmique de la biomasse durant la période d'exposition.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration d'essai la plus faible à laquelle on observe que la substance chimique exerce un effet statistiquement significatif de réduction de la croissance (à $p < 0,05$) par comparaison avec le témoin, durant une période d'exposition donnée. Néanmoins, toutes les concentrations supérieures à la CMEO doivent avoir un effet néfaste supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Lorsque ces deux conditions ne peuvent pas être remplies, il faut expliquer en détail la façon dont la CMEO (et donc la CSEO) a été choisie.

Concentration sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

Variable étudiée: variable permettant d'estimer la toxicité à partir de n'importe quelle variable mesurée décrivant la biomasse, selon différentes méthodes de calcul. Dans la présente méthode d'essai, les taux de croissance et le rendement représentent les variables étudiées déduites de la mesure directe de la biomasse ou de sa mesure indirecte d'après l'un des paramètres de substitution mentionnés précédemment.

Taux de croissance spécifique: variable étudiée correspondant au quotient de la différence des logarithmes népériens d'un paramètre observé (la biomasse, dans la présente méthode d'essai) par la période de temps respective.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Rendement: différence entre la valeur d'une variable mesurée à la fin de la période d'exposition et la valeur de cette variable mesurée au début de la période d'exposition, utilisée pour exprimer l'accroissement de biomasse durant l'essai.

Appendice 2

Souches convenant à l'essai**Algues vertes**

Pseudokirchneriella subcapitata (dénommée précédemment *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG.

Desmodesmus subspicatus (dénommé précédemment *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG.

Diatomées

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Cyanobactéries

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Sources de souches

Les souches recommandées sont disponibles sous la forme de cultures unialgales dans les collections suivantes (par ordre alphabétique):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
États-Unis

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Ambleside
Cumbria LA22 0LP
UK

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
ALLEMAGNE

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
The University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
États-Unis.

Aspect et caractéristiques des espèces recommandées

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Aspect	Cellules solitaires, incurvées et torsées	Cellules ovales et solitaires la plupart du temps	Bâtonnets	Chaînes de cellules ovales	Bâtonnets
Dimensions (L × l) µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volume cellulaire (µm ³ /cellule)	40-60 ⁽¹⁾	60-80 ⁽¹⁾	40-50 ⁽¹⁾	30-40 ⁽¹⁾	2,5 ⁽²⁾
Poids sec des cellules (mg/cellule)	2-3 × 10 ⁻⁸	3-4 × 10 ⁻⁸	3-4 × 10 ⁻⁸	1-2 × 10 ⁻⁸	2-3 × 10 ⁻⁹
Taux de croissance ⁽³⁾ (jour ⁻¹)	1,5 - 1,7	1,2 - 1,5	1,4	1,1 - 1,4	2,0 - 2,4

⁽¹⁾ Mesuré avec un compteur électronique de particules

⁽²⁾ Calculé d'après la taille

⁽³⁾ Taux de croissance le plus souvent observé dans le milieu de l'OCDE sous une intensité lumineuse approximative de 70 µE·m⁻² s⁻¹ et à 21 °C

Recommandations particulières pour la culture et la manipulation des espèces d'essai recommandées***Pseudokirchneriella subcapitata* et *Desmodesmus subspicatus***

Ces algues vertes sont généralement faciles à cultiver dans différents milieux de culture. Les collections de cultures renseignent les utilisateurs sur les milieux appropriés. Ces cellules sont normalement solitaires et la densité cellulaire se mesure aisément à l'aide d'un compteur électronique de particules ou d'un microscope.

Anabaena flos-aquae

La culture mère se conserve dans divers milieux de croissance. Il importe particulièrement d'éviter que le lot de culture ait dépassé la phase exponentielle de croissance au moment du renouvellement, le rétablissement étant difficile à ce stade.

Anabaena flos-aquae forme des chaînes de cellules enroulées en pelotes (agrégats). La dimension de ces agrégats est susceptible de varier en fonction des conditions de culture. Il peut s'avérer nécessaire de dissocier ces agrégats pour compter les cellules au microscope ou avec un compteur électronique de particules, afin de déterminer la biomasse.

Les chaînes de sous-échantillons peuvent être rompues en différents points par sonication, afin de réduire la variabilité lors du comptage. Une sonication plus longue que celle requise pour couper les chaînes en petits segments risque de détruire les cellules. L'intensité et la durée de la sonication doivent être identiques pour chaque traitement.

On dénombrera suffisamment de champs sur l'hémocytomètre (au moins 400 cellules) afin de compenser la variabilité. Cela augmentera la fiabilité des déterminations de la densité au microscope.

Après le découpage des chaînes de cellules par une sonication menée délicatement, le volume cellulaire total d'*Anabaena* peut être déterminé avec un compteur électronique de particules. Il convient de régler l'énergie de la sonication de façon à éviter de briser les cellules.

Utiliser un mélangeur à vortex ou un instrument analogue pour s'assurer que la suspension d'algues utilisée pour ensemer les récipients d'essai est bien mélangée et homogène.

Les récipients d'essai doivent être placés sur une table agitée et animée d'un mouvement orbital ou de va-et-vient à environ 150 tours par minute. Les *Anabaena* peuvent également être agitées par intermittences de façon à former moins d'agrégats. Si elles s'agrègent, on veillera soigneusement à prélever des échantillons représentatifs pour les mesures de biomasse. Une agitation vigoureuse avant le prélèvement peut être nécessaire pour désagréger les agrégats d'algues.

Synechococcus leopoliensis

La culture mère se conserve dans divers milieux de croissance. Les collections de cultures renseignent les utilisateurs sur les milieux appropriés.

Synechococcus leopoliensis croît en formant des bâtonnets solitaires. La très petite dimension des cellules rend difficile le comptage au microscope pour les mesures de biomasse. Dans ce cas, il est utile de disposer d'un compteur électronique capable de dénombrer des particules mesurant jusqu'à 1 µm. Une mesure par fluorométrie in vitro convient également.

Navicula pelliculosa

La culture mère se conserve dans divers milieux de croissance. Les collections de cultures renseignent les utilisateurs sur les milieux appropriés. Ici, le milieu doit être additionné de silicate.

Navicula pelliculosa peut former des agrégats dans certaines conditions de culture. À cause de leur production lipidique, les cellules algales tendent parfois à s'accumuler dans le film qui se forme à la surface. Si tel est le cas, des mesures spéciales accompagneront le prélèvement de sous-échantillons en vue de la détermination de la biomasse, afin d'assurer la représentativité des échantillons. Une agitation vigoureuse, par exemple au moyen d'un mélangeur à vortex, peut être nécessaire.

Appendice 3

Milieux de croissance

L'un des deux milieux de croissance suivants peut être utilisé:

- Milieu de l'OCDE: milieu de la première version de la ligne directrice 201 de l'OCDE, conforme à la norme ISO 8692
- Milieu AAP de l'Agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (US EPA), conforme à l'ASTM.

Ces milieux doivent être préparés avec des produits de qualité "réactif" ou "pour analyse" et de l'eau désionisée.

Composition du milieu AAP (US EPA) et du milieu de la ligne directrice 201 de l'OCDE

Ingrédient	AAP		OCDE	
	mg/l	mM	mg/l	mM
NaHCO ₃	15,0	0,179	50,0	0,595
NaNO ₃	25,5	0,300		
NH ₄ Cl			15,0	0,280
MgCl ₂ · 6(H ₂ O)	12,16	0,0598	12,0	0,0590
CaCl ₂ · 2(H ₂ O)	4,41	0,0300	18,0	0,122
MgSO ₄ · 7(H ₂ O)	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K ₂ HPO ₄	1,044	0,00599		
KH ₂ PO ₄			1,60	0,00919
FeCl ₃ · 6(H ₂ O)	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
Na ₂ EDTA · 2(H ₂ O)	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H ₃ BO ₃	0,186	0,00300	0,185	0,00299
MnCl ₂ · 4(H ₂ O)	0,415	0,00201	0,415	0,00210
ZnCl ₂	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
CoCl ₂ · 6(H ₂ O)	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
Na ₂ MoO ₄ · 2(H ₂ O)	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
CuCl ₂ · 2(H ₂ O)	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

Le rapport molaire de l'EDTA sur le fer est légèrement supérieur à l'unité. Cela empêche le fer de précipiter et réduit en même temps au minimum la chélation des ions de métaux lourds.

Dans l'essai mené sur la diatomée *Navicula pelliculosa*, les deux milieux doivent être additionnés de $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, afin d'atteindre une concentration de 1,4 mg de Si/l.

Le pH du milieu est obtenu à l'équilibre entre le système carbonate du milieu et la pression partielle de CO_2 dans l'air atmosphérique. Le pH à 25 °C et la concentration molaire de bicarbonate sont liés approximativement par l'équation suivante:

$$\text{pH}_{\text{équi}} = 11,30 + \log[\text{HCO}_3]$$

Avec 15 mg/l de NaHCO_3 , le $\text{pH}_{\text{équi}} = 7,5$ (milieu de l'US EPA) et avec 50 mg/l de NaHCO_3 , le $\text{pH}_{\text{équi}} = 8,1$ (milieu de l'OCDE)

Composition élémentaire du milieu d'essai

Élément	AAP	OCDE
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Préparation du milieu de l'OCDE

Élément nutritif	Concentration dans la solution mère
Solution mère 1: macroéléments	
NH_4Cl	1,5 g/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Solution mère 2: fer	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 mg/l
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l

Élément nutritif	Concentration dans la solution mère
Solution mère 3: oligoéléments	
H_3BO_3	185 mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 mg/l
ZnCl_2	3 mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg/l
Solution mère 4: bicarbonate	
NaHCO_3	50 g/l
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	

Stériliser les solutions mères par filtration sur membrane (diamètre moyen des pores: 0,2 µm) ou à l'autoclave (15 minutes à 120 °C). Stocker les solutions à l'obscurité et à 4 °C.

Ne pas autoclaver les solutions mères 2 et 4 mais les stériliser par filtration sur membrane.

Préparer le milieu de croissance en ajoutant un volume approprié des solutions mères 1 à 4 à de l'eau:

Ajouter à 500 ml d'eau stérilisée:

10 ml de solution mère 1

1 ml de solution mère 2

1 ml de solution mère 3

1 ml de solution mère 4

Porter à 1 000 mL avec de l'eau stérilisée.

Attendre que le milieu atteigne l'équilibre avec le CO₂ atmosphérique, si nécessaire, en y faisant barboter de l'air stérile et filtré durant quelques heures.

Préparation du milieu de l'US EPA

1. Ajouter 1 ml de chaque solution mère 2.1-2.7 à environ 900 ml d'eau désionisée ou distillée, et porter le volume à 1 litre.
2. Préparer les solutions mères de macroéléments en dissolvant les composés suivants dans 500 ml d'eau désionisée ou distillée. Les réactifs 2.1, 2.2, 2.3 et 2.4 peuvent être combinés dans une seule solution mère.

2.1 NaNO_3 12,750 g.

2.2 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 6,082 g.

2.3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,205 g.
2.4	Solution mère d'oligoéléments (voir 3)	
2.5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,350 g.
2.6	K_2HPO_4	0,522 g.
2.7	NaHCO_3	7,500 g.
2.8	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Voir Note 1.

Note 1: À n'utiliser que pour les diatomées. Peut être ajouté directement (202,4 mg) ou véhiculé dans une solution mère pour donner une concentration finale de Si de 20 mg/l dans le milieu.

3. Préparer la solution mère d'oligoéléments en dissolvant les composés suivants dans 500 ml d'eau désionisée ou distillée:

3.1	H_3BO_3	92,760 mg.
3.2	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	207,690 mg.
3.3	ZnCl_2	1,635 mg.
3.4	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	79,880 mg.
3.5	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,714 mg.
3.6	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,630 mg.
3.7	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,006 mg.
3.8	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150 000 mg [Éthylènedinitrilotétraacétate de sodium].
3.9	$\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,005 mg Voir Note 2.

Note 2: À n'utiliser que dans le milieu pour les substances mères des diatomées.

4. Ajuster le pH à $7,5 \pm 0,1$ avec du NaOH ou de l'HCl 0,1 N ou 1,0 N.
5. Filtrer le milieu dans un récipient stérile sur un filtre à membrane à pores de 0,22 μm , si l'on utilise un compteur de particules, ou sur un filtre à pores de 0,45 μm , si l'on n'utilise pas de compteur de particules.
6. Garder le milieu à l'obscurité, à environ 4 °C jusqu'à son utilisation.
-

Appendice 4

Exemple de méthode de culture des algues**Observations générales**

La méthode suivante s'applique à la culture des algues destinées aux essais de toxicité.

Il convient d'utiliser des méthodes préservant les cultures d'algues de toute contamination bactérienne. Il peut être souhaitable d'établir des cultures axéniques, mais il faut employer des cultures unialgues.

Toutes les opérations doivent être conduites dans des conditions stériles, afin d'éviter toute contamination par des bactéries ou d'autres algues.

Matériel

Voir la rubrique Méthode d'essai: Appareillage

Procédé d'obtention de cultures d'algues*Préparation de solutions nutritives (milieu):*

Tous les sels minéraux du milieu sont préparés sous la forme de solutions mères concentrées et entreposées au frais et à l'abri de la lumière. Ces solutions sont stérilisées par filtration ou à l'autoclave.

On prépare le milieu en ajoutant une quantité correcte de solution mère à de l'eau distillée stérile, en prenant bien soin d'éviter tout risque d'infection. Pour les milieux solides, on ajoute 0,8 % d'agar.

Culture mère:

Les cultures mères qui servent de matériau d'essai initial sont de petites cultures d'algues régulièrement transférées dans un milieu frais. Si les cultures ne sont pas utilisées régulièrement, il convient de les étaler en stries dans des tubes inclinés remplis d'agar. Ces cultures sont transférées dans un milieu frais au moins une fois tous les deux mois.

Les cultures mères sont cultivées dans des erlenmeyers contenant le milieu approprié (volume de quelque 100 ml). Lorsque les algues sont incubées à 20 °C sous un éclairage permanent, un transfert hebdomadaire s'impose.

Lors du transfert, on transvase avec des pipettes stériles une quantité telle de "vieille" culture, dans un flacon de milieu frais, que, pour les espèces à croissance rapide, la concentration initiale est environ 100 fois inférieure à ce qu'elle était dans la vieille culture.

Le taux de croissance d'une espèce peut être déterminé à partir de la courbe de croissance. S'il est connu, il est possible d'estimer la densité à laquelle la culture doit être introduite dans le nouveau milieu. Il convient de le faire avant que la culture atteigne la phase de mort.

Préculture:

La préculture sert à fournir une quantité d'algues suffisante pour l'ensemencement des cultures d'essai. La préculture est incubée dans les conditions de l'essai et utilisée lorsqu'elle est encore en croissance exponentielle, normalement après une période d'incubation de 2 à 4 jours. Si les cultures d'algues renferment des cellules déformées ou anormales, il faut éliminer ces cultures.

Appendice 5

Analyse des données par une régression non linéaire**Considérations générales**

L'effet observé dans les essais sur les algues et autres essais sur la croissance de micro-organismes (augmentation de la biomasse) est, par nature, exprimé par une variable continue ou métrique — le rythme d'un processus si l'on utilise le taux de croissance et son intégrale en fonction du temps si on choisit la biomasse. Ces deux variables sont comparées à l'effet moyen correspondant observé sur des témoins non exposés (représentés en plusieurs exemplaires identiques) manifestant un effet maximal dans les conditions imposées, la lumière et la température étant les principaux facteurs déterminants dans l'essai sur les algues. Le système est distribué ou homogène et la biomasse peut être considérée comme un continuum où il est fait abstraction des cellules individuelles. La distribution de la variance du type d'effet d'un tel système ne dépend que des facteurs expérimentaux (décrits généralement par les distributions log-normales ou normales de l'erreur). Et ce, contrairement aux bioessais classiques où les effets sont exprimés par des réponses par tout ou rien pour lesquelles la tolérance (affichant généralement une distribution binomiale) des organismes individuels est souvent supposée être la composante dominante de la variance. Dans ce cas, l'effet relevé chez les témoins est nul ou assimilé à un niveau de fond.

Dans la situation simple, l'effet normalisé ou relatif, r , diminue de façon monotonique de 1 (inhibition nulle) à 0 (inhibition à 100 %). Notons que tous les effets ont une erreur associée et qu'il est possible de calculer les inhibitions négatives apparentes en considérant qu'elles résultent uniquement de l'erreur aléatoire.

Analyse de la régression*Modèles*

Une analyse de la régression a pour objet de décrire quantitativement la courbe concentration-effet sous la forme d'une fonction mathématique de régression $Y = f(C)$ ou, plus souvent, $F(Z)$ où $Z = \log C$. La fonction inverse, $C = f^{-1}(Y)$ permet de calculer des valeurs de la CE_x , notamment les CE_{50} , CE_{10} et CE_{20} , et leurs limites de confiance à 95 %. Plusieurs fonctions mathématiques simples se sont avérées décrire correctement la relation concentration-effet obtenue dans les essais d'inhibition de la croissance des algues. Parmi ces fonctions, citons l'équation logistique, l'équation asymétrique de Weibul et la distribution log-normale, qui sont toutes des courbes sigmoïdes se rapprochant asymptotiquement de zéro pour $C \rightarrow 0$ et de un pour $C \rightarrow \text{infini}$.

L'utilisation de modèles de fonctions de seuil continues (par exemple le modèle de Kooijman pour "l'inhibition de la croissance de la population", Kooijman et al., 1996) constitue une solution récemment proposée, différente des modèles asymptotiques. Ce modèle suppose qu'il n'y a pas d'effet aux concentrations inférieures à un certain seuil, CE_0+ , estimé par une extrapolation de la relation concentration-effet consistant à intercepter l'axe des concentrations à l'aide d'une fonction continue simple non différentiable au point de départ.

Notons que l'analyse peut être une simple minimisation des sommes des carrés résiduels (en supposant que la variance est constante) ou des carrés pondérés si l'hétérogénéité de la variance est compensée.

Marche à suivre

La procédure peut être résumée comme suit: Sélectionner une équation fonctionnelle appropriée, $Y = f(C)$, et l'ajuster aux données par une régression non linéaire. Utiliser de préférence les mesures relevées dans chaque flacon, plutôt que les moyennes des expériences identiques, afin de tirer un maximum d'informations des données. D'un autre côté, si la variance est élevée, l'expérience pratique nous porte à croire que les moyennes des expériences identiques peuvent fournir une estimation mathématique plus solide, moins influencée par les erreurs systématiques des données, que chaque donnée prise individuellement.

Porter sur un graphique les valeurs mesurées et la courbe ajustée et vérifier si l'ajustement est valable. L'analyse des valeurs résiduelles peut être particulièrement utile à ce propos. Si la fonction choisie pour ajuster la courbe concentration-effet ne décrit pas bien l'ensemble de la courbe ou une partie essentielle de celle-ci, telle que les effets aux faibles concentrations, choisir un autre modèle d'ajustement, par exemple une courbe asymétrique, telle que la fonction de Weibul, à la place d'une fonction symétrique. Les inhibitions négatives peuvent poser un problème, par exemple avec la fonction de distribution log-normale, qui nécessitera, de la même manière, la recherche d'une autre

fonction de régression. Il est déconseillé d'assigner une valeur nulle ou une faible valeur positive à ces valeurs négatives parce que cela déforme la distribution des erreurs. Il peut être utile de procéder à des ajustements séparés sur des portions de la courbe telles que celle où l'inhibition est faible, afin d'estimer les valeurs de $CE_{x \text{ faibles}}$. En partant de l'équation ajustée (par "estimation inverse", $C = f^{-1}(Y)$), calculer des estimations ponctuelles caractéristiques des CE_x et rapporter au moins la CE_{50} et une ou deux $CE_{x \text{ faibles}}$. La pratique des essais a montré que la précision de l'essai sur les algues permet normalement d'effectuer une estimation raisonnablement précise au seuil de 10 % d'inhibition si les points dont on dispose sont en nombre suffisant — à moins qu'une stimulation ne survienne aux faibles concentrations, ce qui créerait une confusion. La précision de l'estimation de la CE_{20} est souvent bien meilleure que celle de la CE_{10} , parce que la CE_{20} se situe généralement sur la partie à peu près linéaire de la courbe concentration-effet centrale. Quelquefois, la CE_{10} peut être difficile à interpréter à cause de la stimulation de la croissance. De sorte que, même si la CE_{10} s'obtient généralement avec une précision suffisante, il est toujours recommandé de mentionner également la CE_{20} .

Facteurs de pondération

En général, la variance expérimentale n'est pas constante et inclut une composante proportionnelle, d'où l'intérêt de procéder d'office à une régression pondérée. Les facteurs de pondération s'appliquant à une telle analyse sont normalement supposés être inversement proportionnels à la variance:

$$W_i = 1/\text{Var}(r_i)$$

De nombreux programmes de régression permettent d'effectuer une analyse de la régression pondérée avec des facteurs de pondération repris dans un tableau. Pour se simplifier la tâche, il faudrait normaliser les facteurs de pondération en les multipliant par $n/\sum w_i$ (n étant le nombre de données) de telle sorte que leur somme soit égale à un.

Normalisation des valeurs prises par les effets

La normalisation par la valeur moyenne de l'effet sur les témoins donne lieu à certains problèmes de principe et à une structure de variance plutôt compliquée. En divisant les valeurs par la valeur moyenne des témoins en vue d'obtenir le pourcentage d'inhibition, on introduit une erreur supplémentaire due à l'erreur sur la moyenne des témoins. À moins que cette erreur soit négligeable, les facteurs de pondération appliqués à la régression et les limites de confiance doivent être corrigés en fonction de la covariance avec le témoin (Draper and Smith, 1981). Notons qu'il est important d'obtenir une précision élevée pour la moyenne estimée des valeurs affichées par les témoins, afin de minimiser la variance globale de l'effet relatif. Cette variance se calcule comme suit:

(l'indice i se réfère au niveau de concentration i et l'indice 0 aux témoins):

$$Y_i = \text{effet relatif} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

avec une variance $\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \approx (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + ((\partial Y_i / \partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0))$

et comme $(\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0$ and $(\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$

avec des données à distribution normale et des expériences identiques m_i et m_0 : $\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$

la variance totale de l'effet relatif Y_i devient donc

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

L'erreur sur la moyenne du témoin est inversement proportionnelle à la racine carrée du nombre d'expériences identiques du témoin prises en compte dans la moyenne, et il est quelquefois justifié d'inclure des données antérieures, ce qui réduit considérablement l'erreur. Il est également possible de ne pas normaliser les données ni d'ajuster les effets absolus, y compris l'effet affiché par le témoin, mais d'introduire la valeur de l'effet prise par le témoin en tant que paramètre supplémentaire à ajuster par une régression non linéaire. Avec une équation de régression ordinaire à deux paramètres, cette méthode requiert l'ajustement de trois paramètres et demande, par conséquent, plus de points qu'une régression non linéaire pratiquée sur des données normalisées à l'aide d'une valeur de l'effet prise par le témoin déterminée à l'avance.

Intervalles de confiance inverses

Le calcul des intervalles de confiance d'une régression non linéaire par une estimation inverse est assez complexe et ne figure généralement pas parmi les options livrées avec les programmes courants de calcul statistique. Des limites de confiance approximatives peuvent être obtenues avec des programmes classiques de régression non linéaire, à l'aide d'une reparamétrisation (Bruce et Versteeg, 1992), consistant à reformuler l'équation mathématique en prenant les estimations ponctuelles désirées, par exemple la CE_{10} et la CE_{50} , comme paramètres à estimer. Soit la fonction $I = f(\alpha, \beta, \text{concentration})$, utilisons les relations de définition $f(\alpha, \beta, CE_{10}) = 0,1$ et $f(\alpha, \beta, CE_{50}) = 0,5$ pour remplacer $f(\alpha, \beta, \text{concentration})$ par une fonction équivalente $g(CE_{10}, CE_{50}, \text{concentration})$.

Il existe un calcul plus direct (Andersen et al., 1998) effectué en conservant l'équation d'origine et en appliquant une expansion de Taylor autour des moyennes de r_1 et r_0 .

Les procédés par bootstrap, introduits récemment, sont appréciés. Ces procédés utilisent les données mesurées et un rééchantillonnage fréquent dirigé par un générateur de nombre aléatoire, pour estimer une distribution empirique de la variance. Références:

BIBLIOGRAPHIE

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

Draper, N.R. and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, New York.

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Chem. Chem.* 11, 1485-1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.

- 4) Le chapitre C.11 est remplacé par le texte suivant:

«C.11. BOUE ACTIVÉE, ESSAI D'INHIBITION DE LA RESPIRATION (OXYDATION DU CARBONE ET DE L'AMMONIUM)

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 209 (2010) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Cette méthode d'essai décrit une méthode pour déterminer les effets d'une substance chimique sur les microorganismes des boues activées (essentiellement des bactéries) en mesurant leur taux de respiration (oxydation du carbone et/ou de l'ammonium) dans des conditions données, en présence de différentes concentrations de la substance chimique d'essai. Cette méthode a été établie à partir de l'essai mis au point par l'ETAD (Association écologique et toxicologique des fabricants de teintures) (1) (2), de la précédente ligne directrice 209 de l'OCDE (3) et de la norme ISO 8192 révisée (4). L'objectif de cette méthode de fournir une méthode d'évaluation rapide des effets de substances chimiques sur les microorganismes des boues activées lors de l'étape biologique (aérobie) du processus de traitement des eaux usées en station d'épuration. Les résultats de l'essai peuvent également indiquer les concentrations non inhibitrices des substances chimiques d'essai à utiliser dans les essais de biodégradabilité (par exemple, chapitres C.4 A à F, C.9, C.10, C.12 et C.29 de la présente annexe, ligne directrice 302C de l'OCDE). L'essai se déroule alors comme un essai de dépistage, similaire à un essai préliminaire de détermination des concentrations ou essai limite (voir paragraphe 39), seule la respiration totale étant prise en compte. Cependant, il convient de prendre cette indication en compte avec précaution pour les essais de biodégradation facile (chapitre C.4 A à F et C.29 de la présente annexe) pour lesquels la concentration de l'inoculum est nettement plus faible que celle prévue par la présente méthode d'essai. En fait, l'absence d'inhibition dans cet essai de respiration ne se traduit pas automatiquement par des conditions non inhibitrices dans les essais de biodégradation facile des chapitres C.4 A à F ou C.29 de la présente annexe.

2. Globalement, l'essai d'inhibition de la respiration semble avoir été appliqué avec succès depuis sa première publication, mais dans quelques cas des résultats erronés ont été rapportés (2) (4) (5). Ainsi, les courbes de respiration en fonction de la concentration sont parfois diphasiques, les tracés dose-effet peuvent être faussés et les CE_{50} sont parfois bien plus faibles que prévu (5). Des recherches ont montré que ces résultats apparaissent pour des boues activées fortement nitrifiantes et quand la substance d'essai affecte davantage l'oxydation de l'ammonium que l'oxydation générale hétérotrophe. Il est donc possible de rectifier les résultats faussés en procédant à un essai supplémentaire faisant appel à un inhibiteur spécifique de la nitrification. En quantifiant l'oxygène consommé en présence et en absence d'un inhibiteur de ce type, comme la N-allylthiourée (ATU), on peut calculer les consommations respectives de l'oxydation totale, hétérotrophe et de la nitrification (4) (7) (8). Il est alors possible de déduire l'inhibition induite par la substance d'essai sur les deux mécanismes, ainsi que les CE_{50} pour l'oxydation du carbone organique (hétérotrophe) et de l'ammonium (nitrification) d'après la méthode classique. Notons que dans certains cas rares, l'action inhibitrice de la N-allylthiourée peut être partiellement, voire complètement, annulée si elle forme des complexes avec des substances d'essai ou des adjuvants du milieu, par exemple les ions Cu^{++} (6). Les ions Cu^{++} sont essentiels aux *nitrosomonas*, mais toxiques à plus forte concentration.
3. La nitrification est une étape nécessaire pour éliminer les composés azotés des eaux usées en produisant des espèces gazeuses. Les besoins d'un tel procédé sont aujourd'hui particulièrement pressants pour le traitement aérobie des eaux usées dans les pays de l'UE, les autorités européennes ayant en effet revu à la baisse les concentrations maximales d'azote dans les effluents traités et déversés dans les eaux réceptrices (¹).
4. En général, la méthode consistant à évaluer seulement l'effet sur les mécanismes d'oxydation du carbone organique convient tout à fait. Certains cas exigent néanmoins d'examiner l'impact sur la nitrification seule, ou sur la nitrification et l'oxydation du carbone organique séparément, afin d'interpréter les résultats et de comprendre les effets observés.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

5. Les taux de respiration d'échantillons de boue activée mis en contact pendant 3 heures avec une eau usée reconstituée sont mesurés dans une cellule hermétique contenant une électrode à oxygène. En fonction d'un scénario d'exposition réaliste, un temps de contact supérieur pourrait s'avérer pertinent. Si la substance d'essai est rapidement dégradée, notamment par hydrolyse abiotique, ou présente une volatilité ne permettant pas de maintenir une concentration fixe, il est possible d'utiliser en plus un temps d'exposition plus court, de 30 minutes par exemple. La sensibilité de chaque lot de boue activée est vérifiée à l'aide d'une substance de référence appropriée le jour de l'exposition. L'essai sert généralement à déterminer la CE_x (par exemple CE_{50}) de la substance d'essai et/ou sa concentration sans effet observé (CSEO).
6. Il est possible de déterminer séparément l'inhibition de la consommation d'oxygène des microorganismes qui oxydent le carbone organique et celle des micro-organismes qui oxydent l'ammonium en mesurant les taux de consommation d'oxygène en présence et en absence de N-allylthiourée, un inhibiteur spécifique de la première étape d'oxydation de l'ammonium en nitrites par les bactéries nitrifiantes. Dans ce cas, le pourcentage d'inhibition du taux de consommation d'oxygène est calculé par comparaison du taux de consommation d'oxygène en présence de la substance d'essai et du taux moyen de consommation d'oxygène des témoins associés ne contenant pas la substance chimique étudiée, en présence et en absence d'un inhibiteur spécifique, la N-allylthiourée.
7. La quantification du taux de consommation d'oxygène pour un mélange aqueux comprenant la substance d'essai et une eau usée reconstituée, sans boue activée, permet de déterminer toute consommation d'oxygène découlant de mécanismes abiotiques.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

8. Il est nécessaire de connaître les données concernant l'identification de la substance chimique d'essai (de préférence son numéro CAS), son nom (IUPAC), et ses caractéristiques de pureté, de solubilité aqueuse, de pression de vapeur, de volatilité et d'adsorption, pour interpréter correctement les résultats. En général, cet essai ne convient pas aux composés volatils à moins de prendre certaines précautions (voir paragraphe 21).

(¹) Directive 91/271/CEE du Conseil du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux urbaines résiduaires (JO L 135 du 30.5.1991, p. 40).

CHAMP D'APPLICATION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

9. Cette méthode convient aux substances hydrosolubles, peu solubles et volatiles. Il n'est toutefois pas toujours possible d'obtenir les CE_{50} de produits chimiques peu solubles, et les résultats ne seront valides que si la majeure partie (p. ex. plus de 80 %) des substances volatiles restent dans le mélange réactionnel à la fin de la (des) période(s) d'exposition. D'autres données d'analyse sont présentées pour affiner l'estimation de la CE_x (concentration efficace à x %) quand la stabilité ou la volatilité de la substance d'essai sont sujettes à caution.

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

10. Les substances chimiques de référence font l'objet d'essais périodiques afin de garantir la fiabilité de la méthode et des conditions d'essai, et de vérifier la sensibilité de chaque lot de boue activée utilisée comme inoculum microbien le jour de l'exposition. La substance de référence recommandée en matière d'inhibition est le 3,5-dichlorophénol (3,5-DCP): son action inhibitrice sur la respiration est bien connue, et elle est employée dans nombre d'essais d'inhibition/de toxicité (4). Le sulfate de cuivre (II) pentahydraté peut également servir de substance de référence pour l'inhibition de la respiration totale (9). La N-méthylaniline peut servir de référence pour inhiber spécifiquement la nitrification (4).

CRITÈRES DE VALIDITÉ ET REPRODUCTIBILITÉ

11. Le taux de consommation d'oxygène des témoins à blanc (dépourvus de substance chimique d'essai ou de référence) ne tombe pas en deçà de 20 mg d'oxygène par gramme de boue activée (en poids sec des solides en suspension) et par heure. Si cette valeur est inférieure, l'essai est répété avec une boue activée lavée ou une boue issue d'une autre source. Le coefficient de variation du taux de consommation d'oxygène dans les témoins répliqués ne dépasse pas 30 % à l'issue de l'essai final.
12. D'après les résultats d'un essai circulaire international organisé en 2004 par l'ISO (4) et faisant appel à une boue activée dérivée d'eaux usées domestiques, la CE_{50} du 3,5-DCP se situerait entre 2 mg/l et 25 mg/l pour la respiration totale, 5 mg/l et 40 mg/l pour la respiration hétérotrophe et entre 0,1 mg/l et 10 mg/l pour la respiration liée à la nitrification. Si la CE_{50} du 3,5-DCP est hors de la fourchette attendue, il convient de répéter l'essai avec une boue activée de source différente. La CE_{50} du sulfate de cuivre (II) pentahydraté est comprise entre 53 et 155 mg/l pour la respiration totale (9).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Récipients et appareils expérimentaux

13. L'utilisation de matériel courant de laboratoire et de l'équipement suivant est nécessaire:
- a) Récipients d'essai — par exemple, béciers de 1 000 ml pour accueillir 500 ml de mélange réactionnel (voir élément 5 du graphique 1);
 - b) Cellules et moyens de fixation pour mesurer la concentration de l'oxygène dissous; électrode à oxygène appropriée; cellule hermétique destinée à contenir l'échantillon sans laisser d'espace vide et équipée d'un enregistreur (par exemple éléments 7, 8, 9 du graphique 1 de l'Appendice 2). Un flacon DBO est aussi envisageable, avec un adaptateur de rodage permettant de fixer hermétiquement l'électrode à oxygène au col du flacon (voir graphique 2 de l'Appendice 3). Pour éviter de perdre du liquide par débordement lors de l'insertion de l'électrode à oxygène, il est conseillé d'introduire au préalable un entonnoir ou un tube de verre dans le flacon, ou d'utiliser des récipients à rebords évasés. Quelle que soit l'option retenue, il convient d'employer un agitateur magnétique ou un autre moyen d'agitation, par exemple une sonde autoagitatrice;
 - c) Agitateurs magnétiques et barreaux aimantés avec revêtement inerte, utilisables dans la chambre de mesure et/ou les récipients d'essai;
 - d) Dispositif d'aération: s'il y a lieu, on fait circuler l'air comprimé à travers un filtre adapté pour éliminer les poussières et huiles, puis des bulleurs contenant de l'eau afin de l'humidifier. Le contenu des récipients est aéré à l'aide de pipettes Pasteur, ou de tout autre système d'aération n'entraînant pas l'adsorption des produits chimiques. Il est possible d'employer un agitateur orbital à une vitesse située entre 150 et 250 rpm avec des flacons de 2 000 ml, par exemple, ce qui permet de répondre à la demande en oxygène des boues et de contourner les difficultés liées aux substances chimiques qui moussent trop, aux composés volatils s'échappant du milieu réactionnel, ou aux matières difficiles à disperser par bullage d'air. Le système d'essai se compose généralement d'un certain nombre de béciers aérés en continu et mis en place à intervalles réguliers (par exemple toutes les 10 – 15 minutes environ), puis analysés de manière séquentielle. Toute instrumentation validée permettant à la fois d'aérer les milieux réactionnels et de quantifier le taux de consommation d'oxygène des mélanges est également envisageable;

- e) pH-mètre;
- f) Centrifugeuse, centrifugeuse de laboratoire classique pour boue capable d'accélérer à 10 000 m/s².

Réactifs

14. On utilisera des réactifs de qualité analytique tout au long de l'essai.

Eau

15. On emploiera de l'eau distillée ou désionisée contenant moins de 1 mg/l de COD, sauf mention contraire en faveur d'eau du robinet non chlorée.

Eau usée reconstituée

16. La composition qualitative et quantitative du milieu sera la suivante:

— peptone	16 g
— extrait de viande (ou extrait végétal comparable)	11 g
— urée	3 g
— chlorure de sodium (NaCl)	0,7 g
— chlorure de calcium dihydraté (CaCl ₂ , 2H ₂ O)	0,4 g
— sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	0,2 g
— hydrogénophosphate de potassium anhydre (K ₂ HPO ₄)	2, 8 g
— eau distillée ou désionisée q.s.p. 1 litre	

17. Le pH de cette solution est de $7,5 \pm 0,5$. Si le milieu ainsi préparé n'est pas utilisé immédiatement, il convient de le conserver à l'abri de la lumière entre 0 °C et 4 °C, pendant une semaine maximum, ou dans des conditions n'altérant pas sa composition. Il est important de noter que cette eau usée reconstituée est 100 fois plus concentrée que celle qui est décrite dans le Rapport technique de l'OCDE du 11 juin 1976 "Méthode proposée pour la détermination de la biodégradabilité des agents tensio-actifs utilisés dans les détergents synthétiques", et contient en plus du phosphate dipotassique.
18. On peut également choisir de stériliser les composants du milieu séparément avant le stockage, ou d'ajouter la peptone et l'extrait de viande peu avant d'entamer l'essai. Préalablement à toute utilisation, le milieu sera soigneusement mélangé et son pH ajusté à $7,5 \pm 0,5$, s'il y a lieu.

Substance chimique d'essai

19. Une solution mère est préparée pour les substances chimiques d'essai facilement hydrosolubles, à une concentration n'excédant pas la limite de solubilité dans l'eau (pour éviter toute précipitation). Les produits peu solubles dans l'eau, les mélanges dont les composants présentent différentes solubilités aqueuses et les substances adsorbantes sont pesés directement dans le récipient d'essai. Dans ces cas, le recours à des solutions mères peut constituer une option valable si les concentrations des solutés étudiés dans les récipients d'essai sont analysées (avant l'ajout de la boue activée). Si l'on prépare des fractions solubilisées dans l'eau [water accomodated fractions] (WAF), il est également essentiel de titrer la solution dans les récipients pour les différentes substances d'essai. On évitera d'employer des solvants organiques ou des dispersants/émulsifiants pour améliorer la solubilité. Il est possible de traiter les solutions mères aux ultrasons et d'agiter les suspensions préalablement, par exemple la nuit précédente, si la stabilité de la substance chimique d'essai dans ces conditions est attestée par des données pertinentes.
20. La substance chimique d'essai est susceptible d'affecter le pH du dispositif d'essai. Avant de procéder à l'essai, il convient donc de déterminer le pH de mélanges ayant reçu la même substance, au cours d'un essai préliminaire visant à s'assurer de l'opportunité d'un ajustement du pH préalablement à l'essai principal, puis le jour de son déroulement. Les solutions/suspensions aqueuses de la substance chimique d'essai sont neutralisées avant l'ajout de l'inoculum, s'il y a lieu. Cependant, cette neutralisation étant susceptible de modifier les propriétés chimiques de la substance étudiée, des essais supplémentaires sont envisageables, selon la finalité de l'étude, afin d'évaluer l'effet de la substance chimique d'essai sur la boue quand le pH n'est pas ajusté.

21. La toxicité des substances chimiques volatiles, en particulièrement dans les dispositifs d'essai avec barbotage, peut varier en intensité en raison de pertes de substance pendant la période d'exposition. La prudence est donc de mise avec de telles espèces, ce qui se traduit par l'analyse spécifique des composés en question dans des mélanges témoins, et par une modification du régime d'aération.

Substance chimique de référence

22. Si le 3,5-dichlorophénol sert de substance de référence, une dilution est préparée avec 1,00 g de 3,5- dichlorophénol dans 1 000 ml d'eau (15). La dissolution est accélérée par un traitement aux ultrasons ou une température de l'eau élevée, la solution n'étant portée à son volume final qu'après refroidissement à température ambiante. Il convient toutefois de s'assurer que la structure de la substance de référence n'est pas modifiée. Le pH de la solution est vérifié et ajusté à pH 7 — 8, le cas échéant, avec NaOH ou H₂SO₄.
23. Si le sulfate de cuivre (II) pentahydraté sert de référence, il est préparé dans des solutions concentrées à 58 mg/l, 100 mg/l et 180 mg/l (facteur de 1,8). La substance est pesée directement dans les récipients d'essai (29, 50 et 90 mg respectivement dans des récipients de 500 ml). Elle est ensuite dissoute dans 234 ml d'eau du robinet stérilisée par autoclave. Le sulfate de cuivre (II) pentahydraté se dissout facilement. Une fois l'essai lancé, on ajoute 16 ml d'eau usée reconstituée et 250 ml de boue activée.

Inhibiteur spécifique de la nitrification

24. On prépare une solution mère de N-allylthiourée (ATU) concentrée à 2,32 g/l. Si l'on ajoute 2,5 ml de cette solution mère dans un mélange d'incubation de volume final 500 ml, la concentration résultante d'ATU est alors de 11,6 mg/l (10⁻⁴ mol/l), une teneur suffisante (4) pour inhiber 100 % de la nitrification dans une boue activée nitrifiante contenant 1,5 g/l de solides en suspension.

Témoin abiotique

25. Dans certaines conditions peu fréquentes, une substance chimique d'essai fortement réductrice peut entraîner une consommation d'oxygène abiotique quantifiable. Des témoins abiotiques sont alors nécessaires pour distinguer la consommation d'oxygène abiotique due à la substance d'essai et la respiration microbienne. Les témoins abiotiques peuvent avoir la même composition que les mélanges d'essai à l'exception de l'inoculum. De façon similaire, il est possible d'inclure des témoins abiotiques dépourvus d'inoculum lors de l'analyse de la concentration obtenue pendant la phase d'exposition de l'essai. C'est notamment le cas lorsqu'on a fait appel à des solutions mères de substances peu hydrosolubles avec des composés présentant des solubilités aqueuses différentes. Certains cas particuliers peuvent exiger la préparation d'un témoin abiotique contenant un inoculum stérilisé (par exemple par autoclave, ou par ajout d'agents toxiques stérilisants). Certaines substances chimiques sont susceptibles de synthétiser ou de consommer de l'oxygène, à condition que l'interface réactionnelle soit suffisamment importante, même si elles nécessitent normalement une température ou une pression bien supérieure pour que la réaction ait lieu. À cet égard, les substances de type peroxy feront l'objet d'une attention particulière. Un inoculum stérilisé présente une importante aire superficielle.

Inoculum

26. Pour une utilisation courante, la boue activée est collectée à la sortie, ou près de la sortie, du bassin d'aération d'une station d'épuration fonctionnelle traitant essentiellement des eaux usées domestiques. En fonction de la finalité de l'essai, on peut aussi envisager d'employer d'autres types ou sources de boue activée adaptés, par exemple de la boue reconstituée en laboratoire, avec une concentration de solides en suspension située entre 2 g/l et 4 g/l. Les boues issues de différentes stations d'épuration sont cependant susceptibles de présenter des caractéristiques et sensibilités différentes.
27. La boue peut être utilisée telle quelle, mais les particules grossières seront éliminées en laissant reposer la boue entre 5 et 15 minutes, par exemple, afin de séparer la fraction supérieure contenant les particules fines après décantation ou tamisage (tamis de maille 1 mm², par exemple). Une autre option consiste à homogénéiser la boue au mixer pendant environ 15 secondes ou plus, mais la prudence est alors de mise dans la mesure où un mixage trop long peut se traduire par des variations de température et des forces de cisaillement.

28. Il est souvent nécessaire de laver la boue, notamment quand le taux de respiration endogène est faible. Pour cela, la boue est d'abord centrifugée suffisamment longtemps pour faire apparaître un surnageant clair et des culots de résidus solides d'épuration, par exemple 10 minutes à environ 10 000 m/s². La phase liquide surnageante est éliminée, puis la boue est remise en suspension par agitation dans de l'eau du robinet non chlorée. Cette eau de lavage est alors éliminée par centrifugation, comme précédemment. Si nécessaire, les étapes de lavage et de centrifugation sont répétées. On détermine le poids sec compris dans un volume donné de boue (constituée des solides remis en suspension), laquelle est alors concentrée par élimination de la fraction liquide ou au contraire diluée dans de l'eau du robinet non chlorée de façon à obtenir la concentration de solides requise, soit 3 g/l. La boue activée est aérée en continu (par exemple au débit de 2 l/min) à la température de l'essai et, si possible, utilisée le jour même de sa collecte. Dans le cas contraire, la boue est alimentée quotidiennement avec une eau usée reconstituée (50 ml d'eau usée reconstituée par litre de boue activée) pendant deux jours supplémentaires. On soumet alors la boue à l'essai, dont les résultats sont considérés comme valides si aucune variation significative de l'activité de la boue n'a été observée, d'après les taux de respiration hétérotrophe d'une part, et de respiration liée à la nitrification d'autre part.
29. Pendant l'incubation, l'apparition d'une mousse suffisamment abondante pour transporter les particules et déborder du récipient d'aération peut causer des difficultés. C'est parfois simplement la présence de l'eau usée reconstituée qui occasionne la formation de mousse, mais ce phénomène devrait être anticipé si la substance chimique d'essai présente des propriétés tensio-actives ou contient un tensio-actif. La perte de résidus solides de la boue dans le mélange d'essai se traduit par des taux de respiration artificiellement réduits, susceptibles d'être faussement interprétés comme l'effet d'une inhibition. En outre, l'aération d'une solution de tensio-actifs concentre ces composés dans la couche de mousse; si celle-ci est éliminée du dispositif d'essai, les concentrations d'exposition sont alors plus faibles. Ce moussage est maîtrisable à l'aide de méthodes mécaniques simples (par exemple en agitant le mélange à la main avec — une barre de verre, de temps en temps) ou en ajoutant une émulsion siliconée sans tensio-actifs contenant un agent antimoissant et/ou en choisissant un type d'aération par agitation des flacons. Si le problème est lié à la présence d'eau usée reconstituée, la composition de cette dernière est modifiée par ajout d'un agent antimoissant à une proportion de 50 µl/l, par exemple. Lorsque c'est la substance chimique d'essai qui est à l'origine du moussage, la quantité nécessaire à l'effondrement de la mousse est déterminée pour la concentration maximale, chaque récipient étant ensuite traité avec cette même quantité (y compris ceux qui ne contiennent pas de mousse, comme les témoins à blanc et les récipients de référence). L'agent antimoissant éventuellement employé ne devrait pas interagir avec l'inoculum et/ou la substance d'essai.

MODE OPÉRATOIRE

30. L'inhibition peut être quantifiée pour trois types de consommation d'oxygène: totale, hétérotrophe et liée à la nitrification. La mesure de la consommation d'oxygène totale est généralement suffisante. Néanmoins, il convient de déterminer les effets sur la consommation d'oxygène hétérotrophe liée à l'oxydation du carbone organique d'une part, et à l'oxydation de l'ammonium d'autre part, lorsque certaines substances spécifiques exigent l'évaluation de ces deux critères supplémentaires ou (le cas échéant) pour expliquer des courbes dose-effet atypiques en matière d'inhibition de la consommation d'oxygène totale.

Conditions d'essai

31. L'essai est mené à une température de 20 ± 2 °C.

Mélanges d'essai

32. Les mélanges d'essai (notés F_T au tableau 1) contenant de l'eau, de l'eau usée reconstituée et la substance chimique d'essai, sont préparés de façon à obtenir différentes concentrations nominales de la substance chimique d'essai (voir au tableau 1 des exemples de volume des composants). Le pH est ajusté à $7,5 \pm 0,5$, s'il y a lieu; on dilue les mélanges avec de l'eau et on ajoute de l'inoculum pour obtenir les mêmes volumes finals dans les récipients et ensuite lancer l'aération.

Mélanges de référence

33. La préparation des mélanges de référence (notés F_R) est la même que celle des mélanges d'essai, la substance chimique d'essai étant remplacée par la substance chimique de référence, par exemple le 3,5-dichlorophénol.

Témoins à blanc

34. Les témoins à blanc (notés F_B) sont préparés au début et à la fin de la période d'exposition dans les essais pour lesquels les béchers sont mis en place en série, à intervalles réguliers. Pour les systèmes d'essai faisant appel à un équipement permettant de quantifier simultanément différentes consommations d'oxygène, on inclura au moins deux témoins à blanc dans chaque lot d'analyse simultanée. Les témoins à blanc contiennent un volume égal de boue activée et de milieu reconstitué, mais sont exempts de substance chimique d'essai ou de référence. Le volume d'eau dilution est le même pour les mélanges témoins, d'essai et de référence.

Témoin abiotique

35. Lorsque cela est nécessaire, notamment pour une substance chimique d'essai fortement réductrice ou soupçonnée de présenter de telles propriétés, on préparera un mélange F_A afin de mesurer la consommation d'oxygène abiotique. Ce mélange présentera les mêmes quantités de substance chimique d'essai et d'eau usée reconstituée et le même volume que les mélanges d'essai, mais ne contiendra pas de boue activée.

Procédure générale et mesures

36. Les mélanges d'essai et de référence ainsi que les témoins à blanc et abiotiques sont incubés à la température d'essai en conditions d'aération forcée (0,5 - 1 l/min) de manière à maintenir une concentration d'oxygène dissous supérieure à 60 - 70 % de la saturation, et assurer la dispersion correcte des flocons de boue. Il est aussi nécessaire d'agiter les cultures pour maintenir les flocons de boue en suspension. On considère que l'incubation débute à l'instant où l'inoculum de la boue activée entre en contact avec les autres constituants du mélange final. À la fin de l'incubation, c'est-à-dire à l'issue d'une période d'exposition généralement fixée à 3 heures, on retire les échantillons pour mesurer la vitesse de diminution de la concentration d'oxygène dissous dans la cellule prévue à cet effet (graphique 2 de l'Appendice 3) ou dans un flacon DBO entièrement rempli. La façon dont les incubations commencent dépend aussi de la capacité de l'équipement choisi de mesurer les taux de consommation d'oxygène. Par exemple, si l'équipement comprend une seule sonde à oxygène, les mesures sont réalisées individuellement. Dans ce cas, on préparera les différents mélanges nécessaires à l'essai avec eau usée reconstituée sans y ajouter l'inoculum, les quantités de boue appropriées n'étant ajoutées qu'ensuite dans chaque récipient de la série. Les incubations sont donc lancées successivement aux intervalles adéquats, par exemple toutes les 10 à 15 minutes. Inversement, le dispositif de mesure peut comprendre plusieurs sondes facilitant les mesures multiples en parallèle; dans ce cas, l'inoculum peut être ajouté au même moment dans les groupes de récipients appropriés.
37. La concentration nominale de solides en suspension dans la boue activée est de 1,5 g/l dans tous les mélanges d'essai, de référence et les témoins à blanc (mais pas dans le témoin abiotique). La consommation d'oxygène est mesurée après 3 heures d'exposition. Le cas échéant, il est envisageable de réaliser les mesures après 30 minutes d'exposition supplémentaires, dans les conditions détaillées au paragraphe 5.

Pouvoir nitrifiant de la boue

38. Les éventuelles propriétés nitrifiantes de la boue seront mises en lumière et, le cas échéant, quantifiées à l'aide de mélanges (F_B) similaires à ceux du témoin à blanc et des autres mélanges témoins (F_N), avec pour composant supplémentaire la N-allylthiourée à 11,6 mg/l. Ces mélanges seront aérés et incubés à $20^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ pendant 3 heures. On calculera alors les taux de consommation d'oxygène, dont on déduira le taux de consommation d'oxygène liée à la nitrification.

Modèles d'essai

Essai de détermination de l'ordre de grandeur

39. Il pourra être nécessaire de réaliser un essai préliminaire pour estimer l'ordre de grandeur des concentrations de substance d'essai à utiliser dans l'essai final d'inhibition de la consommation d'oxygène. Inversement, l'absence d'inhibition de la consommation d'oxygène par la substance étudiée lors de l'essai préliminaire peut démontrer que l'essai final est inutile. Cependant, des tripliquats présentant la concentration d'essai la plus élevée de celles utilisées dans l'essai préliminaire (généralement 1 000 mg/l, cette valeur dépendant toutefois des spécifications de l'équipement) sont inclus.

Tableau

Exemples de mélanges destinés à l'essai préliminaire

Réactifs	Concentration d'origine				
Solution mère de la substance chimique d'essai	10 g/l				
Solution mère de milieu reconstitué	Voir paragraphe 16				
Suspension mère de boue activée	3 g/l de solides en suspension				
Composants des mélanges	Quantité dans les récipients d'essai ^(a)				
	F _{T1}	F _{T2}	F _{T3-5}	F _{B1-2}	F _A
Solution mère de la substance chimique d'essai (ml) (paragraphe 19 à 21)	0,5	5	50	0	50
Solution mère de milieu reconstitué (ml) (paragraphe 16)	16	16	16	16	16
Suspension de boue activée (ml) (paragraphe 26 à 29)	250	250	250	250	0
Eau (paragraphe 15)	233,5	229	184	234	434
Volume total des mélanges (ml)	500	500	500	500	500
Concentrations dans le mélange					
Suspension d'essai (mg/l)	10	100	1 000	0	1 000
Boue activée (solides en suspension) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

^(a) La même procédure sera suivie avec les substances chimiques de référence, pour préparer les flacons F_{R1-3}

40. L'essai comprendra au moins trois concentrations de la substance chimique étudiée, par exemple 10 mg/l, 100 mg/l et 1 000 mg/l avec un témoin à blanc et, si nécessaire, au moins trois témoins abiotiques à la concentration de substance chimique d'essai maximum (voir un exemple tableau 1). Dans l'idéal, la concentration la plus basse employée ne devrait pas avoir d'effet sur la consommation d'oxygène. S'il y a lieu, on calculera les taux de consommation d'oxygène et le taux de nitrification, puis le pourcentage d'inhibition. En fonction de l'objectif de l'essai, il est aussi possible de déterminer simplement la toxicité d'une concentration limite, par exemple 1 000 mg/l. Si aucune toxicité n'est révélée de façon statistiquement significative à cette concentration, il ne sera pas nécessaire de réaliser de nouveaux essais à des concentrations supérieures ou inférieures. Il convient de noter que les produits peu solubles dans l'eau, les mélanges dont les composants présentent différentes solubilités aqueuses et les substances adsorbantes sont pesés directement dans le récipient d'essai. Dans ce cas, le volume réservé à la solution mère de la substance d'essai sera remplacé par de l'eau de dilution.

*Essai final***Inhibition de la consommation d'oxygène totale**

41. La série de concentrations utilisée pour l'essai découle des résultats de l'essai préliminaire. Pour obtenir une CSEO et une CE_x (par exemple CE₅₀), il est recommandé, dans la plupart des cas, d'utiliser six témoins et cinq concentrations d'essai suivant une série géométrique, avec cinq répliquats. Le témoin abiotique n'a pas besoin d'être répété si l'essai préliminaire n'a révélé aucune consommation d'oxygène significative. Dans le cas contraire, il convient d'inclure des témoins abiotiques pour chaque concentration de substance chimique d'essai. La sensibilité de la boue est évaluée à l'aide d'une substance de référence, le 3,5- dichlorophénol. Cette évaluation est effectuée sur chacune des séries de l'essai dans la mesure où la sensibilité est connue pour fluctuer. Dans tous les cas, on prélève des échantillons dans les récipients d'essai au bout de 3 heures, ou 3 heures et demie s'il y a lieu, afin de mesurer le taux de consommation d'oxygène dans la cellule équipée d'une électrode à oxygène. Les taux de respiration respectifs des mélanges témoins et expérimentaux sont déduits des valeurs collectées, et le pourcentage d'inhibition est calculé d'après l'équation 7 ci-après.

Distinction entre l'inhibition de respiration hétérotrophe et la nitrification

42. En recourant à un agent qui inhibe spécifiquement la nitrification, l'ATU, il est possible d'évaluer directement l'effet inhibiteur d'une substance chimique d'essai sur l'oxydation hétérotrophe. Par ailleurs, en soustrayant le taux de consommation d'oxygène en présence d'ATU au taux de consommation d'oxygène total (sans ATU), il est possible de déduire l'impact sur le taux de nitrification. Deux séries de mélanges réactionnels sont préparées conformément aux protocoles de détermination des CE_x ou CSEO décrits au paragraphe 41, avec toutefois un composant supplémentaire, l'ATU, qu'il convient d'ajouter à chaque mélange d'une des deux séries de manière à obtenir une concentration finale de 11,6 mg/L, dont il a été démontré qu'elle inhibe complètement la nitrification dans les boues contenant des concentrations de solides en suspension pouvant aller jusqu'à 3 000 mg/l (4). Les taux de consommation d'oxygène sont mesurés à l'issue de la période d'exposition; ces valeurs directes représentent uniquement la respiration hétérotrophe, les différences entre ces résultats et les taux de respiration totale associés correspondant à la nitrification. On calcule alors les différents degrés d'inhibition.

Mesures

43. Après la ou les périodes d'exposition, un échantillon prélevé dans le premier récipient aéré est transféré dans la cellule équipée d'une électrode à oxygène (graphique 1 de l'Appendice 2) pour une mesure immédiate de la concentration en oxygène dissous. Si l'on dispose d'un système à plusieurs électrodes, ces mesures peuvent être effectuées simultanément. Il est essentiel d'agiter (à l'aide d'un barreau aimanté inerte) à la même vitesse que celle appliquée lors de l'étalonnage de l'électrode de manière à assurer une réponse rapide de la sonde aux variations de concentration d'oxygène, et pour garantir la régularité et la reproductibilité de ces mesures dans la cellule. En général, un système comprenant une électrode à oxygène auto-agitatrice convient parfaitement. La cellule est rincée à l'eau entre chaque mesure. Une autre solution consiste à placer l'échantillon dans un flacon DBO (graphique 2 de l'Appendice 3) équipé d'un agitateur magnétique. Une sonde à oxygène équipée d'un adaptateur est alors introduite par le col du flacon, puis l'agitation est lancée. Dans les deux cas, il convient de mesurer et d'enregistrer la concentration d'oxygène dissous en continu pendant une période de 5 à 10 minutes, en général, ou jusqu'à ce que cette concentration chute en deçà de 2 mg/L. L'électrode est alors retirée et l'échantillon reversé dans le récipient d'essai où l'aération et l'agitation se poursuivent si une mesure est nécessaire après une plus longue période d'exposition.

Vérification de la concentration de la substance chimique d'essai

44. Dans certains cas, il peut être nécessaire de mesurer la concentration de la substance chimique d'essai directement dans le récipient d'essai. Il convient de noter que si l'on utilise des solutions mères de:

- substances peu hydrosolubles,
- mélanges dont les composants présentent différentes solubilités aqueuses, ou
- substances bien solubles dans l'eau mais dont la solution mère offre une concentration proche de la limite de saturation,

la fraction dissoute est inconnue, et la concentration réelle de la substance chimique étudiée transférée dans les récipients d'essai demeure indéterminée. Il est nécessaire d'analyser les concentrations de la substance chimique d'essai dans les récipients afin de caractériser l'exposition. Pour des raisons de simplicité, cette analyse est réalisée avant d'ajouter l'inoculum. Dans la mesure où seules les fractions dissoutes sont transférées dans les récipients d'essai, les concentrations mesurées peuvent s'avérer très faibles.

45. Il est recommandé de peser directement la substance chimique étudiée dans les récipients d'essai et de s'appuyer sur la concentration nominale initiale correspondant à cette masse dans les calculs suivants, pour éviter des analyses coûteuses et chronophages. La distinction entre les fractions dissoute, non dissoute et adsorbée de la substance d'essai est inutile puisque toutes ces fractions sont également présentes en pratique dans les stations d'épuration, et qu'elles peuvent varier selon la composition des eaux usées. L'objectif de la présente méthode d'essai est de produire une estimation réaliste de la concentration non inhibitrice; elle ne convient pas pour étudier en détail quelles fractions contribuent à l'inhibition des organismes des boues activées. Enfin, les substances adsorbantes seront également pesées directement dans les récipients d'essai. On utilisera en outre de la verrerie silanisée pour limiter les pertes par adsorption.

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Calcul des taux de consommation d'oxygène

46. Les taux de consommation d'oxygène sont calculés à partir de la moyenne des valeurs relevées, par exemple en utilisant la partie linéaire des courbes de concentration d'oxygène en fonction du temps, les calculs étant limités aux concentrations situées entre 2,0 mg/l et 7,0 mg/l, dans la mesure où des teneurs en oxygène supérieures ou inférieures sont susceptibles d'influencer la consommation. Il est cependant parfois inévitable et nécessaire de travailler avec des valeurs situées en dehors de cette fourchette, notamment quand la respiration est fortement inhibée et donc très lente, ou lorsqu'une boue activée respire très rapidement. Cette démarche est acceptable à condition que les parties de la courbe de consommation considérées soient linéaires et que leurs gradients ne varient pas aux limites de l'intervalle 2,0 mg/l – 7,0 mg/l d'O₂. Toute partie non linéaire de la fonction traduit une stabilisation du système de mesure ou une modification du taux de consommation, et ne devrait donc pas être utilisée pour calculer des taux de respiration. Le taux de consommation d'oxygène est exprimé en milligrammes par litre et par heure (mg/lh) ou en milligrammes par gramme de boue sèche et par heure (mg/gh). Le taux de consommation d'oxygène, R, en mg/lh, peut être déduit ou interpolé à partir de la partie linéaire de la courbe de quantité d'oxygène décroissante, d'après l'équation 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \quad (1)$$

où

Q_1 est la concentration d'oxygène au début de la partie de courbe linéaire sélectionnée (mg/l);

Q_2 est la concentration d'oxygène à la fin de la partie de courbe linéaire sélectionnée (mg/l);

Δ_t est l'intervalle de temps entre ces deux mesures (min).

47. Le taux de respiration spécifique (R_s) est exprimé comme la quantité d'oxygène consommée par gramme de boue sèche et par heure (mg/gh), d'après l'équation 2:

$$R_s = R/SS \quad (2)$$

où SS est la concentration des solides en suspension dans le mélange d'essai (g/l).

48. R peut être précisé par divers indices aux significations suivantes

S taux spécifique

T taux de respiration totale

N taux de respiration liée à la nitrification

H taux de respiration hétérotrophe

A taux correspondant aux processus abiotiques

B taux des essais à blanc (moyenne)

Calcul du taux de consommation d'oxygène liée à la nitrification

49. La relation entre la respiration totale (R_T), la respiration liée à la nitrification (R_N) et la respiration hétérotrophe (R_H) est fournie par l'équation 3:

$$R_N = R_T - R_H \quad (3)$$

où

R_N est le taux de consommation d'oxygène liée à la nitrification (mg/lh);

R_T est le taux mesuré de consommation d'oxygène du témoin à blanc (sans ATU; F_B) (mg/lh).

R_H est le taux mesuré de consommation d'oxygène du témoin à blanc avec ATU (F_N) (mg/lh).

50. Cette équation demeure valable pour les valeurs des témoins à blanc (R_{NB} , R_{TB} , R_{HB}), des témoins abiotiques (R_{NA} , R_{TA} , R_{HA}) et des essais avec la substance chimique étudiée (R_{NS} , R_{TS} , R_{HS}) (mg/gh). Les taux de respiration spécifiques sont déduits de la manière suivante:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Si R_N n'est pas significatif (par exemple $< 5 \%$ du R_T des témoins à blanc) dans l'essai préliminaire, on peut supposer que la consommation d'oxygène hétérotrophe est égale à la consommation totale et qu'aucune nitrification ne se produit. Si l'essai doit prendre en compte les effets sur les microorganismes hétérotrophes et nitrifiants, une autre source de boue activée est nécessaire. L'essai final n'est mis en œuvre qu'en cas de variation de l'inhibition du taux de consommation d'oxygène en fonction des concentrations de la substance chimique étudiée.

Calcul du pourcentage d'inhibition

52. Le pourcentage d'inhibition de la consommation d'oxygène totale, I_T , déterminé pour chaque concentration de la substance chimique d'essai, est calculé d'après l'équation 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100 \% \quad (7)$$

53. De la même façon, le pourcentage d'inhibition de la consommation d'oxygène hétérotrophe, I_H , déterminé pour chaque concentration de la substance chimique d'essai, est calculé d'après l'équation 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100 \% \quad (8)$$

54. Enfin, l'inhibition de la consommation d'oxygène liée à la nitrification, I_N , déterminée pour chaque concentration de la substance d'essai, est calculée d'après l'équation 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100 \% \quad (9)$$

55. On tracera la courbe du pourcentage d'inhibition de la consommation d'oxygène en fonction du logarithme de la concentration de substance chimique d'essai (désignée courbe d'inhibition, voir graphique 3 de l'Appendice 4). Les courbes d'inhibition sont tracées pour chaque phase d'aération de 3 h, ou après 30 min supplémentaires. La concentration de la substance chimique d'essai correspondant à une inhibition de 50 % de la consommation d'oxygène (CE_{50}) est calculée ou interpolée à partir de cette courbe. Si les données nécessaires sont disponibles, on calculera ou interpolera aussi les limites de confiance à 95 % de la CE_{50} , la pente de la courbe et les valeurs pertinentes représentant le début de l'inhibition (par exemple, CE_{10} ou CE_{20}) et sa fin (par exemple, CE_{80} ou CE_{90}).

56. Il convient de noter qu'en raison de la fréquente variabilité des résultats observée, il suffit, dans de nombreux cas, d'exprimer les concentrations par ordre de grandeur, par exemple:

$CE_{50} < 1 \text{ mg/l}$

$CE_{50} \text{ } 1 \text{ mg/l à } 10 \text{ mg/l}$

$CE_{50} \text{ } 10 \text{ mg/l à } 100 \text{ mg/l}$

$CE_{50} > 100 \text{ mg/l}$

Interprétation des résultats

CE_x

57. On calcule les valeurs de CE_x et leurs limites de confiance à 95 % supérieures et inférieures correspondant au paramètre en utilisant des méthodes statistiques adéquates [par exemple, analyse probit, fonction logistique ou de Weibull, méthode simplifiée de Spearman-Kärber ou simple interpolation (11)]. Une CE_x est obtenue en intégrant une valeur correspondant à x % de la moyenne du témoin dans l'équation retenue. Pour calculer la CE_{50} ou tout autre CE_x , il faut soumettre les moyennes par traitement (X) à une analyse de régression.

Estimation de la CSEO

58. Lorsqu'une analyse statistique est appliquée pour déterminer la CSEO, il faut disposer de statistiques par récipient (chaque récipient individuel étant considéré comme une expérience distincte). Il convient alors d'utiliser des méthodes statistiques adéquates conformément au Document d'orientation de l'OCDE intitulé *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application* (11). En général, les effets indésirables de la substance chimique d'essai par rapport au témoin sont étudiés en procédant à une vérification de l'hypothèse unilatérale (plus faible) pour $p \leq 0,05$.

Rapport d'essai

59. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Substance chimique d'essai

- nom courant, nom chimique, numéro CAS, pureté;
- propriétés physico-chimiques de la substance chimique d'essai (par exemple $\log K_{oc}$, hydrosolubilité, pression de vapeur, constante de Henry (H) et information éventuelle sur le devenir de la substance chimique d'essai, p. ex. adsorption sur la boue activée);

Système d'essai

- source, conditions de fonctionnement de la station d'épuration et nature des effluents traités, concentration, prétraitement et maintenance de la boue activée;

Conditions d'essai

- température et pH de l'essai, durée de la ou des phase(s) d'exposition;

Résultats

- consommation d'oxygène spécifique des témoins (mg d'O₂/(g boue × h));
- ensemble des données collectées, courbe(s) d'inhibition et méthode de calcul de la CE_{50} ;
- CE_{50} et, si possible, intervalle de confiance à 95 %, le cas échéant CE_{20} , CE_{80} ; éventuellement CSEO et méthodes statistiques employées, si la CE_{50} ne peut être déterminée;
- résultats de l'inhibition totale, et, s'il y a lieu, des inhibitions hétérotrophes et liée à la nitrification;
- consommation d'oxygène abiotique dans le témoin physico-chimique (le cas échéant);
- nom des substances chimiques de référence et résultats obtenus avec ces substances;
- tout écart par rapport à la procédure normalisée ou toute observation susceptible d'influencer le résultat.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Brown, D., Hitz, H.R. et Schäfer, L. (1981), The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.
 - (2) King, E. F. et Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.
 - (3) OCDE (1984) Boue activée, essai d'inhibition de la respiration, ligne directrice n° 209 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
 - (4) ISO (2007). Norme ISO 8192 (1986), Qualité de l'eau. Essai d'inhibition de la consommation d'oxygène par des boues activées pour l'oxydation du carbone et de l'ammonium, Organisation internationale de normalisation.
 - (5) Bealing, D. J. (2003) Document ISO/TC147/WGI/N.18, Organisation internationale de normalisation.
 - (6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-organisms, *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.
 - (7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge, *Toxicity Assessment* 1:515-524.
 - (8) Robra, B. (1976), Wasser/Abwasser 117, 80.
 - (9) Fiebig S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test, acc. to the OECD guideline 209, *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.
 - (10) ISO (1995). ISO 10634 Qualité de l'eau — Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux, Organisation internationale de normalisation.
 - (11) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a guidance to application, Série de l'OCDE sur les essais et l'évaluation N° 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OCDE, Paris.
-

*Appendice 1***Définitions**

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai:

Substance chimique: une substance ou un mélange

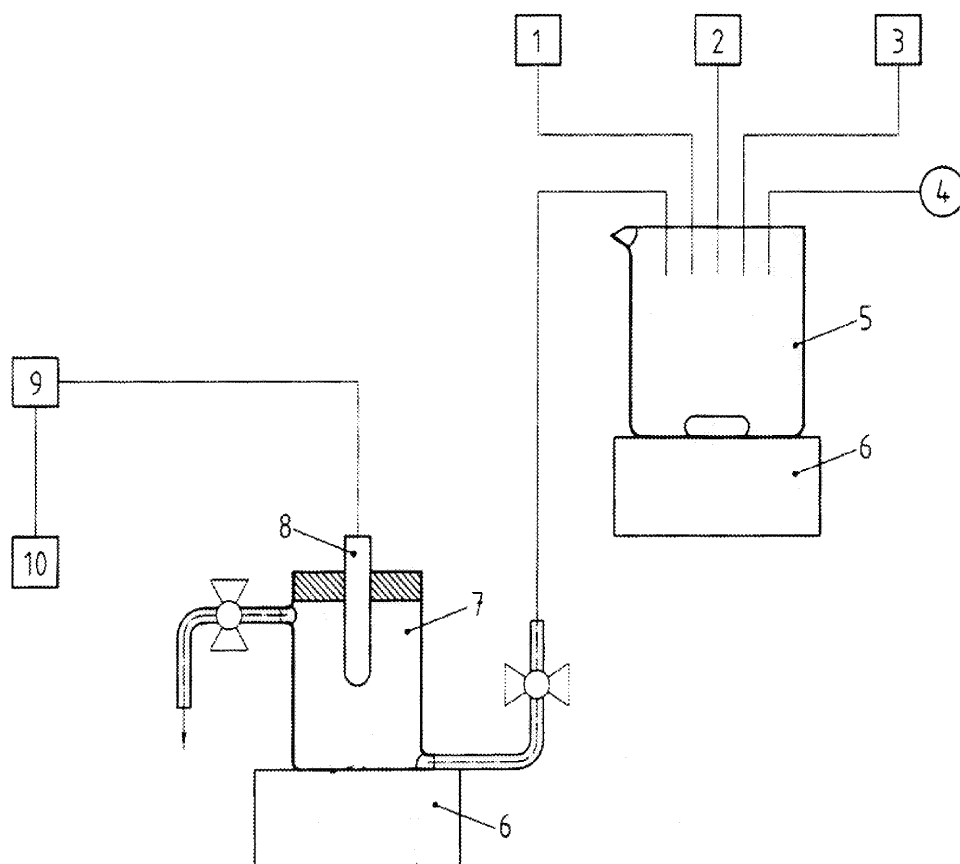
CE_x (concentration efficace à x %): concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'expérience durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, une CE₅₀ est une concentration estimée produire un effet sur un paramètre évalué de l'essai dans 50 % d'une population exposée durant une période d'exposition déterminée.

CSEO (concentration sans effet observé): concentration de la substance chimique d'essai à laquelle aucun effet n'est observé. Dans cet essai, la concentration correspondant à la CSEO n'a pas d'effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Appendice 2

Graphique 1: Exemple de dispositif de mesure

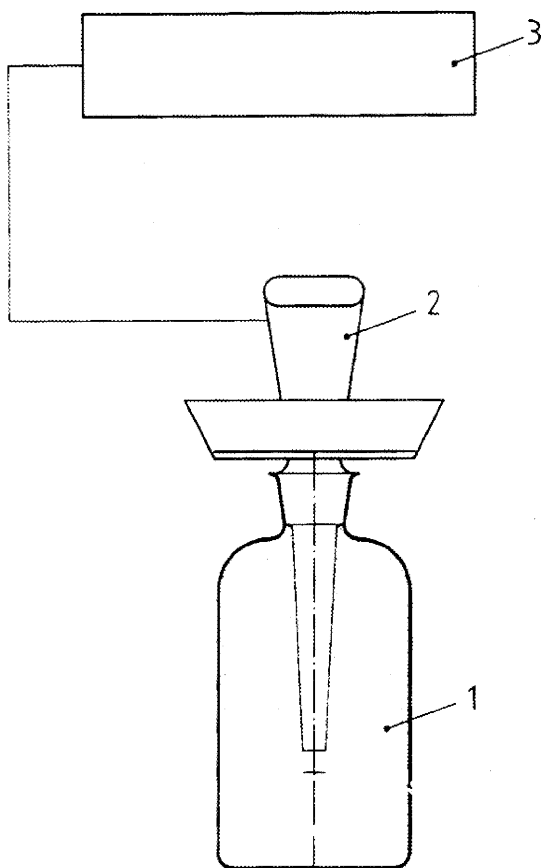


Légende

1 boue activée	6 agitateur magnétique
2 milieu reconstitué	7 cellule de mesure de l'oxygène
3 Substance chimique d'essai	8 électrode à oxygène
4 air	9 instrument de mesure de l'oxygène
5 bécber du mélange	10 dispositif d'enregistrement

Appendice 3

Graphique 2: Exemple de dispositif de mesure avec flacon DBO

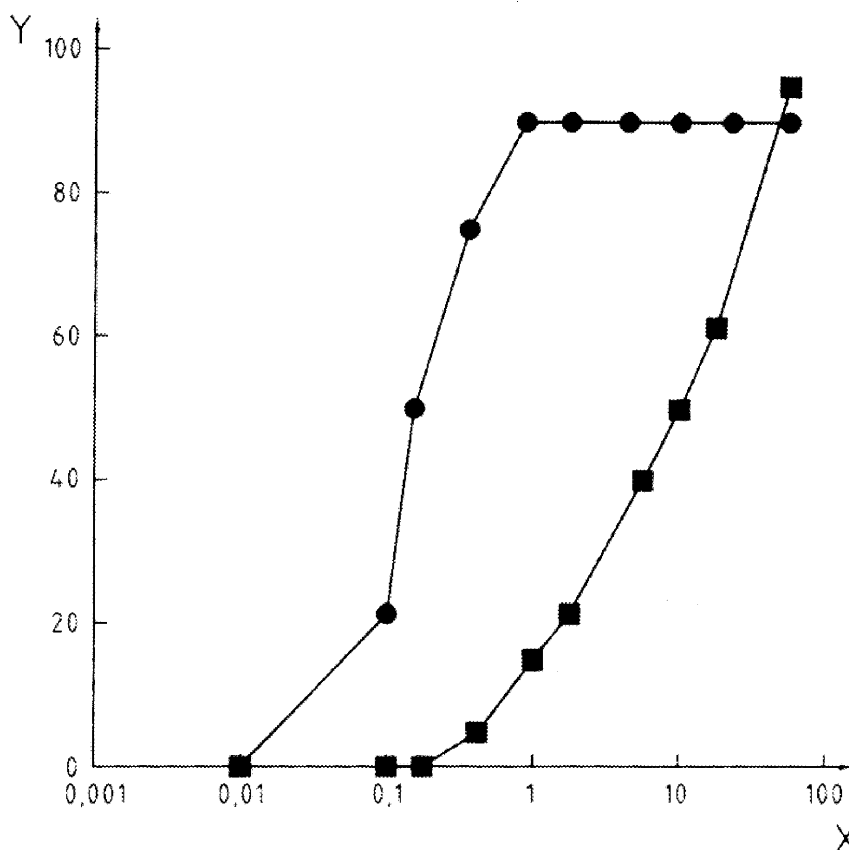


Légende

- 1 récipient d'essai
- 2 électrode à oxygène
- 3 instrument de mesure de l'oxygène

Appendice 4

Graphique 3: Exemple de courbes d'inhibition



Légende

X concentration de 3,5-dichlorophénol (mg/l)

Y inhibition (%)

■ inhibition de la respiration hétérotrophe avec une boue nitrifiante

● inhibition de la nitrification avec une boue nitrifiante»

5) Le chapitre C.26 est remplacé par le texte suivant:

«C.26 LEMNA SP. ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 221 (2006) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle est destinée à évaluer la toxicité de substances chimiques sur des plantes dulcicoles du genre *Lemna* (lentille d'eau). Conçue à partir de méthodes existantes (1)(2)(3)(4)(5)(6), elle comporte des modifications reflétant les dernières avancées en recherche et des consultations d'experts sur un certain nombre de points essentiels. La présente méthode d'essai a été validée par un essai tournant international (7).

2. Elle décrit des essais de toxicité sur *Lemna gibba* et *Lemna minor*, deux espèces abondamment étudiées et visées par les références susmentionnées. La taxonomie des espèces du genre *Lemna* est complexe, notamment à cause de l'existence des nombreux phénotypes. Bien qu'il puisse y avoir une variation génétique pour la réaction des espèces de *Lemna* aux toxiques, nous ne sommes pas encore en mesure de recommander l'usage d'un clone particulier pour cette méthode d'essai, faute de données suffisantes sur cette source de variabilité. Notons que cet essai n'est pas conduit dans des conditions axéniques, mais qu'à différentes étapes du mode opératoire il inclut des mesures permettant de limiter au maximum la contamination par d'autres organismes.
3. Les procédés avec renouvellement (semi-statique, et à écoulement continu dit "dynamique") et sans renouvellement (statique) de la solution expérimentale sont décrits en détail. En fonction des objectifs de l'essai et des exigences réglementaires, on envisagera d'appliquer les méthodes semi-statique et dynamique, par exemple pour les substances chimiques qui disparaissent rapidement de la solution par volatilisation, photodégradation, précipitation ou biodégradation. Des orientations supplémentaires sont fournies dans la référence (8).
4. Les termes utilisés sont définis à l'Appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

5. Des monocultures du genre *Lemna*, en phase de croissance exponentielle, sont exposées à différentes concentrations de la substance chimique d'essai sur une période de sept jours. Cet essai vise à quantifier les effets de la substance sur la multiplication végétative des lentilles d'eau durant cette période, d'après l'évaluation de plusieurs variables choisies. Le nombre de thalles représente la première variable mesurée, mais on en détermine au moins une autre (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) car certaines substances sont susceptibles d'avoir un impact beaucoup plus prononcé sur des variables autres que le nombre de thalles. Afin de quantifier les effets de la substance, la croissance des lentilles d'eau dans les solutions expérimentales est comparée à celle des témoins et la concentration induisant un pourcentage défini d'inhibition de la croissance (par exemple 50 %) est déterminée et exprimée sous la forme de CE_x (par exemple CE_{50}).
6. Dans cet essai, l'effet observé est l'inhibition de la croissance, exprimé en termes d'accroissement logarithmique de la variable mesurée (taux de croissance spécifique moyen) durant la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage donné d'inhibition du taux de croissance (par exemple 50 %) est déterminée en fonction des taux de croissance spécifiques moyens relevés dans une série de solutions expérimentales et exprimée sous la forme C_xE_t (par exemple $C_{50}E_t$).
7. Cette méthode d'essai comporte également une variable étudiée supplémentaire, le rendement, requise par la réglementation de certains pays. Il est défini comme étant la différence entre la valeur des variables mesurées à la fin de la période d'exposition et la valeur des variables mesurées au début de la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage donné d'inhibition du rendement (par exemple 50 %) est calculée à partir du rendement enregistré dans une série de solutions expérimentales et exprimée en termes de C_xE_y (par exemple $C_{50}E_y$).
8. En outre, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la concentration sans effet observé (CSEO) peuvent être déterminées par un calcul statistique.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

9. Il faudrait disposer d'une méthode analytique suffisamment sensible pour quantifier la substance d'essai dans le milieu expérimental.
10. Les informations sur la substance chimique d'essai pouvant être utiles à l'établissement des conditions expérimentales comprennent la formule structurale, la pureté, l'hydrosolubilité, la stabilité dans l'eau et à la lumière, le pK_a , le K_{oc} , la pression de vapeur et la biodégradabilité. L'hydrosolubilité et la pression de vapeur peuvent être utilisées pour calculer la constante de Henry, qui indiquera si des pertes appréciables de la substance chimique d'essai risquent de se produire durant la période de l'essai. On saura ainsi s'il y a lieu de prendre des mesures particulières afin de limiter ces pertes. Si la solubilité et la stabilité de la substance chimique d'essai ne sont pas connues avec certitude, il est recommandé de les évaluer dans les conditions de l'essai, c'est-à-dire dans le milieu expérimental ainsi qu'à la température et sous le régime d'éclairage appliqués durant l'essai.

11. Si la maîtrise du pH du milieu expérimental est particulièrement importante, par exemple lorsqu'on teste des métaux ou des substances chimiques hydrolytiquement instables, il est recommandé d'ajouter un tampon au milieu de croissance (voir paragraphe 21). D'autres indications sur le traitement des substances chimiques qui se prêtent difficilement à cet essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont données dans la référence (8).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

12. Pour que l'essai soit valable, le temps de dédoublement du nombre de thalles chez les témoins doit être inférieur à 2,5 jours (60 heures), ce qui correspond approximativement à une multiplication par sept de ce nombre en sept jours et à un taux de croissance spécifique moyen de $0,275 \text{ jour}^{-1}$. Si l'on utilise le milieu et les conditions expérimentales décrits dans la présente méthode d'essai, ce critère peut être atteint avec une méthode d'essai statique (5). Ce critère devrait aussi pouvoir être rempli dans des conditions semi-statiques et dynamiques. Le calcul du temps de dédoublement est exposé au paragraphe 49.

SUBSTANCE CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

13. Des substances chimiques de référence telles que le 3,5-dichlorophénol utilisé dans l'essai circulaire international (7) peuvent servir à vérifier le procédé expérimental. Il est conseillé de tester la substance de référence au moins deux fois par an ou, si l'essai est conduit moins fréquemment, parallèlement à la détermination de la toxicité de la substance chimique d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

14. Tout le matériel entrant en contact avec le milieu expérimental doit être en verre ou fait d'un autre matériau chimiquement inerte. La verrerie destinée aux cultures et à l'essai doit être stérile et nettoyée de tous les contaminants chimiques risquant d'être lessivés dans le milieu d'essai. Les récipients d'essai doivent être suffisamment larges pour permettre aux thalles des différentes colonies dans les récipients témoins de croître sans se recouvrir à la fin de l'essai. Il importe peu que les racines touchent le fond des récipients d'essai, mais il est conseillé d'utiliser des récipients d'essai d'une profondeur minimale de 20 mm et d'un volume minimal de 100 ml. Tout récipient répondant à ces critères peut être utilisé. Des béciers en verre, des cristallisoirs et des boîtes de Petri en verre aux dimensions appropriées se sont avérés adéquats. Les récipients d'essai seront couverts pour minimiser l'évaporation et la contamination accidentelle, tout en autorisant les échanges nécessaires avec l'air. Les récipients d'essai, et en particulier leurs couvercles, ne doivent pas réduire l'intensité lumineuse ni modifier les caractéristiques spectrales de la lumière.
15. Les récipients expérimentaux et ceux contenant les cultures ne doivent pas être conservés ensemble. Le meilleur moyen d'y parvenir consiste à les garder dans des enceintes de croissance, des incubateurs ou des pièces séparés. Il faut pouvoir régler l'éclairage et la température et les maintenir à un niveau constant (voir paragraphes 35-36).

Organisme expérimental

16. Cet essai se pratique sur *Lemna gibba* ou *Lemna minor*. L'Appendice 2 fournit une brève description condensée des espèces de lentilles d'eau ayant servi à des essais de toxicité. Le matériel végétal peut être obtenu auprès d'une collection de cultures, d'un autre laboratoire ou récolté sur le terrain. Dans ce dernier cas, les plantes doivent être maintenues dans le même milieu que celui qui servira à l'essai durant au moins huit semaines avant leur utilisation. Les cultures de départ ne seront prélevées que sur des sites manifestement non contaminés. Si les cultures proviennent d'un autre laboratoire ou d'une collection de cultures, elles seront également maintenues dans le même milieu que celui de l'essai durant au moins trois semaines. La source du matériel végétal ainsi que l'espèce et le clone (s'il est connu) utilisés pour l'essai doivent toujours figurer sur le rapport.
17. Il convient d'utiliser des monocultures visiblement non contaminées par d'autres organismes tels que des algues et des protozoaires. Les représentants sains de *L. minor* forment des colonies de deux à cinq thalles tandis que les colonies saines de *L. gibba* peuvent comprendre jusqu'à sept thalles.
18. La qualité et l'uniformité des plantes utilisées pour l'essai sont susceptibles d'avoir une influence sensible sur le résultat de l'essai et les plantes doivent par conséquent être choisies avec soin. On utilisera des plantes jeunes, en croissance rapide et dépourvues de lésions visibles ou de parties décolorées (chlorose). Une fréquence élevée de colonies comprenant au moins deux thalles atteste la bonne qualité des cultures. Un nombre important de thalles uniques indique que les plantes vivent dans des conditions de stress, telles qu'un manque en éléments nutritifs, et le matériel végétal issu de ces cultures ne peut servir à l'essai.

Culture

19. Afin d'alléger le travail d'entretien des cultures (par exemple lorsque aucun essai n'est prévu sur les *Lemna* durant un certain temps), les cultures peuvent être gardées sous un éclairage et une température réduits (4-10 ° C). L'Appendice 3 fournit des précisions sur la culture. En cas de contamination visible par des algues ou d'autres organismes, il convient de stériliser en surface un sous-échantillon de thalles de *Lemna* et de le transférer dans un milieu nouvellement préparé (voir Appendice 3). Dans cette éventualité, le reste de la culture contaminée est à éliminer.
20. Au moins sept jours avant l'essai, un nombre suffisant de colonies est transféré aseptiquement dans un milieu frais stérile et cultivé durant 7 à 10 jours dans les conditions de l'essai.

Milieu expérimental

21. Les différents milieux recommandés pour *Lemna minor* et *Lemna gibba* sont décrits ci-après. La prudence sera de rigueur en ce qui concerne l'ajout d'un tampon au milieu d'essai (MOPS (acide 4-morpholinepropanesulfonique, numéro CAS: 1132-61-2) au milieu de *L. minor* et NaHCO₃ au milieu de *L. gibba*) si l'on soupçonne le tampon de réagir avec la substance chimique d'essai et d'influencer l'expression de sa toxicité. Le milieu de Steinberg (9) est acceptable pour autant que les critères de validité soient respectés.
22. On préconise de cultiver et de tester *L. minor* sur une version modifiée du milieu de croissance pour *Lemna* établi par la norme suédoise (SIS). La composition de cette version modifiée est indiquée à l'Appendice 4.
23. Le milieu de croissance 20X — AAP, décrit à l'Appendice 4, est recommandé pour la culture et l'essai de *L. gibba*.
24. Le milieu de Steinberg, décrit à l'Appendice 4, convient à *L. minor*, mais peut aussi être employé pour *L. gibba* à condition que les critères de validité soient respectés.

Solutions expérimentales

25. Les solutions expérimentales sont généralement préparées par dilution d'une solution mère, elle-même préparée par dissolution de la substance chimique dans le milieu de croissance.
26. La plus haute concentration testée de la substance chimique d'essai ne doit normalement pas dépasser l'hydro-solubilité de la substance dans les conditions de l'essai. Il est à noter toutefois que les espèces du genre *Lemna* flottent à la surface et risquent d'être exposées à des substances qui s'accumulent à l'interface eau-air (par exemple des substances peu solubles dans l'eau ou hydrophobes ou des tensio-actifs). Dans ces circonstances, l'exposition résultera de substances autres que celles qui sont en solution, de sorte que les concentrations expérimentales pourraient, suivant les caractéristiques de la substance chimique d'essai, dépasser la solubilité dans l'eau. Pour les substances chimiques d'essai peu solubles dans l'eau, il peut être nécessaire de préparer une solution mère concentrée ou une dispersion de la substance au moyen d'un solvant organique ou d'un dispersant, afin de faciliter l'ajout de quantités précises de substance chimique d'essai au milieu expérimental et de favoriser sa dispersion et sa dissolution. Le recours à ces auxiliaires doit être évité dans toute la mesure du possible. Les solvants ou les dispersants auxiliaires ne doivent induire de phytotoxicité. L'acétone et le diméthyl-formamide sont des exemples de solvants courants qui n'engendrent aucune phytotoxicité à des concentrations allant jusqu'à 100 µl/l. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant, sa concentration finale doit être limitée et ne peut pas dépasser 100 µl/l, doit être identique dans tous les récipients traités et témoins et spécifiée dans le rapport. La référence (8) donne des indications supplémentaires sur l'utilisation des dispersants.

Groupes traités et témoins

27. Il est utile de cerner la toxicité de la substance chimique d'essai à l'égard de *Lemna*, par exemple à l'aide d'un essai de détermination de l'ordre de grandeur, afin d'établir des concentrations expérimentales pertinentes. L'essai de toxicité proprement dit doit comprendre au moins cinq concentrations formant une série géométrique. Il est préférable que les concentrations expérimentales ne soient pas séparées par un facteur supérieur à 3,2, mais on peut appliquer un facteur plus élevé si la courbe concentration-effet a une pente nulle. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Il faut conduire au moins trois expériences identiques à chaque concentration.

28. Le choix de la gamme des concentrations d'essai (de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur ou de l'essai de toxicité) doit tenir compte des aspects suivants:
- Pour déterminer la CE_x , les concentrations expérimentales doivent entourer la valeur de la CE_x afin que le niveau de confiance soit suffisant. Par exemple, s'il s'agit d'estimer la CE_{50} , la concentration expérimentale la plus élevée doit dépasser la valeur de la CE_{50} . Si la CE_{50} sort de la gamme des concentrations expérimentales, les intervalles de confiance seront larges et il risque d'être impossible d'évaluer correctement la validité de l'ajustement statistique du modèle.
 - S'il s'agit d'estimer la CMEO et la CSEO, la plus petite concentration expérimentale doit être suffisamment basse pour que la croissance des lentilles d'eau ne soit pas ralentie de manière significative par rapport à celle des témoins. De plus, la concentration expérimentale la plus élevée doit être suffisamment élevée pour que la croissance soit sensiblement inférieure à celle des témoins. Si ce n'est pas le cas, l'essai devra être répété à une gamme de concentrations différente (à moins que la concentration la plus élevée atteigne la limite de solubilité ou, la concentration limite supérieure autorisée, par exemple 100 mg/l).
29. Chaque essai doit inclure des témoins sans substance chimique d'essai, mais identiques aux récipients traités pour ce qui est du milieu nutritif, du nombre de thalles et de colonies, des conditions environnementales et du procédé expérimental. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant auxiliaire, il faut inclure un témoin supplémentaire contenant le solvant ou le dispersant à la même concentration que dans les récipients contenant la substance chimique d'essai. Le nombre de récipients témoins identiques (et de témoins contenant le solvant, le cas échéant) doit être au moins égal, et idéalement deux fois supérieur, au nombre de récipients d'essai utilisés à chaque concentration expérimentale.
30. Si la détermination de la CSEO n'est pas requise, la conception de l'essai peut être modifiée pour augmenter le nombre de concentrations et diminuer le nombre d'expériences identiques par concentration. Toutefois, le nombre de témoins identiques doit être au moins égal à trois.

Exposition

31. Des colonies formées de 2 à 4 thalles visibles sont prélevées dans la culture de l'inoculum et réparties au hasard dans les récipients d'essai dans des conditions aseptiques. Chaque récipient d'essai doit contenir 9 à 12 thalles au total. Le nombre de thalles et de colonies doit être identique dans chaque récipient d'essai. L'expérience acquise avec cette méthode et l'essai tournant montrent que l'utilisation de trois expériences identiques par traitement, comprenant chacune 9 à 12 thalles au départ, suffit pour détecter des différences de croissance entre les traitements d'environ 4 à 7 % d'inhibition, si celles-ci sont calculées d'après le taux de croissance, et de 10 à 15 % si elles sont calculées d'après le rendement (7).
32. L'emplacement des récipients expérimentaux dans l'incubateur doit être aléatoire, afin de réduire au minimum l'influence des différences spatiales d'intensité lumineuse ou de température. La disposition des récipients au moment d'effectuer les observations (ou plus souvent de remettre en place les récipients) est également régie par un plan en blocs ou une procédure aléatoire.
33. Si un essai de stabilité préliminaire montre que la concentration de la substance chimique d'essai ne peut être maintenue (la concentration mesurée tombe en dessous de 80 % de la concentration mesurée initialement) sur la durée de l'essai (7 jours), on recommande la méthode semi-statique. Dans ce cas, les colonies doivent être exposées au moins deux fois durant l'essai (par exemple les troisième et cinquième jours) à des solutions d'essai et à des solutions témoins nouvellement préparées. La fréquence de l'exposition à un milieu renouvelé dépendra de la stabilité de la substance chimique d'essai: une fréquence plus élevée peut s'avérer nécessaire pour maintenir des concentrations presque constantes dans le cas de substances très instables ou volatiles. Certaines circonstances appellent une méthode dynamique (8)(10).
34. La voie d'exposition par application foliaire (pulvérisation) n'est pas reprise dans cette méthode d'essai, mais la référence (11) donne des informations à ce sujet.

Conditions d'incubation

35. On applique un éclairage continu à fluorescence blanche, chaude ou froide, afin d'obtenir une intensité lumineuse comprise entre 85 et 135 $\mu E m^{-2} \cdot s^{-1}$ lorsqu'elle est mesurée dans le domaine de longueur d'onde autorisant la photosynthèse (400 à 700 nm) à des points situés à la même distance de la source lumineuse que les thalles de *Lemna* (équivalant à 6 500-10 000 lux). Tout écart à l'intensité lumineuse choisie ne doit pas dépasser $\pm 15 \%$ dans la zone de l'essai. La méthode de détection et de mesure de la lumière, notamment le type de capteur, affectera la valeur mesurée. Les capteurs sphériques (qui détectent la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus et en dessous du plan de mesure) et les capteurs "cosinus" (qui détectent la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus du plan de mesure) sont préférables aux capteurs unidirectionnels et afficheront des valeurs plus élevées pour une source lumineuse multiple comme celle qui est décrite ici.

36. La température des récipients d'essai est maintenue à 24 ± 2 °C. Le pH du milieu témoin ne peut augmenter de plus de 1,5 unité au cours de l'essai. Toutefois, un écart supérieur à 1,5 unité n'invalidera pas l'essai, si le respect des critères de validité peut être démontré. Il faudra être particulièrement attentif aux variations du pH dans certains cas particuliers, notamment avec des substances instables et des métaux. La référence (8) fournit des indications supplémentaires à ce sujet.

Durée

37. L'essai prend fin sept jours après le transfert des plantes dans les récipients expérimentaux.

Mesures et déterminations analytiques

38. Au début de l'essai, on dénombre les thalles présents dans les récipients d'essai et on consigne ces valeurs en prenant soin de compter les thalles émergents bien visibles. Les nombres de thalles paraissant normaux ou anormaux sont déterminés au début de l'essai, au moins une fois tous les trois jours durant la période d'exposition (c'est-à-dire à au moins deux occasions au cours de la période de 7 jours) et à la fin de l'essai. Il y a lieu de noter les changements affectant le développement des plantes, par exemple en ce qui concerne la taille et l'aspect des thalles, les signes de nécrose, de chlorose ou les gibbosités, la fragmentation des colonies ou la diminution de leur flottabilité ainsi que la longueur et l'aspect des racines. Les caractéristiques significatives du milieu d'essai (par exemple, la présence de matières non dissoutes, le développement d'algues dans les récipients d'essai) doivent également être rapportées.
39. Durant l'essai, en plus de la détermination du nombre de thalles, on mesure aussi les effets de la substance chimique d'essai sur une ou plusieurs des variables suivantes:
- i) superficie totale des thalles
 - ii) poids sec
 - iii) poids frais.
40. La superficie totale des thalles présente l'avantage de pouvoir être déterminée pour chaque récipient traité et témoin au début, pendant et à la fin de l'essai. Le poids sec ou frais est déterminé au début de l'essai à partir d'un échantillon de la culture de l'inoculum représentatif du matériel utilisé pour entamer l'essai et à la fin de l'essai avec le matériel végétal de chaque récipient traité et de chaque récipient témoin. Si la superficie des thalles n'est pas mesurée, le poids sec est préférable au poids frais.
41. La superficie totale des thalles, le poids sec et le poids frais peuvent être déterminés comme suit:
- i) *Superficie totale des thalles*: La superficie totale des thalles de toutes les colonies peut être déterminée par analyse de l'image. On saisit la silhouette du récipient expérimental et des plantes avec une caméra vidéo (en plaçant le récipient sur une boîte lumineuse) et on numérise l'image obtenue. Un étalonnage réalisé avec des formes planes de superficie connue permet ensuite de déterminer la superficie totale des thalles dans un récipient d'essai. On veillera à éviter toute interférence avec le bord du récipient d'essai. Une autre méthode plus laborieuse consiste à photocopier les récipients d'essai contenant les plantes, à découper la silhouette résultante des colonies et à déterminer leur superficie à l'aide d'un analyseur de la surface foliaire ou de papier millimétré. D'autres techniques (par exemple le quotient du poids de la silhouette découpée dans le papier par le poids d'un morceau de papier de superficie connue) conviennent également.
 - ii) *Poids sec*: Toutes les colonies sont prélevées dans chaque récipient d'essai et rincées avec de l'eau distillée ou désionisée. Elles sont déposées sur un buvard qui absorbe l'excès d'eau et séchées à 60 °C jusqu'à ce qu'elles atteignent un poids constant. Tous les fragments de racines doivent être inclus. Le poids sec doit être exprimé avec une précision d'au moins 0,1 mg.
 - iii) *Poids frais*: Toutes les colonies sont transférées dans des tubes de polystyrène (ou d'un autre matériau inerte) tarés et percés de petits trous (1 mm) dans leur fond arrondi. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3 000 tpm pendant 10 minutes à température ambiante. Les tubes contenant les colonies ainsi séchées sont repesés et le poids frais est calculé par déduction de la tare du tube.

Fréquence des mesures et des déterminations analytiques

42. Avec le procédé statique, le pH de chaque récipient traité doit être mesuré au début et à la fin de l'essai. Si le procédé est semi-statique, le pH est mesuré dans chaque lot de "nouvelle" solution expérimentale avant chaque renouvellement ainsi que dans les solutions "utilisées" correspondantes.

43. L'intensité lumineuse est mesurée dans l'enceinte de croissance, dans l'incubateur ou dans la pièce à des points situés à la même distance de la source de lumière que les thalles de *Lemna*, et ce au moins une fois au cours de l'essai. La température du milieu est mesurée au moins une fois par jour dans un récipient d'essai supplémentaire gardé dans les mêmes conditions que les autres dans l'enceinte de croissance, l'incubateur ou la pièce.
44. Durant l'essai, les concentrations de la substance chimique d'essai sont déterminées à intervalles appropriés. Dans les essais statiques, il faut déterminer les concentrations au moins au début et à la fin de l'essai.
45. Dans les essais semi-statiques, où l'on s'attend à ce que la concentration de la substance chimique d'essai ne reste pas dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale, il est nécessaire d'analyser toutes les solutions d'essai nouvellement préparées et les mêmes solutions à chaque renouvellement (voir paragraphe 33). Néanmoins, pour les essais où la concentration de la substance chimique d'essai mesurée initialement ne se situe pas dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale, mais où suffisamment d'indices attestent que les concentrations initiales sont répétables et stables (c'est-à-dire dans l'intervalle de 80 - 120 % de la concentration initiale), les analyses chimiques peuvent n'être effectuées qu'aux concentrations expérimentales maximale et minimale. Dans tous les cas, la détermination des concentrations de la substance chimique d'essai avant le renouvellement pourra n'être effectuée que dans un seul des récipients identiques de chaque concentration expérimentale (ou dans un récipient dans lequel on aura mélangé le contenu de tous les récipients traités de manière identique).
46. Un régime de prélèvement identique à celui décrit pour les essais semi-statiques pourra être appliqué aux essais dynamiques, avec une analyse au début, au milieu et à la fin de l'essai, mais sans l'analyse des solutions "utilisées" qui ne se justifie pas dans ce cas. Dans ce type d'essai, le débit du diluant et de la substance chimique d'essai ou de la solution mère de la substance chimique d'essai doit être contrôlé quotidiennement.
47. S'il s'avère que la concentration de la substance chimique d'essai a pu se maintenir dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale ou mesurée initialement tout au long de l'essai, l'analyse des résultats peut s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement. Si l'écart à la concentration nominale ou mesurée initialement est supérieur à ± 20 %, l'analyse des résultats devra reposer sur la moyenne géométrique de la concentration relevée durant l'exposition ou sur des modèles décrivant le déclin de la concentration de la substance chimique d'essai (8).

Essai limite

48. Dans certaines circonstances, par exemple lorsqu'un essai préliminaire indique que la substance chimique d'essai n'exerce aucun effet toxique à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/l ou à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (suivant celle qui est la plus basse), on peut conduire un essai limite afin de comparer les réactions d'un groupe témoin avec celles d'un groupe traité (à 100 mg/l ou à une concentration égale à la limite de solubilité). Il est fortement recommandé d'étayer cet essai par une analyse de la concentration d'exposition. Tous les critères de validité et conditions expérimentales décrits précédemment s'appliquent à l'essai limite, si ce n'est que le nombre de récipients traités de manière identique doit être doublé. La croissance des lentilles d'eau dans le groupe témoin et dans le groupe traité peut être analysée au moyen d'un test statistique permettant de comparer les moyennes, par exemple un test t de Student.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Temps de doublement

49. La formule suivante, appliquée avec les données provenant des récipients témoins, permet de déterminer le temps de doublement (T_d) du nombre de thalles et de vérifier si l'étude respecte ce critère de validité (paragraphe 12):

$$T_d = \ln 2 / \mu$$

où μ est le taux de croissance spécifique moyen calculé suivant les indications des paragraphes 54 et 55.

Variables étudiées

50. Cet essai est destiné à déterminer les effets de la substance chimique d'essai sur la multiplication végétative de *Lemna*. La présente méthode d'essai décrit deux variables, de manière à répondre aux différentes préférences et exigences réglementaires de juridictions distinctes. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables pour toutes les juridictions, les effets doivent être évalués en fonction des deux variables étudiées (a) et (b) définies ci-dessous.
- a) *Taux de croissance spécifique moyen*: cette variable étudiée est calculée d'après les changements affectant, d'une part, les logarithmes du nombre de thalles et, d'autre part, des logarithmes d'un autre paramètre mesuré (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) en fonction du temps (exprimé en jours), chez les témoins et dans chaque groupe traité. Elle est quelquefois appelée "taux de croissance relatif" (12).
- b) *Rendement*: cette variable étudiée est calculée d'après les changements du nombre de thalles et d'un autre paramètre mesuré (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) chez les témoins et dans chaque groupe traité, jusqu'à la fin de l'essai.
51. Notons que les valeurs de toxicité calculées avec ces deux variables étudiées ne sont pas comparables et qu'il faut tenir compte de cette différence lorsqu'on utilise les résultats de l'essai. Les valeurs de la CE_x basées sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) seront généralement supérieures à celles basées sur le rendement (C_xE_r), si les conditions expérimentales de cette méthode d'essai sont appliquées, en raison du fondement mathématique de chacune de ces approches. Cette différence n'est due qu'au calcul mathématique, il ne s'agit pas d'une différence de sensibilité entre les deux variables étudiées. Le concept du taux de croissance spécifique moyen repose sur l'allure générale de la croissance exponentielle des lentilles d'eau dans des cultures non limitées, où la toxicité est estimée d'après les effets sur le taux de croissance, sans tenir compte du niveau absolu du taux de croissance spécifique du témoin, de la pente de la courbe concentration-effet, ni de la durée de l'essai. En revanche, les résultats basés sur la variable de rendement dépendent de toutes ces autres variables. La C_xE_r dépend du taux de croissance spécifique de l'espèce de lentille d'eau utilisée dans chaque essai et du taux de croissance maximum spécifique, susceptible de varier entre les espèces, voire entre différents clones. Cette variable ne doit pas être utilisée pour comparer la sensibilité de différentes espèces, voire de différents clones de lentilles d'eau. S'il est préférable, du point de vue scientifique, d'estimer la toxicité d'après le taux de croissance spécifique moyen, cette méthode d'essai inclut également l'estimation basée sur le rendement afin de satisfaire à la réglementation en vigueur dans certaines juridictions.
52. Les estimations de la toxicité doivent reposer sur le nombre de thalles ainsi que sur une autre variable mesurée (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais), certaines substances risquant d'avoir un effet bien plus prononcé sur une variable autre que le nombre de thalles, effet qui ne serait pas détecté par le seul calcul du nombre de thalles.
53. On dresse un tableau réunissant le nombre de thalles et toute autre variable mesurée (c'est-à-dire superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) ainsi que les concentrations de la substance chimique d'essai relevées à chaque mesure. Les analyses ultérieures, par exemple pour estimer la CME0, la CSEO ou la CE_x , doivent s'appuyer sur les valeurs de chaque expérience identique d'un même essai et non sur les moyennes calculées pour chaque groupe traité.

Taux de croissance spécifique moyen

54. Le taux de croissance spécifique moyen durant une période donnée est calculé en fonction de l'accroissement logarithmique des variables de la croissance — nombre de thalles et une autre variable mesurée (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) — au moyen de la formule ci-dessous pour chaque expérience identique des groupes traités et témoins:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

où:

- μ_{i-j} : est le taux de croissance spécifique moyen du temps i au temps j
- N_i : N est la variable mesurée dans le récipient témoin ou traité au temps i

- N_j est la variable mesurée dans le récipient témoin ou traité au temps j
- t est la période de temps comprise entre i et j

Pour chaque groupe traité et témoin, calculer un taux de croissance moyen et les estimations de la variance.

55. On calcule le taux de croissance spécifique moyen sur l'ensemble de la période d'essai (le temps "i" mentionné dans la formule ci-dessus correspond au début de l'essai et le temps "j" à la fin de l'essai). Pour chaque concentration des groupes traités et des témoins, calculer la valeur moyenne du taux de croissance spécifique ainsi que les estimations de la variance. Évaluer également le taux de croissance section par section, afin d'apprécier les effets de la substance chimique d'essai durant la période d'exposition (par exemple en analysant les courbes de croissance log-transformées). Un taux de croissance section par section sensiblement différent du taux de croissance moyen montre qu'il y a un écart par rapport à la croissance exponentielle constante, écart qui réclame un examen attentif des courbes de croissance. Dans ce cas, une approche prudente consisterait à comparer les taux de croissance spécifiques des cultures traitées durant la période d'inhibition maximale avec ceux des témoins au cours de la même période.
56. Le pourcentage d'inhibition du taux de croissance (I_r) peut ensuite être calculé pour chaque concentration expérimentale (groupe traité) selon la formule suivante:

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

où:

- $\% I_r$: est le pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique moyen
- μ_C : est la valeur moyenne de μ dans le groupe témoin
- μ_T : est la valeur moyenne de μ dans le groupe traité

Rendement

57. Les effets sur le rendement sont déterminés en fonction de deux variables mesurées: le nombre de thalles et une autre variable (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) mesurées dans chaque récipient d'essai au début et à la fin de l'essai. En ce qui concerne le poids frais ou sec, la biomasse de départ est déterminée à partir d'un échantillon de thalles prélevé dans le lot qui a servi à semer les récipients d'essai (voir paragraphe 20). Pour chaque concentration expérimentale et le témoin, calculer un rendement moyen ainsi que les estimations de la variance. Le pourcentage moyen d'inhibition du rendement ($\% I_y$) peut être calculé pour chaque groupe traité d'après la formule suivante:

$$\% I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

où:

- $\% I_y$ est le pourcentage de réduction du rendement
- b_c est la biomasse finale moins la biomasse de départ dans le groupe témoin
- b_T est la biomasse finale moins la biomasse de départ dans le groupe traité

Courbes concentration-effet

58. On trace des courbes concentration-effet décrivant le pourcentage d'inhibition moyen de la variable étudiée (I_i ou I_r calculées comme indiqué aux paragraphes 56 et 57) en fonction du logarithme de la concentration de la substance chimique d'essai.

Estimation de la CE_x

59. Les estimations de la CE_x (par exemple la CE_{50}) s'appuient à la fois sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_r) et sur le rendement (C_xE_l), qui doivent, à leur tour, reposer sur le nombre de thalles et sur une variable mesurée supplémentaire (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) puisque certaines substances n'exercent pas le même effet sur le nombre de thalles que sur d'autres variables mesurées. Les paramètres de toxicité souhaités sont donc quatre valeurs de CE_x pour chaque niveau d'inhibition x calculé: C_xE_r (nombre de thalles); C_xE_l (superficie totale des thalles, poids sec ou frais); C_xE_r (nombre de thalles); et C_xE_r (superficie totale des thalles, poids sec ou frais).

Méthodes statistiques

60. L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de la régression. Il est possible d'utiliser une régression linéaire pondérée après avoir effectué une transformation linéarisante des valeurs décrivant l'effet observé — par exemple dans des unités probit ou logit ou Weibull (13), mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression non linéaire, celles-ci traitant mieux les irrégularités inévitables des valeurs et les écarts par rapport aux distributions régulières. Proches de zéro ou de l'inhibition totale, ces irrégularités risquent d'être amplifiées par la transformation et d'interférer avec l'analyse (13). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull sont destinées à être utilisées avec des effets par tout ou rien (mortalité ou survie, par exemple) et doivent être modifiées pour pouvoir être utilisées avec les valeurs du taux de croissance ou du rendement. Les références (14)(15) et (16) décrivent des procédures permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues.
61. Pour chaque variable étudiée à analyser, utiliser la relation concentration-effet pour calculer des estimations ponctuelles des valeurs de CE_x . Déterminer, si possible, les limites de confiance à 95 % pour chaque estimation. La validité de l'ajustement des données décrivant les effets au modèle de régression est à évaluer par un procédé statistique ou graphique. L'analyse de la régression doit s'appuyer sur les effets relevés dans chaque récipient traité de manière identique et non sur les moyennes des groupes traités.
62. Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec bootstrap (rééchantillonnage) (17), si les modèles ou méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.
63. Afin d'estimer la CME0, et par conséquent la CSEO, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par une analyse de la variance (ANOVA). La moyenne de chaque concentration doit ensuite être comparée avec la moyenne du témoin à l'aide d'un test approprié à comparaisons multiples ou de tendance. Les essais de Dunnett ou de William peuvent être utiles (18)(19)(20)(21). Il est nécessaire de vérifier si l'hypothèse de l'ANOVA de l'homogénéité de la variance tient. Cette vérification peut être pratiquée par un procédé graphique ou par un test formel (22), notamment les tests de Levene ou de Bartlett. L'infirmité de l'hypothèse de l'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance est extrême et ne peut être rectifiée par une transformation, on envisagera des méthodes d'analyse telles que les tests de tendance régressifs de Jonkheere. La référence (16) livre des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.
64. Des découvertes récentes conduisent les scientifiques à préconiser d'abandonner la notion de CSEO et de la remplacer par des estimations ponctuelles de la CE_x fondées sur la régression. Aucune valeur appropriée de x n'a encore été établie pour cet essai sur les *Lemna*. Néanmoins, une gamme de 10 à 20 % semble convenir (suivant la variable étudiée sélectionnée) et il est préférable de mentionner à la fois la CE_{10} et la CE_{20} dans le rapport.

Rapport

65. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Substance chimique d'essai:

- état physique et propriétés physico-chimiques, notamment la limite de solubilité dans l'eau;
- données d'identification chimique (par exemple numéro CAS), y compris la pureté (impuretés).

Espèce soumise à l'essai:

- nom scientifique, clone (s'il est connu) et source.

Conditions expérimentales:

- procédé expérimental appliqué (statique, semi-statique ou dynamique);
- date du début de l'essai et durée de l'essai;
- milieu expérimental
- description de la conception de l'essai (récipients d'essai et couvercles, volumes des solutions, nombre de colonies et de thalles par récipient au début de l'essai);
- concentrations expérimentales (nominales et mesurées selon les besoins) et nombre d'expériences identiques par concentration;
- méthodes de préparation des solutions mères et des solutions d'essai, y compris l'utilisation d'un solvant ou d'un dispersant le cas échéant;
- température appliquée durant l'essai;
- source, intensité et homogénéité lumineuses;
- valeurs du pH des milieux traités et des milieux témoins;
- concentrations de la substance chimique d'essai, méthode d'analyse et données permettant d'évaluer la qualité (études de validation, écarts-types ou limites de confiance des analyses);
- méthodes de détermination du nombre de thalles et des autres variables mesurées, par exemple le poids sec, le poids frais ou la superficie des thalles;
- tous les écarts par rapport à cette méthode d'essai.

Résultats:

- données brutes: nombre de thalles et autres variables mesurées dans chaque récipient traité et témoin à chaque observation et à chaque analyse;
- moyennes et écarts-types de chaque variable mesurée;
- courbes de croissance à chaque concentration (il est recommandé d'ajouter la transformation logarithmique de la variable mesurée, voir paragraphe 55);
- temps de doublement/taux de croissance chez le témoin d'après le nombre de thalles;
- calcul des variables étudiées pour chaque expérience identique à chaque concentration, avec valeurs moyennes et coefficient de variation des expériences identiques;
- représentation graphique de la relation concentration-effet;
- estimation des effets toxiques pour les variables étudiées, par exemple CE_{50} , CE_{20} , CE_{10} et intervalles de confiance associés. Si elles ont été calculées, la CMEO et/ou la CSEO ainsi que les méthodes statistiques utilisées pour les déterminer;
- si on a pratiqué une analyse de la variance, la puissance de l'effet détectable (par exemple, la différence la moins significative);
- toute stimulation de la croissance, le cas échéant, dans un groupe traité;
- tout signe visuel de phytotoxicité et observations des solutions d'essai;
- analyse des résultats, y compris l'influence d'un éventuel écart à cette Ligne directrice sur les résultats de l'essai.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test with *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.
- (2) US EPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., "Public draft". EpA 712-C-96-156. 8 pages.
- (3) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 pages.
- (4) Institut suédois de normalisation (SIS). (1995). Qualité de l'eau — Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, lentille d'eau, sur sept jours. SS 02 82 13. 15 pages (en suédois)
- (5) Environment Canada. (1999). Méthode d'essai biologique: essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole, *Lemna minor* SPE 1/RM/37 — 131 pages
- (6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service (Service Canadien de la faune), Technical Report Series N° 145.
- (7) Sims I., Whitehouse P. and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.
- (8) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement — Série sur les essais et l'évaluation N°23. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (9) Organisation internationale de normalisation. ISO DIS 20079. Qualité de l'eau – Détermination de l'effet toxique des constituants de l'eau et des eaux résiduaires vis-à-vis des lentilles d'eau (*Lemna minor*) — Essai d'inhibition de la croissance des lentilles d'eau
- (10) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. Septembre 1977.
- (11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353-359.
- (12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.
- (13) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.
- (14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.
- (15) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.
- (16) OCDE. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

-
- (18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.
- (19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.
- (20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.
- (21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 519-531.
- (22) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96
-

Appendice 1

Définitions

Les définitions et abréviations suivantes sont utilisées aux fins de la présente méthode d'essai:

Biomasse: poids sec de la matière vivante présente dans une population. Dans cet essai, la biomasse est mesurée indirectement, en général par le nombre de thalles et la superficie des thalles, si bien que le terme "biomasse" recouvre également ces paramètres.

Substance chimique: une substance ou un mélange

Chlorose: jaunissement du tissu des thalles.

Clone: organisme ou cellule issu d'un seul organisme par reproduction asexuée. D'où l'identité génétique entre les individus issus d'un même clone.

Colonie: agrégat de thalles mères et filles (généralement 2 à 4) attachés les uns aux autres. Quelquefois désignée par le terme "plante".

CE_x: concentration de la substance chimique d'essai dissoute dans le milieu d'essai entraînant une réduction de x % (par exemple 50 %) de la croissance de *Lemna* durant une période d'exposition définie (à mentionner explicitement si elle dépasse la durée normale ou totale de l'essai). Afin de distinguer les valeurs de la CE mesurées en fonction du taux de croissance de celles mesurées en fonction du rendement, on utilise les abréviations CE_t, s'agissant du taux de croissance, et CE_r, s'agissant du rendement, suivies par la mention de la variable utilisée, par exemple CE_t (nombre de thalles).

Dynamique: qualifie un essai dans lequel les solutions expérimentales sont renouvelées en continu.

Thalle: désigne l'appareil végétatif de la lentille d'eau réduit à une petite lame ovale individuelle. Il représente la plus petite unité (individu) capable de reproduction.

Gibbosité: bosse ou renflement apparaissant sur les thalles.

Croissance: augmentation de la variable mesurée, par exemple le nombre de thalles, le poids sec, le poids frais ou la superficie des thalles, au cours de l'essai.

Taux de croissance (taux de croissance spécifique moyen): accroissement logarithmique de la biomasse durant la période d'exposition.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): concentration d'essai la plus faible à laquelle on observe que la substance exerce un effet statistiquement significatif de réduction de croissance (à $p < 0,05$) par comparaison avec le témoin, durant une période d'exposition donnée. Néanmoins, toutes les concentrations supérieures à la CMEO doivent avoir un effet néfaste supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Lorsque ces deux conditions ne peuvent pas être remplies, il faut expliquer en détail la façon dont la CMEO (et donc la CSEO) a été choisie.

Variable mesurée: tout type de variable mesurée pour exprimer l'effet étudié au cours de l'essai par une ou plusieurs variables étudiées. Dans cette méthode, le nombre de thalles, la superficie des thalles, le poids frais et le poids sec sont des variables mesurées.

Monoculture: culture monospécifique.

Nécrose: tissu (des thalles) mort (c'est-à-dire blanc ou gorgé d'eau).

Concentration sans effet observé (CSEO): concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

Phénotype: caractéristiques observables d'un organisme déterminées par l'interaction de ses gènes avec l'environnement.

Variable étudiée: variable permettant d'estimer la toxicité à partir de n'importe quelle variable mesurée décrivant la biomasse, selon différentes méthodes de calcul. Dans cette méthode d'essai, les taux de croissance et le rendement représentent les variables étudiées déduites de variables mesurées, telles que le nombre de thalles, la superficie des thalles, le poids frais ou le poids sec.

Essai semi-statique: essai dans lequel la solution d'essai est renouvelée périodiquement à intervalles définis durant l'essai.

Essai statique: essai sans renouvellement de la solution d'essai durant l'essai.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai

Effet étudié: décrit le facteur général qui sera modifié par rapport au témoin par la substance d'essai. Dans la présente méthode d'essai, l'effet étudié est l'inhibition de la croissance qui peut être exprimée par différentes variables étudiées déduites d'une ou plusieurs variables mesurées.

Milieu expérimental: milieu de croissance synthétique complet dans lequel les plantes mises à l'épreuve se développent pendant qu'elles sont exposées à la substance chimique d'essai. La substance chimique d'essai sera normalement dissoute dans le milieu expérimental.

Rendement: valeur de la variable mesurée choisie pour exprimer la biomasse à la fin de la période d'exposition moins la valeur de cette variable au début de la période d'exposition.

Appendice 2

Description de *Lemna* spp.

La plante aquatique communément appelée “lentille d’eau”, *Lemna* spp., appartient à la famille des Lemnaceae représentée par quatre genres répartis dans le monde. Leur taxonomie et leur aspect ont été décrits de façon complète (1)(2). *Lemna gibba* et *Lemna minor* sont des espèces représentées dans des zones tempérées et couramment utilisées dans les essais de toxicité. Ces deux espèces se caractérisent par une tige discoïde (thalle) flottante ou submergée, et une racine très fine partant du centre de la face inférieure de chaque thalle. *Lemna* spp. produisent rarement des fleurs et se reproduisent par voie végétative en engendrant de nouveaux thalles (3). Comparativement aux sujets âgés, les jeunes plantes ont tendance à être plus pâles, à avoir des racines plus courtes et à comporter deux ou trois thalles de différentes tailles. De par leur petite taille, leur structure simple, leur reproduction asexuée et la brièveté du temps séparant deux générations, les plantes du genre *Lemna* se prêtent remarquablement bien aux essais en laboratoire (4)(5).

La sensibilité étant susceptible de varier entre les espèces, seules les comparaisons de sensibilités intraspécifiques sont valables.

Exemples d'espèces de *Lemna* ayant servi à des essais: références bibliographiques des espèces

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licenciate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N.A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., “Public draft”. EPA 712-C-96-156. 8 pages.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 pages.

Institut suédois de normalisation (SIS). (1995). Qualité de l'eau — Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, lentille d'eau, sur sept jours. SS 02 82 13. 15 pages (en suédois)

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test with *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp 733-742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., “Public draft”. EPA 712-C-96-156. 8 pages.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J.R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D.B., Shay, J.M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481-483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Sources d'espèces de *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tél: + 1-416-978-3641
Fax: + 1-416-978-5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
États-Unis
Tél.: 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
SUÈDE
Tél.: +4686747240
Fax: +4686747636

Umweltbundesamt (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Allemagne
e-mail: lemna@uba.de

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Hillman, W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. *The Botanical Review*, 27:221-287.
 - (2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.
 - (3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.
 - (4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environmental Pollution*, Ser B, 11:1-14.
 - (5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. *Environmental Research*, 52 7-22.
-

*Appendice 3***Entretien d'une culture mère**

Les cultures mères peuvent être conservées à basse température (4-10 °C) durant de longues périodes sans qu'il soit nécessaire de les rétablir. Le milieu de croissance des *Lemna* peut être identique à celui utilisé pour les essais, mais d'autres milieux riches en nutriments conviennent également aux cultures mères.

Régulièrement, plusieurs jeunes plantes vert clair sont prélevées et transférées aseptiquement dans de nouveaux récipients de culture contenant un milieu frais. Aux basses températures proposées ici, les sous-cultures peuvent être lancées à des intervalles allant jusqu'à trois mois.

Il convient d'utiliser des récipients de culture en verre stériles et chimiquement propres (lavés à l'acide) et d'employer des techniques de manipulation aseptiques. Si la culture mère est contaminée, par des algues ou des champignons par exemple, on prendra les mesures nécessaires pour éliminer les organismes contaminants. S'agissant des algues et de la plupart des autres organismes contaminants, une stérilisation en surface peut suffire. Pour ce faire, on prélève un échantillon des plantes contaminées et on leur coupe les racines. On agite ensuite les plantes vigoureusement dans de l'eau propre, avant de les immerger dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % (v/v) durant 30 secondes à 5 minutes. Après quoi, on rince les plantes à l'eau stérile et on les transfère en plusieurs lots dans des récipients de culture contenant du milieu de croissance frais. Ce traitement détruit beaucoup de thalles, surtout si les périodes d'exposition sont plus longues, mais certaines des plantes survivantes ne sont généralement plus contaminées. Celles-ci peuvent alors être utilisées pour ensemercer de nouvelles cultures.

Appendice 4

Milieux

Différents milieux de croissance sont recommandés pour *L. minor* et *L. gibba*, à savoir une version modifiée du milieu établi par l'Institut suédois de normalisation (SIS) pour *L. minor*, et le milieu 20X AAP pour *L. gibba*. Ces deux milieux, dont les compositions sont données ci-dessous, doivent être préparés avec des réactifs et des produits de qualité "réactif ou pour analyse" et de l'eau désionisée.

Milieu de croissance pour *Lemna* établi d'après celui de l'Institut suédois de normalisation

- Les solutions mères I - V sont stérilisées à l'autoclave (120 °C, 15 minutes) ou par filtration sur une membrane (à pores d'environ 0,2 µm).
- La solution mère VI (et, si on le souhaite, la solution mère VII) ne sont stérilisées que par filtration sur membrane; elles ne doivent pas être autoclavées.
- Les solutions mères stériles doivent être entreposées au frais et à l'obscurité. Les solutions mères I - V doivent être éliminées après six mois, tandis que la solution mère VI et, le cas échéant, la solution mère VII, sont périmées après 1 mois.

Solution mère n°	Substance	Concentration dans la solution mère (g/l)	Concentration dans le milieu préparé (mg/•l)	Milieu préparé	
				Élément	Concentration (mg/•l)
I	NaNO ₃	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH ₂ PO ₄	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	CaCl ₂ · 2H ₂ O	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na ₂ CO ₃	4,0	20	C	2,3
V	H ₃ BO ₃	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (tampon)	490	490	—	—

Pour préparer un litre de milieu SIS, ajouter les ingrédients suivants à 900 ml d'eau désionisée:

- 10 ml de solution mère I
- 5 ml de solution mère II
- 5 ml de solution mère III
- 5 ml de solution mère IV
- 1 ml de solution mère V
- 5 ml de solution mère VI
- 1 ml de solution mère VII (facultatif)

Note: la solution mère VII (tampon MOPS) peut être nécessaire pour certaines substances chimiques d'essai (voir au paragraphe 11).

Le pH est ajusté à $6,5 \pm 0,2$ avec du HCl ou du NaOH 0,1 ou 1 M, et le volume est porté à un litre avec de l'eau désionisée.

Milieu de croissance 20X AAP

Les solutions mères sont préparées dans de l'eau stérile distillée ou désionisée.

Les solutions mères stériles doivent être entreposées au frais et à l'obscurité. Dans ces conditions, les solutions mères se conservent au moins 6 à 8 semaines.

Cinq solutions mères nutritives (A1, A2, A3, B et C) sont préparées pour le milieu 20X AAP, avec des produits de qualité "réactif". Le milieu de croissance se compose de 20 ml de chaque solution mère nutritive ajoutés à environ 850 ml d'eau désionisée. Le pH est ajusté à $7,5 \pm 0,1$ avec du HCl ou du NaOH 0,1 ou 1 M, et le volume est porté à un litre avec de l'eau désionisée. Le milieu est ensuite filtré sur une membrane à pores d'environ 0,2 μm dans un récipient stérile.

Le milieu de croissance destiné aux essais doit être préparé 1 à 2 jours avant son utilisation pour que le pH ait le temps de se stabiliser. On vérifie le pH du milieu de croissance avant utilisation et on le rajuste si nécessaire par l'ajout d'une solution de HCl ou de NaOH 0,1 ou 1 M, comme décrit ci-dessus.

Solution mère n°	Substance	Concentration dans la solution mère (g/•l) (*)	Concentration dans le milieu préparé (mg/•l) (*)	Milieu préparé	
				Élément	Concentration (mg/•l) (*)
A1	NaNO ₃	26	510	Na;N	190;84
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	12	240	Mg	58,08
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	4,4	90	Ca	24,04
A2	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	290	S	38,22
A3	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	1,4	30	K;P	9,4;3,7

Solution mère n°	Substance	Concentration dans la solution mère (g/•l) (*)	Concentration dans le milieu préparé (mg/•l) (*)	Milieu préparé	
				Élément	Concentration (mg/•l) (*)
B	H ₃ BO ₃	0,19	3,7	B	0,65
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,42	8,3	Mn	2,3
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,16	3,2	Fe	0,66
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0,30	6,0	—	—
	ZnCl ₂	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	NaHCO ₃	15	300	Na;C	220 43

(*) sauf mention contraire

Note: la concentration finale de bicarbonate théoriquement appropriée (permettant d'éviter un ajustement appréciable du pH) est de 15 mg/l et non de 300 mg/l. Toutefois, le milieu 20X-AAP a jusqu'à présent été utilisé avec une concentration de 300 mg/l de bicarbonate, y compris dans l'essai tournant conduit pour cette méthode d'essai [I. Sims, P. Whitehouse et R. Lacey (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency].

Milieu de STEINBERG (d'après la norme ISO 20079)

Concentrations et solutions mères

Dans la norme ISO 20079, le milieu modifié de Steinberg n'est utilisé que pour *Lemna minor* (puisque seule *Lemna minor* est autorisée dans les essais relevant de cette norme), mais des essais ont montré que *Lemna gibba* pouvait également donner de bons résultats.

Ce milieu doit être préparé avec des produits de qualité "réactif" ou "pour analyse" et de l'eau désionisée.

Préparer le milieu nutritif à partir de solutions mères ou du milieu dix fois plus concentré (permettant d'atteindre une concentration maximale sans précipitation).

Tableau 1

milieu de STEINBERG À pH stabilisé (modifié par Altenburger)

Constituant		Milieu nutritif	
Macroéléments	poids molaire	mg/l	mmol/l
KNO ₃	101,12	350,00	3,46
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236,15	295,00	1,25
KH ₂ PO ₄	136,09	90,00	0,66
K ₂ HPO ₄	174,18	12,60	0,072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,37	100,00	0,41

Constituant		Milieu nutritif	
Microéléments	poids molaire	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃	61,83	120,00	1,94
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,43	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241,92	44,00	0,18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	197,84	180,00	0,91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	270,21	760,00	2,81
EDTA dihydrate de sodium	372,24	1 500,00.	4,03

Tableau 2

Solutions mères (macroéléments)

1. Macroéléments (concentrés 50 fois)	g/l
Solution mère 1:	
KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
Solution mère 2:	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,00
Solution mère 3:	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	14,75

Tableau 3

Solutions mères (microéléments)

2. Microéléments (concentrés 1 000 fois)	mg/l
Solution mère 4:	
H ₃ BO ₃	120,0
Solution mère 5:	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
Solution mère 6:	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0

2. Microéléments (concentrés 1 000 fois)	mg/l
Solution mère 7:	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0
Solution mère 8:	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	760,00
EDTA dihydrate de sodium	1 500,00.

- Les solutions mères 2 et 3 peuvent être réunies, de même que les solutions mères 4 et 7 (en tenant compte des concentrations requises).
- Pour augmenter la durée de conservation des solutions mères, stériliser celles-ci en les laissant 20 minutes dans l'autoclave à 121 °C ou en les filtrant de manière stérile sur une membrane à pores de 0,2 µm. La stérilisation par filtration (0,2 µm) est fortement recommandée pour la solution mère 8.

Préparation du milieu de STEINBERG (modifié) à la concentration finale

- Ajouter 20 ml des solutions mères 1, 2 et 3 (voir tableau 2) à environ 900 ml d'eau désionisée afin d'éviter une précipitation.
- Ajouter 1,0 ml des solutions mères 4, 5, 6, 7 et 8 (voir tableau 3).
- Le pH doit être à 5,5 ± 0,2 (ajuster par ajout d'un volume minime de solution de NaOH ou de HCl).
- Porter à 1 000 ml avec de l'eau.
- Si les solutions mères sont stérilisées et qu'on utilise une eau appropriée, aucune stérilisation supplémentaire n'est nécessaire. Si le milieu final est stérilisé, la solution mère 8 doit être ajoutée après l'autoclavage (à 121 °C pendant 20 minutes).

Préparation du milieu de STEINBERG (modifié) concentré 10 fois pour stockage intermédiaire

- Ajouter 20 ml des solutions mères 1, 2 et 3 (voir tableau 2) à environ 30 ml d'eau afin d'éviter une précipitation.
- Ajouter 1,0 ml des solutions mères 4, 5, 6, 7 et 8 (voir tableau 3). Porter à 100 ml avec de l'eau.
- Si les solutions mères sont stérilisées et qu'on utilise une eau appropriée, aucune stérilisation supplémentaire n'est nécessaire. Si le milieu final est stérilisé, la solution mère 8 doit être ajoutée après l'autoclavage (à 121 °C pendant 20 minutes).
- Le pH du milieu (concentration finale) doit être à 5,5 ± 0,2.»

(6) Les chapitres C.31 à C.46 suivants sont ajoutés:

«C.31. ESSAI SUR PLANTE TERRESTRE: ESSAI D'ÉMERGENCE DE PLANTULES ET DE CROISSANCE DE PLANTULES

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 208 (2006) pour les essais de produits chimiques de l'OCDE. Les méthodes d'essai sont régulièrement révisées pour tenir compte des progrès scientifiques et de l'adéquation à la pratique réglementaire. La présente méthode d'essai mise à jour a pour objet d'évaluer les effets potentiels de substances chimiques sur l'émergence et la croissance de plantules. Elle ne couvre pas pour autant tous les effets chroniques ni tous les effets sur la reproduction (c'est-à-dire la grénaison, la formation de fleurs, la maturation des fruits). Il est impératif de tenir compte des conditions d'exposition et des propriétés de la substance de l'essai pour garantir l'utilisation de procédés d'essai appropriés (par exemple, lors de l'essai de métaux et de composés métalliques, il convient de prendre en compte les effets de pH et des contre-ions associés) (1). La présente méthode d'essai ne concerne pas les plantes exposées à des vapeurs de substances chimiques. Elle s'applique aux essais de produits chimiques généraux, aux biocides et aux produits de protection des cultures (également désigné par produits phytosanitaires ou pesticides). Elle s'inspire de procédés existants (2) (3) (4) (5) (6) (7). D'autres références en lien avec les essais sur plantes ont également été consultées (8) (9) (10). L'Appendice 1 présente les définitions utilisées.

PRINCIPE DE L'ESSAI

2. Le test évalue les effets d'une exposition à la substance chimique d'essai contenue dans le sol (ou une autre matrice de sol appropriée) sur l'émergence des plantules et le début de croissance des plantes supérieures. Les semences sont placées au contact d'un sol traité par la substance chimique d'essai, dont les effets sont évalués au bout d'environ 14 à 21 jours après émergence de 50 % des plantules dans le groupe témoin. Les points finals mesurés représentent l'évaluation visuelle de l'émergence des plantules, le poids sec des pousses (ou bien le poids frais des pousses) et dans certains cas la hauteur des pousses, ainsi que l'évaluation des effets nocifs visibles sur différentes parties de la plante. Ces mesures et observations sont comparées à celles réalisées sur des plantes témoins non traitées.
3. Selon la voie d'exposition probable, la substance chimique d'essai est incorporée dans le sol (ou éventuellement dans une matrice de sol artificiel) ou bien appliquée sur la surface du sol, ce qui représente précisément la voie potentielle d'exposition au produit chimique. La substance est incorporée dans le sol par traitement du sol brut. Après l'application, le sol est transféré dans des pots, puis les graines de l'espèce de plante donnée sont plantées dans le sol. Dans les cas d'application en surface, le produit chimique est appliqué sur le sol en pots dans lequel les graines ont déjà été plantées. Les unités d'essai (témoins et sols traités plus graines) sont ensuite placées dans des conditions appropriées favorisant la germination et/ou la croissance des plantes.
4. Selon l'objectif visé par l'étude, l'essai peut permettre de déterminer la courbe dose-réponse, ou il peut être mis en œuvre à une unique concentration ou un unique taux, et il s'agit alors d'un essai de seuil. Si les résultats de l'essai sur une seule concentration ou un seul taux excèdent un certain seuil de toxicité (par exemple, lorsque des effets supérieurs à x % sont observés), on procède à un essai de détermination de l'ordre de grandeur afin de définir les limites de toxicité supérieures et inférieures, puis à un essai employant plusieurs concentrations ou taux afin de tracer une courbe dose-réponse. Une analyse statistique appropriée permet de calculer une concentration efficace CE_x ou un taux d'application efficace TE_x (par exemple CE_{25} , TE_{25} , CE_{50} , TE_{50}), pour le paramètre ou les paramètres pertinents les plus sensibles. Cet essai peut également fournir les valeurs calculées de concentration sans effet observé (CSEO) et de concentration minimale avec effet observé (CMEO).

INFORMATION SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

5. La détermination de la voie d'exposition probable de la substance chimique, et par conséquent la conception de l'essai pourront s'appuyer sur les informations suivantes: formule développée, pureté, solubilité dans l'eau, solubilité dans les solvants organiques, coefficient de partage n-octanol/eau, comportement de sorption par le sol, pression de vapeur, stabilité chimique vis-à-vis de l'eau et de la lumière et biodégradabilité.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

6. Pour valider l'essai, les critères de performance suivants devront être satisfaits par les témoins:
 - L'émergence des plantules atteint au moins 70 %;
 - les plantes ne présentent aucun effet phytotoxique visible (par exemple, chlorose, nécrose, flétrissement, déformation des feuilles et des tiges). Seules des variations normales de la croissance et de la morphologie de l'espèce particulière de plantes sont observées;
 - le taux de survie moyen des plantules témoins émergées est d'au moins 90 % pendant la durée de l'étude;
 - les conditions environnementales pour une espèce particulière sont identiques et les milieux de croissance contiennent la même quantité de matrice de sol, de milieu de support ou de substrat provenant de la même source.

SUBSTANCE CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

7. L'essai d'une substance chimique de référence à intervalles réguliers permet de vérifier la régularité des performances de l'essai et de la réponse des plantes particulières de l'essai, ainsi que des conditions d'essai. Il est également possible d'utiliser des mesures historiques de biomasse ou de croissance de témoins pour évaluer les performances du système d'essai dans des laboratoires particuliers et ces mesures peuvent également servir de contrôle de qualité intra-laboratoire.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sol naturel — Substrat artificiel

8. On peut cultiver les plantes dans des pots contenant un limon sableux, un sable limoneux ou un limon d'argile sableuse dont la teneur en carbone organique peut atteindre 1,5 % (environ 3 % de matières organiques). Un terreau commercial ou un mélange de sol synthétique qui contient jusqu'à 1,5 % de carbone organique conviennent également. Les sols argileux doivent être exclus si la substance chimique de l'essai a une affinité élevée avérée pour les argiles. Les sols de champs doivent être tamisés pour homogénéiser la taille de particule en dessous de 2 mm et éliminer les particules grossières. Le type et la texture, la proportion de carbone organique, le pH et la teneur en sels mesurée par la conductivité électronique du sol préparé final doivent être enregistrés, et le sol classé conformément à un schéma de classification standard (11). Pour réduire les effets des pathogènes du sol, celui-ci pourra subir une pasteurisation ou un traitement thermique.
9. L'emploi d'un sol naturel peut compliquer l'interprétation des résultats et augmenter la variabilité, du fait de la variation des propriétés physicochimiques et des populations microbiennes. Ces paramètres peuvent modifier la capacité de rétention d'humidité, la capacité de liaison chimique, l'aération et la teneur en nutriment et en oligoéléments. Les fluctuations de ces facteurs physiques s'ajoutent à des variations des propriétés chimiques telles que le pH et le potentiel redox, qui peuvent affecter la biodisponibilité de la substance d'essai (12) (13) (14).
10. Il est inhabituel d'utiliser des substrats artificiels pour les essais de produits phytosanitaires, mais ils peuvent être employés pour les essais de produits chimiques généraux ou lorsqu'il est souhaitable de réduire la variabilité des sols naturels et d'améliorer la comparabilité des résultats de l'essai. Les substrats doivent être composés de matériaux inertes présentant des interactions minimales avec la substance chimique d'essai, le solvant véhicule ou les deux. Des matériaux inertes appropriés qui absorbent très peu la substance d'essai (15), assurant ainsi une disponibilité maximale de la substance pour les plantules par absorption racinaire, sont le sable de quartz lavé par un acide, la laine minérale et les billes de verre (par exemple, de 0,35 à 0,85 mm de diamètre). La vermiculite, la perlite ou d'autres matériaux très absorbants ne conviennent pas. L'apport de nutriments favorisant la croissance végétale évitera aux plantes les stress dus aux carences nutritives, qui seront évaluées, si possible, par des analyses chimiques ou un contrôle visuel des plantes témoins.

Critère de sélection de l'espèce de l'essai

11. L'espèce sélectionnée devra être raisonnablement répandue, par exemple, en termes de diversité taxonomique dans le royaume végétal, de distribution, d'abondance, de caractéristiques du cycle vital spécifique de l'espèce et de régions d'occurrence naturelle, pour permettre le développement d'une série de réponses (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Le choix devra tenir compte des caractéristiques suivantes des espèces d'essai envisagées:
 - Les semences de l'espèce sont uniformes, et largement disponibles auprès de sources de semences standard fiables, et produisent une germination régulière, fiable et uniforme, ainsi qu'une croissance uniforme des plantules;
 - La plante est adaptée à l'essai au laboratoire, et susceptible de donner des résultats fiables et reproductibles dans une même installation d'essai et entre des installations d'essai différentes;
 - La sensibilité de l'espèce d'essai doit correspondre aux réponses des plantes se trouvant dans l'environnement exposé à la substance;
 - L'espèce a déjà été utilisée dans des essais de toxicité antérieurs de quelque ampleur, et son comportement, par exemple dans des essais biologiques d'herbicides, le criblage de métaux lourds, des essais de stress salin ou minéral ou des études d'allélopathie indique une sensibilité à une large gamme d'agents stressants;
 - elle est compatible avec les conditions de croissance du procédé de l'essai;
 - elle se conforme aux critères de validité de l'essai.

Certaines des espèces les plus couramment utilisées dans le passé sont indiquées dans l'Appendice 2 et des espèces non cultivées potentielles dans l'Appendice 3.

12. Le nombre d'espèces à inclure dans l'essai dépend des exigences réglementaires en vigueur et n'est par conséquent pas spécifié dans la présente méthode d'essai.

Application de la substance chimique d'essai

13. La substance chimique doit être appliquée dans un support approprié (par exemple eau, acétone, éthanol, polyéthylène glycol et gomme arabique). Il est également possible de tester des mélanges (produits préparés ou préparations) contenant les ingrédients actifs et divers adjuvants.

Incorporation dans le sol ou dans le substrat artificiel

14. Les substances chimiques hydrosolubles ou en suspension dans l'eau peuvent être ajoutées à de l'eau, et la solution est ensuite mélangée avec du sol à l'aide d'un dispositif de mélange approprié. Ce type d'essai peut convenir pour une exposition au produit chimique par le sol ou par l'eau de porosité et lorsqu'il y a un risque d'absorption racinaire. La quantité de la substance chimique d'essai ajoutée ne doit pas excéder la capacité de rétention d'eau du sol. Le volume d'eau ajouté doit être identique pour chaque concentration de l'essai, tout en restant limité afin d'éviter la formation d'amas de sol aggloméré.
15. Les substances chimiques à faible solubilité dans l'eau doivent être dissoutes dans un solvant volatile approprié (par exemple acétone, éthanol) et mélangées à du sable. Il est possible de retirer ensuite le solvant du sable à l'aide d'un courant d'air sous agitation continue du sable. Le sable traité est ensuite mélangé avec le sol expérimental. Un second témoin constitué seulement de sable ou de solvant est préparé. Les traitements à différentes doses et le second témoin reçoivent des quantités égales de sable duquel le solvant a été mélangé puis ôté. Dans le cas de substances chimiques d'essai solides insolubles, le mélange de sol sec et de produit chimique est préparé dans un dispositif de mélange approprié. Ensuite, le sol est ajouté aux pots et les graines y sont immédiatement semées.
16. Lorsqu'un substrat artificiel remplace le sol, les produits chimiques solubles dans l'eau peuvent être dissous dans la solution nutritive juste avant le début de l'essai. Les produits chimiques insolubles dans l'eau, mais qu'il est possible de mettre en suspension dans l'eau grâce à un support de solvant, sont ajoutés avec le support à la solution nutritive. Les produits chimiques insolubles dans l'eau pour lesquels il n'existe aucun support hydrosoluble non toxique doivent être dissous dans un solvant volatil approprié. La solution mélangée avec du sable ou des billes de verre est placée dans un appareil rotatif sous vide et évaporée, en formant un revêtement uniforme de produit chimique sur le sable ou les billes. Une portion tarée de billes est extraite par le même solvant organique et le produit chimique de l'essai dosé avant de remplir les pots.

Application en surface

17. Dans le cas de produits phytosanitaires, l'application de la solution d'essai se fait souvent par pulvérisation sur la surface du sol d'une solution d'essai. Le modèle et la capacité de tous les équipements utilisés pour conduire l'essai, en particulier les appareils utilisés pour préparer et administrer la substance chimique d'essai, doivent permettre sa mise en œuvre précise, avec une couverture reproductible. Celle-ci doit être uniforme sur les surfaces de sol. On s'efforcera d'éviter d'éventuelles interactions par absorption ou réaction des produits chimiques avec le matériel (par exemple, tubes de plastique et produits chimiques, composants ou éléments en acier). La pulvérisation de la substance chimique d'essai sur la surface de sol simule des applications par pulvérisations usuelles. En général, les volumes pulvérisés se situent dans l'intervalle utilisé en pratique agronomique normale et ils doivent être notés (quantité d'eau etc.). Le type de buse choisi doit permettre de couvrir uniformément la surface de sol. Dans le cas d'applications de solvants ou de supports, un second groupe de plantes témoins est mis en place et ne reçoit que le solvant ou le support, sauf pour les produits phytosanitaires testés sous forme de formulations.

Vérification de la concentration ou du taux de substance chimique d'essai

18. Les concentrations ou les taux d'application doivent être confirmés par une vérification analytique appropriée. L'analyse de la concentration la plus élevée de solutions d'essai, associée au relevé des dilutions consécutives et à l'utilisation d'applicateurs étalonnés (par exemple, verrerie analytique étalonnée, étalonnage du pulvérisateur) confirmera éventuellement la vérification des concentrations et les taux de l'essai pour substances chimiques solubles. Pour les substances chimiques insolubles, la vérification devra s'appuyer sur les poids de substance chimique d'essai ajoutés au sol. L'analyse du sol peut être nécessaire dans le cas où l'homogénéité de l'application doit être démontrée.

RÉALISATION DE L'ESSAI

Modèle de l'essai

19. Des graines de la même espèce sont semées en pots. Le nombre de graines par pot dépend de l'espèce, de la taille du pot et de la durée de l'essai, et doit garantir des conditions de croissance adéquates et uniformes et éviter la surpopulation pendant la durée de l'essai. La densité maximale de graines est d'environ 3 à 10 graines par cm², selon la taille des graines. Par exemple, des densités d'un ou deux plants de maïs, de soja, de tomate, de concombre ou de betterave à sucre par récipient de 15 cm, de trois plants de colza ou de pois par récipient de 15 cm et de 5 à 10 graines d'oignons, de blé ou d'autres petites graines par récipient de 15 cm sont recommandées. Le nombre de graines et de répliques de pots (une réplique correspond à un pot, et par conséquent les plantes dans un même pot ne peuvent faire fonction de répliques) doit satisfaire aux conditions d'une analyse statistique optimale (21). Il convient de noter que la variabilité augmente pour les espèces d'essai à grosses graines dont on n'utilise moins de graines par pot (réplique) par rapport à des espèces d'essai pour lesquelles il est possible d'utiliser des nombres plus élevés de petites graines par pot. En plantant un nombre égal de graines dans chaque pot, cette variabilité diminue.
20. L'utilisation de groupes de contrôle permet de confirmer que les effets observés ne peuvent être associés ou attribués qu'à l'exposition à la substance chimique d'essai. Le groupe de contrôle approprié doit être identique sous tous rapports avec le groupe d'essai, à l'exception de l'exposition à la substance chimique d'essai. Dans un essai donné, toutes les plantes de l'essai, y compris les témoins devront provenir de la même source. Pour éliminer tout biais, une répartition aléatoire des pots d'essai et témoins est indispensable.
21. Il convient d'éviter l'emploi de graines recouvertes d'un insecticide ou d'un fongicide (c'est à dire les graines enrobées). Toutefois, l'utilisation de certains fongicides de contact non systémiques (par exemple captan, thiram) est autorisée par certaines autorités réglementaires (22). Le problème éventuel des pathogènes disséminés par les semences peut être résolu par une brève immersion des semences dans une solution d'hypochlorite à 5 %, suivie d'un rinçage abondant à l'eau courante et d'un séchage. Aucun autre traitement curatif par des produits phytosanitaires n'est autorisé.

Conditions de l'essai

22. Les conditions de l'essai doivent être aussi proches que possible des conditions nécessaires à la croissance normale ou des conditions environnementales habituelles pour l'espèce et les variétés testées (voir par exemple Appendice 4). Les plantes émergentes doivent être entretenues par de bonnes pratiques horticoles dans des chambres à environnement contrôlé, des phytotrons ou des serres. Si l'on dispose des installations adéquates, ces pratiques comprennent habituellement le contrôle et l'enregistrement suffisamment fréquents (par exemple quotidien) de la température, de l'humidité, de la concentration de dioxyde de carbone, des variables de luminosité (intensité, longueur d'onde, domaine de longueur d'onde autorisant la photosynthèse) et de la périodicité lumineuse, du fonctionnement des dispositifs d'arrosage, etc, permettant d'assurer une croissance satisfaisante de la plante estimée par l'observation des plantes témoins. Les températures de serre sont contrôlées par des systèmes de ventilation, de chauffage et/ou de refroidissement. Les conditions suivantes sont généralement recommandées pour les essais en serre:

- température: 22 °C ± 10 °C;
- humidité: 70 % ± 25 %;
- photopériode: 16 heures de lumière au minimum;
- intensité lumineuse: 350 ± 50 µE/m²/s. Un éclairage d'appoint peut être nécessaire si l'intensité descend en dessous de 200 µE/m²/s, longueur d'onde 400-700 nm, sauf pour certaines espèces dont les exigences en lumière sont moindres.

Les conditions environnementales doivent être contrôlées et notées pendant la durée de l'étude. Les plantes sont cultivées dans des pots en plastique non poreux ou émaillé posés sur une clayette ou une soucoupe. On peut les déplacer périodiquement pour diminuer la variabilité de croissance entre plantes (provoquées par des différences de conditions d'essai dans les installations de culture). La taille des pots doit être suffisante pour une croissance.

23. Des suppléments peuvent compléter les nutriments du sol pour assurer une bonne vigueur végétale. Les besoins en nutriments et le calendrier de leur addition sont déterminés par l'observation des plantes témoins. Il est recommandé d'alimenter en eau par le fond des récipients d'essai (par exemple, en utilisant des mèches en fibres de verre). Toutefois, un arrosage initial par le haut peut stimuler la germination des graines et faciliter le déplacement du produit chimique dans le sol lors d'une application sur la surface du sol.

24. Les conditions de croissance spécifiques doivent être adaptées à l'espèce d'essai et à la substance chimique d'essai à l'étude. Il faut maintenir les plantes témoins et traitées dans les mêmes conditions environnementales, et prendre par conséquent des dispositions pour empêcher une exposition croisée (par exemple par des substances volatiles) entre différents traitements, et une exposition des témoins à la substance chimique d'essai.

Essais à une seule concentration ou un seul taux

25. Plusieurs facteurs prévalent lorsque l'on cherche à déterminer la concentration ou le taux approprié d'une substance dans le cadre d'un essai à une seule concentration ou un seul taux (stimulation/limite). Ils comprennent les propriétés physiques et chimiques de la substance, lorsqu'il s'agit de substances chimiques à usage général. Pour les produits phytosanitaires, il convient de tenir compte des propriétés physico-chimiques et du régime d'utilisation de la substance chimique d'essai, de sa concentration ou de son taux maximal, du nombre d'applications par saison et/ou de la persistance de la substance chimique d'essai. La détermination d'éventuelles propriétés phytotoxiques d'un produit chimique général peut demander la mise en œuvre de l'essai à une teneur maximale de 1 000 mg/kg de sol sec.

Essai de détermination de l'ordre de grandeur

26. Le cas échéant, un essai de détermination de l'ordre de grandeur peut contribuer à fixer la concentration ou le taux d'application à expérimenter dans l'étude dose-réponse définitive. Dans un tel essai, les concentrations ou les taux à tester sont largement espacés (par exemple 0,1, 1,0, 10, 100 et 1 000 mg/kg de sol sec). Dans le cas de produits phytosanitaires, on peut calculer les concentrations ou les taux à partir de la concentration ou du taux d'application recommandé ou maximal, par exemple, 1/100, 1/10, ou 1 fois la concentration ou le taux d'application recommandé ou maximal.

Essais à plusieurs concentrations ou taux d'application

27. L'objectif d'un essai à plusieurs concentrations ou taux d'application est l'établissement d'une relation dose-réponse et la détermination d'une valeur de CE_x ou de TE_x lié à l'émergence, à la biomasse et/ou à des effets visuels par rapport à des témoins non exposés, comme il est exigé par les autorités réglementaires.
28. L'intervalle entre les concentrations ou les taux ainsi que leur nombre doivent être suffisants pour établir une relation dose-réponse et une équation de régression, et obtenir une estimation des CE_x ou des TE_x . Les intervalles de concentration ou de taux doivent englober les valeurs de CE_x ou de TE_x à déterminer. Par exemple, si l'on recherche une CE_{50} , il est préférable de conduire l'essai à des taux produisant un effet de 20 à 80 %. Le nombre recommandé de concentrations ou de taux d'essai pour atteindre cet objectif est d'au moins 5 en série géométrique, plus un témoin non traité, espacés d'un facteur d'au plus trois. Pour chaque groupe de traitement et de contrôle, le nombre de répliques doit être au moins égal à quatre et le nombre total de graines au moins égal à 20. Pour certaines plantes à faible taux de germination ou aux caractéristiques de croissance variables, davantage de répliques peuvent être nécessaires pour augmenter la puissance statistique de l'essai. Lorsque l'on utilise un grand nombre de concentrations ou de taux d'essai, on peut réduire le nombre de répliques. Pour estimer le CSEO, il faut parfois davantage de répliques pour obtenir la puissance statistique adéquate (23).

Observations

29. Pendant la période d'observation, c'est-à-dire 14 à 21 jours après l'émergence de 50 % des plantes témoins (et également des témoins de solvant, le cas échéant), les plantes sont examinées fréquemment (au moins une fois par semaine et si possible une fois par jour) pour enregistrer l'émergence, la phytotoxicité visuelle et la mortalité. À la fin de l'essai, le pourcentage d'émergence et la biomasse des plantes survivantes sont mesurés, ainsi que les effets nocifs visibles sur différentes parties de la plante, en particulier des anomalies dans l'apparence des plantules émergées, une croissance avortée, une chlorose, une décoloration, une mortalité et des effets sur le développement végétal. La biomasse finale peut être mesurée par le poids sec moyen des pousses des plantes survivantes, après récolte des pousses à la surface du sol et séchage à masse constante à 60 °C, ou bien par le poids frais des pousses. La hauteur de la pousse peut constituer un autre effet mesuré, parfois exigé par les autorités réglementaires. Il convient d'utiliser une notation homogène des lésions visuelles pour évaluer les réponses toxiques détectables. Des exemples pratiques d'évaluations visuelles qualitatives et quantitatives sont proposés dans les références (23) (24).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Analyse statistique*Essai à une seule concentration ou un seul taux*

30. Pour chaque espèce végétale, les données sont analysées en utilisant une méthode statistique appropriée (21). Il convient de noter la valeur d'un effet à la concentration ou au taux de l'essai, ou bien l'incapacité à obtenir un effet donné à la concentration ou au taux de l'essai (par exemple, $< x$ % de l'effet observé à la concentration ou au taux y).

Essais à plusieurs concentrations ou taux d'application

31. Une relation dose-réponse est établie par une équation de régression. Différents modèles sont applicables, par exemple, pour estimer une CE_x ou un TE_x (par exemple CE_{25} , TE_{25} , CE_{50} , TE_{50}) et leurs limites de confiance pour l'émergence sous forme de résultats tout ou rien, d'unités logit, probit, Weibull, les méthodes de Spearman-Kärber et Spearman-Kärber abrégées peuvent convenir. Pour évaluer la croissance des plantules (poids et hauteur) en points finals continus, CE_x ou TE_x et leurs limites de confiance peuvent être estimés à l'aide d'une analyse de régression appropriée (par exemple analyse de régression non linéaire Bruce-Versteeg (25)). Autant que possible, la valeur de R^2 sera supérieure ou égale à 0,7 pour les espèces les plus sensibles et les concentrations ou taux d'essai utilisés comprendront les effets à 20 % et à 80 %. Dans la mesure où il faut estimer le CSEO, il est préférable d'appliquer des tests statistiques puissants qui seront choisis en fonction de la distribution des données (21) (26).

Rapport d'essai

32. Le rapport d'essai doit mentionner les résultats des études ainsi qu'une description détaillée des conditions d'essai, une discussion approfondie des résultats, une analyse des données et les conclusions tirées de l'analyse. Un résumé sous forme de tableaux et une synthèse des résultats sont proposés. Le rapport doit comporter les informations suivantes:

Substance chimique d'essai:

- données d'identification de la substance chimique, propriétés pertinentes de la substance d'essai (par exemple $\log P_{ow}$, solubilité dans l'eau, pression de vapeur et informations sur le devenir et le comportement dans l'environnement lorsqu'elles sont disponibles);
- détails sur la préparation de la solution d'essai et vérification des concentrations d'essai comme il est spécifié dans le paragraphe 18.

Espèces soumises à l'essai:

- détails sur l'organisme expérimental: espèce/varété, familles de plantes, noms scientifiques et communs, source et histoire de la graine aussi détaillées que possible (à savoir, nom du fournisseur, pourcentage de germination, classe de taille de la semence, numéro du lot, année de la semence ou saison de croissance de la récolte, date de l'évaluation de la germination), viabilité, etc.;
- nombre d'espèces monocotylédones et dicotylédones soumises à l'essai;
- justification du choix de l'espèce;
- description du stockage, du traitement et de la maintenance des semences.

Conditions d'essai:

- installation utilisée dans l'essai (par exemple, chambre de croissance, phytotron, serre);
- description du système d'essai (par exemple, dimension des pots, matière des pots et quantité de sol);
- caractéristiques du sol (texture ou type de sol: par exemple distribution et classification des particules du sol, propriétés physiques et chimiques, en particulier pourcentage de matières organiques, pourcentage de carbone organique, pH);
- préparation du sol ou du substrat (par exemple, sol artificiel, sable, et autres) avant l'essai;
- description du milieu nutritif, le cas échéant;

- application de la substance chimique d'essai: description de la méthode d'application, description du matériel, taux d'exposition et volume, en particulier vérification chimique, description de la méthode d'étalonnage, description des conditions environnementales pendant l'application;
- conditions de croissance: intensité lumineuse (par exemple, domaine longueur d'onde autorisant la photosynthèse), photopériode, températures maximales et minimales, régime et procédé d'arrosage, fertilisation;
- nombre de graines par pot, nombre de plantes par dose; nombre de répliques (pots) par taux d'exposition;
- type et nombre de contrôles (témoins négatifs et/ou positifs, témoin de solvant le cas échéant);
- durée de l'essai.

Résultats:

- tableau de tous les effets mesurés pour chaque réplique, taux ou concentration d'essai et espèce;
- pourcentage d'inhibition pour chaque espèce par rapport aux témoins;
- mesures de biomasse (poids sec ou poids frais des pousses) des plantes en pourcentages de témoins;
- hauteur des pousses des plantes en pourcentages des témoins, lorsqu'elles ont été mesurées;
- pourcentage de lésions visibles et description qualitative et quantitative des lésions visibles (chlorose, nécrose, flétrissement, déformation des feuilles et des tiges ainsi qu'une absence quelconque d'effet) provoquées par la substance chimique d'essai par rapport aux plantes témoins;
- description de l'échelle d'évaluation utilisée pour estimer les lésions visibles, lorsqu'une évaluation visuelle est rapportée;
- pour les études à un seul taux, le pourcentage de lésions doit être rapporté;
- valeurs CE_x ou TE_x (par exemple CE_{50} , TE_{50} , CE_{25} , TE_{25}) et limites de confiance correspondantes. Pour chaque analyse de régression, l'écart type pour l'équation de régression et l'écart type pour l'estimation des paramètres individuels (par exemple pente, interception) seront fournis;
- valeurs de CSEO (et de CMEQ) dans le cas où elles ont été calculées;
- description des protocoles statistiques et des hypothèses adoptées;
- présentation graphique de ces données et relation dose-réponse de l'espèce soumise à l'essai.

Variantes des protocoles décrits dans la présente méthode d'essai et tous les événements inhabituels survenus pendant l'essai.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Schrader G., Metge K., and Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. *Applied Soil Ecology*, 7, 189-193.
- (2) Organisation internationale de normalisation. (1993). ISO 11269-1. Qualité du sol -Détermination des effets des polluants sur la flore du sol – Partie 1: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.
- (3) Organisation internationale de normalisation. (1995). ISO 11269-2. Qualité du sol -Détermination des effets des polluants sur la flore du sol – Partie 2: Effets des substances chimiques sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs.
- (4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.
- (5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.
- (6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:
 - 850,4000: Background — Non-target Plant Testing;
 - 850,4025: Target Area Phytotoxicity;

- 850,4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);
 - 850,4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;
 - 850,4225: Seedling Emergence, Tier II;
 - 850,4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.
- (7) AFNOR X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Détermination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.
- (8) Boutin, C., Freemark, K.E. and Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No. 145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.
- (9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., and Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms — A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. No 48.
- (10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., and Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.
- (11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).
- (12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, pp. 163-206.
- (13) Beall, M.L., Jr. and Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.
- (14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R. and Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.
- (15) U.S.Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 pp., FDA, Washington, DC.
- (16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174.
- (17) Boutin, C.; Elmegaard, N. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.
- (18) Boutin, C., and Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides — An analysis with two databases. Ecotoxicology vol.9(4):255-271.
- (19) Boutin, C. and Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.
- (20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P. and Maguire, R.J... (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.
- (21) OCDE (2006). Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Série sur les essais et l'évaluation n° 54, Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (22) Hatzios, K.K. and Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1-63.

- (23) Hamill, P.B., Marriage, P.B. and G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. *Weed Science* 25:386-389.
 - (24) Frans, R.E. and Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) *Research Methods in Weed Science*, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.
 - (25) Bruce, R.D. and Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 1485-1492.
 - (26) Chapitre C.33 de la présente annexe: Essai de reproduction chez le lombric (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*).
-

Appendice 1

Définitions

Ingrédient actif (i.a.) [ou substance active (s.a.)]: matériau destiné à exercer un effet biologique spécifique (par exemple, lutte contre les insectes, contre les maladies végétales, contre les mauvaises herbes, dans la zone de traitement), également désigné par ingrédient actif ou substance active de qualité technique,

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Produits phytosanitaires ou pesticides: matériaux dotés d'une activité biologique spécifique utilisés intentionnellement pour protéger les plantes cultivées contre les nuisibles (par exemple, maladies fongiques, insectes, plantes compétitrices).

CE_x · concentration efficace à x % ou TE_x. taux efficace à x %: concentration ou taux qui provoque un changement ou une altération indésirable de x % de l'effet mesuré de l'essai par rapport au témoin (par exemple, une réduction de 25 % ou de 50 % de l'émergence des plantules, du poids des pousses, du nombre final de plantes présentes ou une augmentation de 25 % ou de 50 % d'une lésion visuelle constituent respectivement une CE₂₅/TE₂₅ ou une CE₅₀/TE₅₀).

Émergence: apparition du coléoptile ou du cotylédon au-dessus de la surface du sol.

Formulation: produit formulé commercial contenant la substance active (ingrédient actif), que l'on appelle également préparation finale ⁽¹⁾ ou produit final typique.

CMEO (concentration minimale avec effet observé): concentration la plus faible de la substance chimique d'essai à laquelle a été observé l'effet. Dans cet essai, la concentration correspondant à la CMEO a un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) pendant une durée d'exposition donnée par rapport au témoin, et est supérieure à la valeur de CSEO.

Plantes non visées: plantes situées hors de la zone contenant les plantes visées. Pour les produits phytosanitaires, ce terme se réfère généralement à des plantes situées hors de la surface de traitement.

CSEO (concentration sans effet observé): concentration la plus élevée de substances d'essai à laquelle aucun effet n'est observé. Dans cet essai, la concentration correspondant à la CSEO n'a pas d'effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) pendant une durée d'exposition donnée lorsqu'on la compare au témoin.

Phytotoxicité: anomalies préjudiciables (selon des mesures et des évaluations visuelles) par rapport à l'apparence et au modèle de croissance normaux des plantes, qui apparaissent en réponse à une substance chimique donnée.

Réplique: unité expérimentale qui représente le groupe de contrôle et/ou le groupe de traitement. Dans ces études, la réplique est définie par un pot.

Évaluation visuelle: appréciation des dommages visuels d'après l'observation du port de la plante, de sa vigueur, de malformations, d'une chlorose, d'une nécrose et de l'apparence globale par rapport à un témoin.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

⁽¹⁾ Préparation finale: produit formulé contenant la substance active (l'ingrédient actif) vendu dans le commerce.

Appendice 2

Liste des espèces habituellement utilisées dans les essais sur plantes

Famille	Espèces	Noms vulgaires
<i>DICOTYLEDONAE</i>		
Apiaceae (Umbelliferae)	<i>Daucus carota</i>	Carotte
Asteraceae (Compositae)	<i>Helianthus annuus</i>	Tournesol
Asteraceae (Compositae)	<i>Lactuca sativa</i>	Laitue
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Sinapis alba</i>	Moutarde blanche
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica campestris</i> var. <i>chinensis</i>	Chou chinois
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica napus</i>	Colza
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Chou
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica rapa</i>	Navet
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Lepidium sativum</i>	Cresson alénois
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Raphanus sativus</i>	Radis
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Betterave à sucre
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativa</i>	Concombre
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Glycine max</i> (<i>G. soja</i>)	Soja
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus aureus</i>	Haricot mungo
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Haricot
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Pisum sativum</i>	Pois
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Fenugrec
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Lotus corniculatus</i>	Lotier corniculé
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trifolium pratense</i>	Trèfle des prés
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Vicia sativa</i>	Vesce cultivée
Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i>	Lin
Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Sarasin
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicon</i>	Tomate

Famille	Espèces	Noms vulgaires
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amaryllidaceae)	<i>Allium cepa</i>	Oignon
Poaceae (Gramineae)	<i>Avena sativa</i>	Avoine
Poaceae (Gramineae)	<i>Hordeum vulgare</i>	Orge
Poaceae (Gramineae)	<i>Lolium perenne</i>	Raygras pérenne
Poaceae (Gramineae)	<i>Oryza sativa</i>	Riz
Poaceae (Gramineae)	<i>Secale cereale</i>	Seigle
Poaceae (Gramineae)	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgho
Poaceae (Gramineae)	<i>Triticum aestivum</i>	Blé
Poaceae (Gramineae)	<i>Zea mays</i>	Maïs

Liste des espèces non cultivées potentielles

Espèces potentielles selon l'OCDE pour les essais de toxicité sur plantes

Note: Le tableau suivant fournit des informations sur 52 espèces non cultivées (les références sont données entre parenthèses pour chaque entrée). Les taux d'émergence indiqués sont issus de la littérature publiée et ne sont fournis qu'à titre d'indication générale. L'expérience individuelle peut varier en fonction de la source de semence et d'autres facteurs.

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie ⁽¹⁾ et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance ⁽²⁾	Profondeur du semis (mm) ⁽³⁾	Durée de germination (jours) ⁽⁴⁾	Traitements spéciaux ⁽⁵⁾	Essai de toxicité ⁽⁶⁾	Distributeurs de semences ⁽⁷⁾	Autres références ⁽⁸⁾
APIACEAE <i>Torilis japonica</i> (Torillis du Japon)	A, B zones perturbées, haies, pâturages (16, 19)	1,7 – 1,9 (14, 19).	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19).	stratification froide (7, 14, 18, 19) une maturation peut être nécessaire (19) germination inhibée par l'obscurité (1, 19) aucun traitement particulier (5)	POST (5)		
ASTERACEAE <i>Bellis perennis</i> (Pâquerette vivace)	P prairie, terres arables, gazon (16, 19)	0,09 – 0,17 (4, 19).	L = D (14)	0 4)	3 (50 %) (19). 11 (100 %) (18).	germination non affectée par une irradiation (18, 19) aucun traitement particulier (4, 14)	POST (4)	A, D, F	7
<i>Centaurea cyanus</i> (Bleuet des champs)	A champs, bords de routes, habitats ouverts (16)	4,1 – 4,9 (4, 14).	L = D (14)	0 — 3 (2, 4, 14).	14-21 (100 %) (14)	aucun traitement particulier (2,4)	POST (2,4)	A, D, E, F	7
<i>Centaurea nigra</i> (Centaurée noire)	P champs, bords de routes, habitats ouverts (16, 19)	2,4 – 2,6 (14, 19).	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19). 4 (97 %) (18).	une maturation peut être nécessaire (18, 19) germination inhibée par l'obscurité (19) aucun traitement particulier (5, 14, 26)	POST (5, 22, 26)	A	
<i>Inula helenium</i> (Inule aulnée)	P sites humides, perturbés 16)	1 – 1,3 (14, 14, 19).		0 (4, 29)		aucun traitement particulier (4)	POST (4)	A, F	

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie ⁽¹⁾ et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance ⁽²⁾	Profondeur du semis (mm) ⁽³⁾	Durée de germination (jours) ⁽⁴⁾	Traitements spéciaux ⁽⁵⁾	Essai de toxicité ⁽⁶⁾	Distributeurs de semences ⁽⁷⁾	Autres références ⁽⁸⁾
<i>Leontodon hispidus</i> (Liondent hérissé)	P champs, bords de routes, zones perturbées (16, 19)	0,85 – 1,2 (14, 19).	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19). 7 (80 %) (18).	germination inhibée par l'obscurité (17, 18, 19) aucun traitement particulier (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
<i>Rudbeckia hirta</i> (Rudbeckie hérissée)	B, P perturbé (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	aucun traitement particulier (4, 14, 33)	POST (4, 33)	C, D, E, F	
<i>Solidago canadensis</i> (Solidage du Canada)	P pâturages, zones ouvertes (16)	0,06 – 0,08 (4, 14).	L = D (11)	0 (4)	14-21 11)	mélanger avec une quantité égale de sable et tremper dans du GA 500 ppm pendant 24 h (11) aucun traitement particulier (4)	POST (4)	E, F	
<i>Xanthium pensylvanicum</i>	A champs, habitats ouverts (16)	25 – 61 (14, 29)		0(1) 5(29)		la germination peut être inhibée par l'obscurité (1) tremper dans l'eau tiède pendant 12 heures (29)	PRE & POST (31)	A	
<i>Xanthium spinosum</i> (Lampourde épineuse)	A habitats ouverts (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		scarification (14) aucun traitement particulier (6)	PRE & POST (6)	A	
<i>Xanthium strumarium</i> (Violette des champs)	A champs, habitats ouverts (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10 - 20 (6, 21)		aucun traitement particulier (6, 14, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A	

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie ⁽¹⁾ et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance ⁽²⁾	Profondeur du semis (mm) ⁽³⁾	Durée de germination (jours) ⁽⁴⁾	Traitements spéciaux ⁽⁵⁾	Essai de toxicité ⁽⁶⁾	Distributeurs de semences ⁽⁷⁾	Autres références ⁽⁸⁾
BRASSICACEAE <i>Cardamine pratensis</i> (Cardamine des prés)	P champs, bords de routes, gazon (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19). 15 (98 %) (18).	germination inhibée par l'obscurité (18, 19) aucun traitement particulier (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
CARYOPHYLLACEAE <i>Lychnis flos-cuculi</i> (Lychnis fleur de coucou)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	une maturation peut être nécessaire (18) aucun traitement particulier (5, 14, 15, 22-26)	POST (5, 15, 22-26)	F	
CHENOPODIACEAE <i>Chenopodium album</i> (Chénopode blanc)	A bordures de champs, zones perturbées (16, 19)	0,7 – 1,5 (14, 19, 34).	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19).	le traitement diffère en fonction de la couleur de la graine (19) dormance en stockage à sec (19) germination inhibée par l'obscurité (1, 18, 19) stratification froide (18) aucun traitement particulier (14, 34)	PRE & POST (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE <i>Hypericum perforatum</i> (Millepertuis perforé)	P champs, terres arables, habitats ouverts (16, 19)	0,1 – 0,23 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18).	germination inhibée par l'obscurité (1, 18, 19) aucun traitement particulier (5, 14, 15, 25, 27)	POST (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE <i>Ipomoea hederacea</i> (Etoile du matin)	A bords de routes, habitats ouverts, champs de maïs (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	germination non affectée par une irradiation (1) aucun traitement particulier (6, 21)	PRE & POST (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE <i>Cyperus rotundus</i> (Souchet rond)	P terres arables, pâturages, bords de routes (16, 30)	0,2 (14)	L = D (14)	0 (1) 10 - 20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	germination inhibée par l'obscurité (1) aucun traitement particulier (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 28, 31)	B	7

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie ⁽¹⁾ et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance ⁽²⁾	Profondeur du semis (mm) ⁽³⁾	Durée de germination (jours) ⁽⁴⁾	Traitements spéciaux ⁽⁵⁾	Essai de toxicité ⁽⁶⁾	Distributeurs de semences ⁽⁷⁾	Autres références ⁽⁸⁾
FABACEAE <i>Lotus corniculatus</i> (Lotie corniculé)	P zones herbeuses, bords de routes, habitats ouverts (16, 19)	1-1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	scarification (14, 19) germination non affectée par une irradiation (18, 19) aucun traitement particulier (23, 25)	POST (5, 23, 25)	A, D, E, F	
<i>Senna obtusifolia</i> (Casse fétide)	A bois humide (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6,9)		tremper les graines humides dans l'eau pendant 24 heures (9) scarification (14) la viabilité des graines dépend de leur couleur (1) aucun traitement particulier (6)	POST (6,9)	A	
<i>Sesbania exaltata</i> (Chanvre)	A sol alluvial (16)	11 – 13 (9, 14)	L > D (9)	10-20 (9, 21)		tremper les graines humides dans l'eau pendant 24 heures (9) germination non affectée par une irradiation (1) aucun traitement particulier (21)	PRE & POST (9, 21, 28, 31)	A	
<i>Trifolium pratense</i> (Trèfle des prés)	P champs, bords de routes, terres arables (16, 19)	1,4 – 1,7 (14, 19)	L= D (14)		1 (50 %) (19)	scarification (14, 18) peut requérir une maturation (19) germination non affectée par une irradiation (1, 19) aucun traitement particulier (5)	POST (5)	A, E, F	
LAMIACEAE <i>Leonurus cardiaca</i> (Agripaume)	P zones ouvertes (16)	0,75 – 1,0 (4, 14)	L= D (14)	0 (4)		aucun traitement particulier (4, 14)	POST (4)	F	
<i>Mentha spicata</i> (Menthe verte)	P zones humides (16)	2,21 (4)		0 (4)		aucun traitement particulier (4)	POST (4)	F	

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie ⁽¹⁾ et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance ⁽²⁾	Profondeur du semis (mm) ⁽³⁾	Durée de germination (jours) ⁽⁴⁾	Traitements spéciaux ⁽⁵⁾	Essai de toxicité ⁽⁶⁾	Distributeurs de semences ⁽⁷⁾	Autres références ⁽⁸⁾
<i>Nepeta cataria</i> (Herbe à chats)	P zones perturbées (16)	0,54 (4, 14)	L= D (14)	0 (4)		aucun traitement particulier (2, 4, 14)	POST (2,4)	F	
<i>Prunella vulgaris</i> (Brunelle commune)	P terres arables, zones herbeuses, sites perturbés (16, 19)	0,58 – 1,2. (4, 14, 19)	L= D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19). 7 (91 %) (18).	germination inhibée par l'obscurité (18, 19) meilleure germination avec les grosses graines (1) aucun traitement particulier (4, 14, 22)	POST (4, 22)	A, F	
<i>Stachys officinalis</i> (Epiaire officinale)	P prairies, bordures de champs (19)	14-18 (14, 19)	L= D (14)		7 (50 %) (19)	aucun traitement particulier (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
MALVACEAE <i>Abutilón theophrasti</i> (Abutilón)	A champs, habitats ouverts (16)	8,8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	scarification (14) aucun traitement particulier (5, 10, 21)	PRE & POST (6, 22, 28, 31)	A, F	
<i>Sida spinosa</i> (Sida épineux)	A champs, bords de route (16)	3,8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 21)		scarification (14) germination non affectée par une irradiation (1) aucun traitement particulier (6,21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE <i>Papaver rhoeas</i> (Grand coquelicot)	A champs, terres arables, sites perturbés (16, 19)	0,1 – 0,3 (4, 14, 19, 29)	L= D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	stratification froide et scarification (1, 19, 32) aucun traitement particulier (4, 14, 29)	POST (4)	A, D, E, F, G	

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie ⁽¹⁾ et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance ⁽²⁾	Profondeur du semis (mm) ⁽³⁾	Durée de germination (jours) ⁽⁴⁾	Traitements spéciaux ⁽⁵⁾	Essai de toxicité ⁽⁶⁾	Distributeurs de semences ⁽⁷⁾	Autres références ⁽⁸⁾
POACEAE <i>Agrostis tenuis</i> (Agrostide vulgaire)	pelouses, pâturages (16)	0,07 (14)	L > D (10)	20 (10)	10 (62 %) (10).	germination inhibée par l'obscurité (1, 17-19) aucun traitement particulier (10)	POST (10)	A, E	
<i>Alopecurus myosuroides</i> (Vulpin agreste)	A champs, habitats ouverts (16)	0,9-1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	scarification (14) traiter avec 101 mg/l de KNO ₃ (14) stratification chaude (1) germination inhibée par l'obscurité (1) aucun traitement particulier (34)	PRE & POST (28, 34)	A	32
<i>Avena fatua</i> (Avoine folle)	A zones cultivées, habitats ouverts (16)	7 – 37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10 — 20 (6, 10)	3 (70 %) (18).	scarification (7, 32) germination inhibée par l'obscurité (1) stratification froide (1,18) aucun traitement particulier (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 10, 28, 31)	A	
<i>Bromus tectorum</i> (Brome des toits)	A champs, bords de routes, terres arables (16)	0,45 – 2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		période de maturation (1, 7, 32) germination inhibée par la lumière (1) aucun traitement particulier (14)	PRE & POST (28, 31)	A	
<i>Cynosurus cristatus</i> (Crételle)	P champs, bords de routes, habitats ouverts (16, 19)	0,5 – 0,7 (14, 19, 29).	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19).	germination non affectée par une irradiation (19) aucun traitement particulier (14, 29)	POST (5)	A	

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie ⁽¹⁾ et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance ⁽²⁾	Profondeur du semis (mm) ⁽³⁾	Durée de germination (jours) ⁽⁴⁾	Traitements spéciaux ⁽⁵⁾	Essai de toxicité ⁽⁶⁾	Distributeurs de semences ⁽⁷⁾	Autres références ⁽⁸⁾
<i>Digitaria sanguinalis</i> (Digitaire sanguine)	A champs, gazon, habitats ouverts (16)	0,52 – 0,6 (14,30)	L = D (14)	10 - 20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7).	scarification, stratification froide & maturation (1, 7, 14, 32) traiter avec 101 mg/l de KNO ₃ (14) germination inhibée par l'obscurité (1) aucun traitement particulier (21)	PRE & POST (18, 25, 31)	A	
<i>Echinochloa crusgalli</i> (panic pied-de-coq)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10 - 20 (7, 21)		scarification (7, 32) germination non affectée par une irradiation (1) aucun traitement particulier (3, 14, 21)	PRE & POST (3, 21, 28, 31)	A	
<i>Elymus canadensis</i> (Elyme du Canada)	P riverain, sites perturbés (16)	4-5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14-28 (11)	aucun traitement particulier (2, 11)	POST (2)	C, D, E	
<i>Festuca pratensis</i> (Fétuque des prés)	P champs, zones humides (16, 19)	1,53-2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10). 2 (50 %) (19).	aucun traitement particulier (10, 19)	POST (10)	A	7
<i>Hordeum pusillum</i> (Orge naine)	A pâturages, bords de routes, habitats ouverts (16)	3,28 (14)				stratification chaude (1) germination non affectée par une irradiation (1)	PRE (31)		7
<i>Phleum pratense</i> (Fléole des prés)	P pâturages, terres arables, sites perturbés (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10). 8 (50 %) (19).	germination inhibée par l'obscurité (19) germination non affectée par une irradiation (17) aucun traitement particulier (10, 14, 17, 19)	POST (10)	A, E	

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie ⁽¹⁾ et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance ⁽²⁾	Profondeur du semis (mm) ⁽³⁾	Durée de germination (jours) ⁽⁴⁾	Traitements spéciaux ⁽⁵⁾	Essai de toxicité ⁽⁶⁾	Distributeurs de semences ⁽⁷⁾	Autres références ⁽⁸⁾
POLYGONACEAE <i>Polygonum convolvulus</i> (Renouée faux-liseron)	A habitats ouverts, bords de routes (16)	5 – 8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		stratification froide pendant 4- 8 semaines (1, 2, 4, 20, 29) germination non affectée par une irradiation (1)	PRE & POST 1, 2, 20, 28, 31	A	32
<i>Polygonum lapathifolium</i> (Renouée à feuille de patience)	A sol humide (16)	1,8 – 2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18).	germination non affectée par une irradiation (1) germination inhibée par l'obscurité (18) stratification froide (1) aucun traitement particulier (5)	PRE & POST (6)	A, E	
<i>Polygonum pennsylvanicum</i> (Renouée de Pennsylvanie)	A champs, habitats ouverts (16)	3,6 – 7 (14, 29)		2 (29)		stratification froide pendant 4 semaines à 0 - 5 °C (1, 29) germination inhibée par l'obscurité (1)	PRE (31)	A, E	
<i>Polygonum periscaria</i> (Renouée persicaire)	A zones perturbées, terres arables (16, 19)	2,1 – 2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	14 (13) 2 (50 %) (19).	scarification, stratification froide, traitement au GA (14) stratification froide, maturation (17 - 19) germination inhibée par l'obscurité (19) aucun traitement particulier (13)	POST (13)	A	32
<i>Rumex crispus</i> (Patience crépue)	P terres arables, bords de routes, zones ouvertes (16, 19)	1,3 – 1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19). 6 (100 %) (33).	germination inhibée par une irradiation (18, 19) une maturation peut être requise (18) aucun traitement particulier (4, 14, 33)	POST (4, 33)	A, E	32

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie ⁽¹⁾ et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance ⁽²⁾	Profondeur du semis (mm) ⁽³⁾	Durée de germination (jours) ⁽⁴⁾	Traitements spéciaux ⁽⁵⁾	Essai de toxicité ⁽⁶⁾	Distributeurs de semences ⁽⁷⁾	Autres références ⁽⁸⁾
PRIMULACEAE <i>Anagallis arvensis</i> (Mourron rouge)	A terres arables, zones ouvertes, sites perturbés (16, 19)	0,4 – 0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19).	stratification froide, traitement au G A (1, 14, 18, 19, 32) lumière requise pour la germination (1) aucun traitement particulier (2, 4)	POST (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE <i>Ranunculus acris</i> (Renoncule acre)	P terres arables, bords de routes, zones ouvertes (16, 19)	1,5 – 2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41 - 56 (19, 29)	aucun traitement particulier (5, 14, 22, 24 - 26)	POST (5, 22, 24-26)		32
ROSACEAE <i>Geum urbanum</i> (Benoîte commune)	P bordures de haies, zones humides (16, 19)	0,8 – 1,5 (14, 19).	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19). 16 (79 %) (18).	germination inhibée par l'obscurité (18, 19) stratification à chaude (1) aucun traitement particulier (5, 14, 22, 25, 26)	POST (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE <i>Galium aparine</i> (Gaillet gratteron)	A terres arables, zones humides, sites perturbés (16, 19)	7-9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19). 6 (100 %) (18).	stratification froide (1, 18, 19) germination non affectée par une irradiation (18, 19) la lumière inhibe la germination (1) aucun traitement particulier (6, 14)	PRE & POST (6, 28)	A	32
<i>Galium mollugo</i> (Caille-lait blanc)	P haies sur talus, zones ouvertes (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		aucun traitement particulier (5, 14, 22, 24, 26, 29)	POST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE <i>Digitalis purpurea</i> (Digitale pourpre)	B, P haies, zones ouvertes (16, 19)	0,1 – 0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19). 8 (99 %) (18).	germination inhibée par l'obscurité (1,17-19) aucun traitement particulier (4, 22-26)	POST (4, 22 - 26)	D, G, F	

FAMILLE Nom botanique de l'espèce (Nom commun français)	Durée de vie ⁽¹⁾ et habitat	Poids des graines (mg)	Photopériode pour la germination ou la croissance ⁽²⁾	Profondeur du semis (mm) ⁽³⁾	Durée de germination (jours) ⁽⁴⁾	Traitements spéciaux ⁽⁵⁾	Essai de toxicité ⁽⁶⁾	Distributeurs de semences ⁽⁷⁾	Autres références ⁽⁸⁾
<i>Veronica persica</i> (Véronique de Perse)	A terres arables, zones ouvertes, sites perturbés (16, 19)	0,5-0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18).	germination inhibée par l'obscurité (18, 19) stratification froide (18) aucun traitement particulier (14)	PRE & POST (28)	A	32

⁽¹⁾ A = annuelles, B = bisannuelles, P = pérennes

⁽²⁾ Les références 11, 14 et 33 concernent la proportion de lumière (L) et d'obscurité (D) requise pour induire la germination des graines. Les références 3, 6, 9, 10, 13, 20 concernent les conditions de croissance en serre.

⁽³⁾ 0 mm indique que les graines sont semées sur la surface du sol ou que les graines ont besoin de lumière pour germer.

⁽⁴⁾ Les nombres indiqués correspondent au nombre de jours pendant lesquels germe un certain pourcentage de graines selon la référence indiquée, par exemple, germination 3 jours (50 %) (référence 19).

⁽⁵⁾ La durée de maturation et/ou les données sur la stratification ne sont pas toujours disponibles. Sauf dans les cas où un traitement à froid est nécessaire, les conditions de température ne sont pas spécifiées, car dans les essais en serre, le contrôle de la température est limité. La plupart des graines germent dans des conditions de fluctuations de températures normales observées en serre.

⁽⁶⁾ indique qu'une espèce a été utilisée dans un essai de toxicité sur plantes pré-émergence (PRE) et/ou post-émergence (POST) impliquant des herbicides.

⁽⁷⁾ Donne des exemples de distributeurs de semences du commerce.

⁽⁸⁾ Fournit d'autres références qui ont été consultées

Distributeurs de semences cités

ID Fournisseur	Coordonnées Fournisseur
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ENGLAND +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 USA (727) 344 - 4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla — Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 CANADA (519) 586 - 3985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 USA (303) 431 - 7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 USA (800) 873 - 3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB ENGLAND +44 1229 581137 www.chilternseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 CANADA (800) 274 - 7333 www.thompson-morgan.com

RÉFÉRENCES CITÉES

- (1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto
- (2) Blackburn, L.G. & Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). *Ecotoxicology*, 12:271-285.
- (3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 19(10):2532-2541.
- (4) Boutin, C., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. *Ecotoxicology*, 13:349-369.
- (5) Breeze, V., Thomas, G., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. *Annals of Applied Biology*, 121:669-677.
- (6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: *Plants for toxicity assessment: 2nd volume*. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W. Wang, & M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. pp 197 — 208.

- (7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.
- (8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge
- (9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. *Weed Science*, 48:481-486.
- (10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. *BCPC — Weeds*. pp. 151 — 156.
- (11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. (www.ernstseed.com)
- (12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 9:769-776.
- (13) Fletcher, J.S., Pflieger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 15(7):1189-1196.
- (14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgekew.org.uk/data/sid)
- (15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. *Environmental Pollution*, 114:21-28.
- (16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY
- (17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. *Annals of Applied Biology*, 98:555-558.
- (18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. *Journal of Ecology*, 69:1017-1059.
- (19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London
- (20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (*Polygonum convolvulus* L.). *Weed Research*, 34:453-459.
- (21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. *Weed Science*, 40:227-232.
- (22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. *Environmental Pollution*, 59:71-86.
- (23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. *Environmental Pollution*, 69:223-235.
- (24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. *Environmental Pollution*, 73:25-42.
- (25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. *Agriculture, Ecosystems, & Environment*, 45:283-293.

- (26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. *Journal of Environmental Management*, 50:369-388.
 - (27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. *BCPC — Weeds*. pp. 1021-1028.
 - (28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. *Pest Management Science*, 58:1161-1174.
 - (29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (<http://www.herbiseed.com>)
 - (30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (<http://plants.usda.gov>). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA
 - (31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].
 - (32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.
 - (33) White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Personal communication.
 - (34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. *Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh.*, 17:711-718.
-

Appendice 4

Exemple de conditions de croissance appropriées à certaines espèces cultivées

Les conditions suivantes se sont révélées satisfaisantes pour 10 espèces cultivées et on peut donc s'en inspirer pour les essais en chambre de culture avec certaines autres espèces:

Concentration de dioxyde de carbone: 350 ± 50 ppm;

Humidité relative: 70 ± 5 % pendant les périodes d'éclairement et 90 ± 5 % pendant les périodes d'obscurité;

Température: 25 ± 3 °C pendant la journée, 20 ± 3 °C pendant la nuit;

Photopériode: 16 heures de lumière/8 heures d'obscurité, en supposant une longueur d'onde moyenne de 400 à 700 nm;

Lumière: luminance de 350 ± 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, mesurée au-dessus du feuillage.

Les espèces végétales sont les suivantes:

- tomate (*Solanum lycopersicon*),
 - concombre (*Cucumis sativus*),
 - laitue (*Lactuca sativa*),
 - soja (*Glycine max*),
 - chou (*Brassica oleracea* var. *capitata*),
 - carotte (*Daucus carota*),
 - avoine (*Avena sativa*),
 - raygras pérenne (*Lolium perenne*),
 - maïs (*Zea mays*),
 - oignon (*Allium cepa*).
-

C.32. ESSAI DE REPRODUCTION CHEZ L'ENCHYTRÉE**INTRODUCTION**

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 220 (2004) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle est destinée à évaluer les effets des substances chimiques sur la reproduction d'un ver enchytrée, *Enchytraeus albidus*, Henle 1873, dans le sol. Elle repose pour l'essentiel sur une méthode développée par l'Umweltbundesamt (Allemagne) (1) qui a été soumise à un essai tournant (2). D'autres méthodes d'évaluation de la toxicité des substances chimiques sur les enchytrées et les lombrics ont aussi été prises en considération (3)(4)(5)(6)(7)(8).

CONSIDÉRATIONS INITIALES

2. Les annélides pédocoques du genre *Enchytraeus* sont des espèces écologiquement pertinentes pour les essais d'écotoxicité. Bien que fréquents dans les sols à lombrics, les enchytrées colonisent souvent en abondance de nombreux sols qui n'abritent pas de lombrics. Les enchytrées se prêtent à des essais en laboratoire, ainsi qu'à des essais sur le terrain et en partie sur le terrain. Sur le plan pratique, de nombreuses espèces d'*Enchytraeus* sont faciles à manipuler et à élever et leur génération est nettement plus courte que celle des lombrics. Aussi la durée d'un essai de reproduction chez l'enchytrée n'est-elle que de 4 à 6 semaines, contre 8 semaines chez les lombrics (*Eisenia fetida*).
3. Des notions de base sur l'écologie et l'écotoxicologie des enchytrées en milieu terrestre sont fournies par les références (9)(10)(11)(12).

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. Les enchytrées adultes sont exposés à une gamme de concentrations de la substance chimique d'essai mélangée à un sol artificiel. Cet essai peut être divisé en deux étapes: a) un essai de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations, si des informations manquent, où la mortalité constitue le principal résultat évalué après deux semaines d'exposition et b) l'essai de reproduction proprement dit dans lequel on évalue le nombre total de vers juvéniles produits par animal parent et la survie des animaux parents. L'essai proprement dit dure six semaines. À la fin des trois premières semaines, on enlève les vers adultes et on note leurs changements morphologiques. Au terme des trois semaines suivantes, le nombre de descendants éclos des cocons engendrés par les adultes est compté. On compare le taux de reproduction des animaux exposés à la substance chimique d'essai à celui du(des) témoin(s), afin de déterminer i) la concentration sans effet observé (CSEO) et/ou ii) la CE_x (par exemple CE_{10} , CE_{50}), à l'aide d'un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x % du taux de reproduction. Les concentrations expérimentales doivent couvrir la CE_x (par exemple CE_{10} , CE_{50}), de façon à ce que la CE_x soit interpolée plutôt qu'extrapolée.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

5. Il est préférable de connaître l'hydrosolubilité, le $\log K_{oc}$, le coefficient de partage entre l'eau et le sol (chapitre C.18 ou C.19 de la présente annexe, par exemple) et la pression de vapeur de la substance chimique d'essai. Des informations supplémentaires sur le devenir de la substance chimique d'essai dans le sol, notamment sa vitesse de photolyse et d'hydrolyse, seraient souhaitables.
6. La présente méthode d'essai convient à l'essai de substances chimiques hydrosolubles ou insolubles; néanmoins, le mode d'application de la substance d'essai variera en conséquence. Cette méthode d'essai ne s'applique pas aux substances volatiles, à savoir les substances dont la constante de Henry ou le coefficient de partage air/eau sont supérieurs à un, ou les substances dont la pression de vapeur dépasse 0,0133 Pa à 25 °C.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

7. Pour que l'essai soit valide, les témoins doivent satisfaire aux critères suivants:
 - la mortalité des adultes n'excédera pas 20 % à la fin de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations et à la fin des trois premières semaines de l'essai de reproduction.
 - si dix adultes ont été déposés dans chaque récipient au début de l'essai, on doit retrouver en moyenne au moins 25 vers juvéniles par récipient à la fin de l'essai.
 - le coefficient de variation autour du nombre moyen de vers juvéniles ne doit pas dépasser 50 % à la fin de l'essai de reproduction.

Un essai qui ne remplirait pas les critères de validité susmentionnés doit être arrêté, à moins que la poursuite de l'essai puisse être justifiée. Cette justification doit figurer dans le rapport d'essai.

SUBSTANCE CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

8. Afin de vérifier que la réaction des organismes d'expérience ne change pas de façon significative au cours du temps, une substance chimique de référence sera soit testée à intervalles réguliers, soit incluse dans chaque essai. La carbendazime, qui affecte la survie et la reproduction des enchytrées (13)(14), est une substance de référence appropriée, tout comme d'autres produits chimiques dont la toxicité est bien connue. Le DerosalTM, fourni par AgrEvo (Francfort, Allemagne), est un produit renfermant de la carbendazime à raison de 360 g/l (32,18 %) d'ingrédient actif, qui a été utilisé dans un essai tournant (2). La CE_{50} pour la reproduction déterminée au cours de l'essai tournant s'élevait à $1,2 \pm 0,8$ mg d'ingrédient actif/kg de masse sèche (2). Si un étalon toxique positif est inclus dans la série d'essais, on n'applique qu'une seule concentration et un nombre d'expériences identiques égal à celui des témoins. En ce qui concerne la carbendazime, on recommande l'essai de 1,2 mg d'ingrédient actif/kg de poids sec (testé sous forme liquide).

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Matériel

9. Les récipients expérimentaux doivent être composés de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte. On utilisera des bocaux en verre (volume: 0,20 - 0,25 litre; diamètre ± 6 cm, par exemple) munis de couvercles transparents (en verre ou en polyéthylène, par exemple) afin de réduire l'évaporation de l'eau, tout en autorisant les échanges gazeux entre le sol et l'atmosphère. Les couvercles doivent être transparents pour laisser passer la lumière.
10. Cet essai requiert du matériel de laboratoire courant et en particulier:
 - armoire à séchage;
 - stéréomicroscope;
 - pH-mètre et photomètre
 - balances suffisamment précises;
 - instruments appropriés permettant de réguler la température;
 - instruments appropriés permettant de réguler l'humidité (pas essentiel si les récipients expérimentaux ont des couvercles);
 - incubateur ou petite chambre équipée d'un conditionnement de l'air;
 - pinces, crochets ou anses;
 - cuve de développement photographique

Préparation du sol artificiel

11. Dans cet essai, on utilise un sol artificiel (5)(7) composé comme suit (en poids secs, séchés à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant):
 - 10 % de tourbe à sphaigne, séchée à l'air et finement broyée (une dimension des particules de 2 ± 1 mm est acceptable); il est recommandé de vérifier qu'un sol préparé avec un lot frais de tourbe convient à la culture des vers, avant de l'utiliser dans un essai;
 - 20 % d'argile kaolinique (taux de kaolinite de préférence supérieur à 30 %);

- environ 0,3 à 1,0 % de carbonate de calcium (CaCO_3 , pulvérisé, de qualité pour analyse) pour obtenir un pH de $6,0 \pm 0,5$; la quantité de carbonate de calcium à ajouter peut dépendre principalement de la qualité/nature de la tourbe;
- environ 70 % de sable quartzique (selon la quantité de CaCO_3 nécessaire) séché à l'air, composé en majorité de sable fin (plus de 50 % des particules mesurant entre 50 et 200 μm).

Avant d'utiliser le sol artificiel dans l'essai proprement dit, il est conseillé de démontrer que ce sol convient à la culture des vers et qu'il permet de répondre aux critères de validité de l'essai. Cette précaution vise en particulier à vérifier que le bon fonctionnement de l'essai ne sera pas compromis si la teneur en carbone organique du sol artificiel est réduite, par exemple si le pourcentage de tourbe est ramené à 4-5 % et que le taux de sable est augmenté en conséquence. Cette réduction de la teneur en carbone organique est susceptible de diminuer les possibilités d'adsorption de la substance chimique d'essai sur le sol (carbone organique) et d'augmenter la disponibilité de la substance d'essai pour les vers. Il a été démontré qu'*Enchytraeus albidus* peut satisfaire aux critères de validité concernant la reproduction lorsqu'il est testé sur le terrain sur des sols dont la teneur en carbone organique est inférieure à celle mentionnée ci-dessus (2,7 %, par exemple) (15), et on a constaté (bien que l'expérience en la matière soit limitée) que ce ver peut aussi satisfaire aux critères de validité lorsqu'il est mis à l'essai sur un sol artificiel renfermant 5 % de tourbe.

Remarque: Lorsqu'on utilise un sol naturel dans un essai supplémentaire (réalisé à un niveau supérieur dans le cadre d'essais séquentiels, par exemple), l'adéquation du sol à la culture des vers et au respect des critères de validité doit aussi être démontrée.

12. Les ingrédients secs du sol sont mélangés complètement (par exemple, dans un grand mélangeur de laboratoire), et ce au moins une semaine avant le début de l'essai. Le sol mélangé doit être entreposé durant deux jours pour que l'acidité s'équilibre/se stabilise. Pour déterminer le pH, on mélange le sol avec une solution 1 M de chlorure de potassium (KCl) ou 0,01 M de chlorure de calcium (CaCl_2) dans des proportions de 1/5 [voir (16) et Appendice 3]. Si l'acidité du sol dépasse les valeurs incluses dans la gamme requise (voir paragraphe 11), elle peut être ajustée par l'addition d'une quantité appropriée de CaCO_3 . Si le sol est trop alcalin, il peut être rééquilibré par l'ajout d'un mélange comprenant les ingrédients cités au paragraphe 11, à l'exclusion du CaCO_3 .
13. La capacité maximale de rétention d'eau du sol artificiel est déterminée conformément aux procédures décrites à l'Appendice 2. Un ou deux jours avant le début de l'essai, le sol artificiel sec est préhumidifié par l'ajout d'une quantité suffisante d'eau désionisée pour atteindre environ la moitié de sa teneur en eau finale, à savoir 40 à 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau. Au début de l'essai, le sol préhumidifié est divisé en autant de portions que de concentrations expérimentales, témoins et substance chimique de référence utilisés dans l'essai. La teneur en humidité est ajustée à 40-60 % de la capacité maximale de rétention d'eau par l'addition de la solution contenant la substance d'essai et/ou d'eau distillée ou désionisée (voir paragraphes 19-21). La teneur en humidité est déterminée au début et à la fin de l'essai (par séchage à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant) et doit se situer dans la gamme optimale pour la survie des vers. Il est possible d'estimer en gros le taux d'humidité du sol en pressant doucement une poignée de sol dans une main: si le taux d'humidité est correct, de petites gouttes d'eau apparaissent entre les doigts.

Sélection et préparation des animaux d'essai

14. L'espèce recommandée dans cet essai est *Enchytraeus albidus*, Henle 1837 (ver blanc), de la famille des *Enchytraeidae* (ordre des *Oligochaeta*, phylum des *annélides*). *E. albidus* est l'un des plus grands représentants des enchytrées, des spécimens mesurant jusqu'à 35 mm de long ayant été recensés (17)(18). Espèce à répartition mondiale, *E. albidus* colonise des habitats marins, dulcicoles et terrestres, constitués la plupart du temps de matière organique en décomposition (algues, compost), et fréquente rarement les prairies (9). Le fait qu'il tolère une gamme étendue de conditions écologiques et certaines variations morphologiques indiquent qu'il pourrait exister différentes races.
15. *E. albidus* est vendu dans le commerce, comme nourriture pour les poissons. Il y a lieu de vérifier si la culture est contaminée par d'autres espèces, généralement plus petites (1)(19). Dans l'affirmative, tous les vers doivent être lavés à l'eau dans une boîte de Petri. On sélectionne ensuite les grands spécimens adultes d'*E. albidus* (au moyen d'un stéréomicroscope), afin de lancer une nouvelle culture et on jette tous les autres vers. *E. albidus* s'élève facilement sur des matières organiques très diverses (voir Appendice 4). Le cycle de vie d'*E. albidus* est court: il met entre 33 jours (à 18 °C) et 74 jours (à 12 °C) à atteindre sa maturité (1). Seules les cultures qui auront pu être maintenues en laboratoire durant au moins cinq semaines (1 génération) sans poser de problème seront utilisées dans l'essai.

16. D'autres espèces du genre *Enchytraeus* conviennent également, par exemple *E. buchholzi*, Vejdovsky 1879, ou *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 (voir Appendice 5). Si on utilise d'autres espèces d' *Enchytraeus*, il faut les identifier clairement et justifier ce choix dans le rapport.
17. Les animaux utilisés dans les essais sont des vers adultes. Il doivent porter des oeufs (points blancs) dans la région du clitellum et mesurer à peu près la même taille (environ 1 cm de long). La synchronisation de la culture d'élevage n'est pas nécessaire.
18. Si les enchytrées ne sont pas élevés sur un type de sol et dans des conditions (y compris alimentaires) identiques à celles de l'essai final, ils doivent passer par une période d'acclimatation comprise entre 24 heures et 3 jours. Il convient d'acclimater au départ un plus grand nombre d'adultes que ne le requiert l'essai, afin de pouvoir rejeter les individus blessés ou inutilisables pour une autre raison. Au terme de la période d'acclimatation, seuls les vers portant des oeufs et ne manifestant aucun comportement anormal (par exemple, essayant d'échapper du sol) sont sélectionnés pour l'essai. Les vers sont prélevés soigneusement à l'aide d'une pince de bijoutier, de crochets ou d'anses et placés dans une boîte de Petri contenant une petite quantité d'eau douce. À cet effet, il est préférable d'utiliser une eau douce reconstituée, telle que décrite au chapitre C.20 de la présente annexe (*Daphnia magna*, Essai de reproduction, l'eau désionisée, déminéralisée ou du robinet risquant d'être néfaste aux vers. Les vers sont examinés au stéréomicroscope et tous ceux qui ne portent pas d'oeufs sont éliminés. On veillera à éliminer toutes les mites ou les collemboles qui auraient pu infecter les cultures. Les vers sains qui ne serviront pas à l'essai sont remis dans la culture mère.

Préparation des concentrations expérimentales

Substance chimique d'essai hydrosoluble

19. Une solution de la substance chimique d'essai dans de l'eau désionisée est préparée en quantité suffisante pour toutes les expériences identiques d'une concentration expérimentale. Il est recommandé d'utiliser la quantité d'eau nécessaire pour obtenir le taux d'humidité requis, à savoir 40 à 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau (voir paragraphe 13). Chaque solution de la substance d'essai est mélangée complètement avec un lot du sol préhumidifié, avant d'être introduite dans le récipient expérimental.

Substance chimique d'essai non soluble dans l'eau

20. Les substances chimiques non solubles dans l'eau mais solubles dans des solvants organiques peuvent être dissoutes dans le plus petit volume possible d'un véhicule approprié (par exemple de l'acétone). Seuls des solvants volatils peuvent être utilisés. Le véhicule est pulvérisé sur, ou mélangé à, une petite quantité, 2,5 g par exemple, de sable quartzique fin. Ensuite, le véhicule est éliminé par évaporation sous une hotte durant au moins une heure. Ce mélange de sable quartzique et de la substance chimique d'essai est ajouté au sol préhumidifié, auquel il sera mélangé complètement après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est introduit dans les récipients expérimentaux.
21. Pour les substances chimiques peu solubles dans l'eau et les solvants organiques, on mélange l'équivalent de 2,5 g de sable quartzique finement broyé par récipient expérimental à la quantité nécessaire de la substance chimique d'essai pour obtenir la concentration expérimentale voulue. Ce mélange de sable quartzique et de la substance chimique d'essai est ajouté au sol préhumidifié, auquel il sera mélangé complètement après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est réparti entre les récipients expérimentaux. On répète la procédure pour chaque concentration expérimentale et on prépare un témoin approprié.
22. En principe, les substances ne devraient pas être mises à l'essai à des concentrations supérieures à 1 000 mg/kg de masse sèche de sol. Cependant, certains objectifs expérimentaux particuliers pourront exiger des concentrations supérieures.

CONDUITE DES ESSAIS

Groupe traité et témoins

23. Pour chaque concentration expérimentale, une quantité de sol d'essai correspondant à 20 g de poids sec est placée dans le récipient expérimental (voir paragraphes 19-21). On prépare également des récipients témoins sans substance chimique d'essai. La nourriture est introduite dans chaque récipient selon les procédures décrites

au paragraphe 29. Dix vers choisis au hasard sont assignés à chaque récipient expérimental. Les vers sont soigneusement transférés dans les récipients et déposés à la surface du sol à l'aide de pinces, de crochets ou d'anses, par exemple. Le nombre d'expériences identiques pour les concentrations expérimentales et les témoins dépend de la conception de l'essai (voir paragraphe 34). Les récipients expérimentaux sont placés au hasard dans l'incubateur et leurs emplacements sont modifiés au hasard chaque semaine.

24. Si la substance chimique d'essai est appliquée à l'aide d'un véhicule, une série de témoins contenant du sable quartzique sur lequel le solvant a été pulvérisé ou auquel le solvant a été mélangé devrait être mise à l'essai parallèlement à la série traitée avec la substance chimique d'essai. La concentration du solvant ou du dispersant devrait être identique à celle utilisée dans les récipients expérimentaux contenant la substance d'essai. Une série de témoins contenant un supplément de sable quartzique (2,5 g par récipient) devrait aussi être mise à l'essai pour les substances administrées conformément à la procédure décrite au paragraphe 21.

Conditions expérimentales

25. La température expérimentale est de 20 ± 2 °C. Pour dissuader les vers de s'échapper du sol, l'essai est mené sous des cycles réglés de lumière et d'obscurité (de préférence 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité), avec un éclairage de 400 à 800 lux dans la zone des récipients expérimentaux.
26. Pour vérifier l'humidité du sol, on pèse les récipients au début de l'essai, puis une fois par semaine. La perte de poids est compensée par l'ajout d'une quantité équivalente d'eau désionisée. Remarquons que la perte d'eau peut être réduite par le maintien d'un taux d'humidité de l'air élevé (> 80 %) dans l'incubateur.
27. Le taux d'humidité et le pH sont à mesurer au début et à la fin de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations et de l'essai proprement dit. Les mesures doivent être effectuées sur des échantillons de sol traités (à toutes les concentrations) et témoins, préparés et entretenus de la même manière que les cultures expérimentales, mais ne contenant pas de vers. La nourriture ne sera ajoutée à ces échantillons de sol qu'au début de l'essai, afin de faciliter l'activité microbienne, et ce dans des quantités identiques à celles administrées aux cultures expérimentales. Il n'est pas nécessaire d'ajouter plus de nourriture dans ces récipients au cours de l'essai.

Alimentation

28. On utilisera une nourriture à même de satisfaire aux besoins de la population d'enchytrées. Les flocons d'avoine, de préférence autoclavés avant l'emploi pour éviter une contamination microbienne (un traitement à la chaleur convient également) constituent une nourriture appropriée.
29. La première fois, on administre la nourriture en mélangeant 50 mg de flocons d'avoine moulus au sol de chaque récipient, avant d'y introduire les vers. Par la suite, la nourriture est dispensée une fois par semaine jusqu'au 21^{ème} jour. Aucune nourriture n'est fournie le 28^{ème} jour, car à cette date les adultes auront été enlevés et les vers juvéniles ne demandent désormais qu'un supplément relativement minime de nourriture. Au cours de l'essai, on introduit 25 mg de flocons d'avoine moulus dans chaque récipient, en les déposant soigneusement à la surface du sol de façon à éviter de blesser les vers. Pour réduire la croissance fongique, on enfouit les flocons d'avoine dans le sol en les recouvrant de petites quantités de sol. Si des restes de nourriture subsistent, on diminue la ration.

Conception de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations

30. Si nécessaire, un essai de détermination de l'ordre de grandeur sera mené avec, par exemple, cinq concentrations expérimentales: 0,1, 1,0, 10, 100 et 1 000 mg/kg (masse sèche de sol). Une expérience par concentration et par témoin suffit.
31. L'essai de détermination de l'ordre de grandeur dure deux semaines. À la fin de l'essai, on évalue la mortalité des vers. Un ver est consigné comme mort s'il ne réagit pas à un stimulus mécanique appliqué à l'extrémité antérieure. Outre le taux de mortalité, il pourrait être utile de disposer d'autres informations pour sélectionner la gamme de concentrations à appliquer dans l'essai proprement dit. Des modifications du comportement des adultes (par exemple, s'ils deviennent incapables de creuser le sol, s'ils restent prostrés contre la paroi en verre du récipient) et de leur morphologie (par exemple, des blessures ouvertes) devraient, par conséquent, aussi être notées, de même que la présence de vers juvéniles. Cette dernière peut être déterminée par la méthode de coloration décrite à l'Appendice 6.

32. La moyenne géométrique des données de la mortalité donne une idée approximative de la CL_{50} . On établit la gamme de concentrations pour l'essai proprement dit, en supposant que les effets sur la reproduction sont inférieurs à ceux de la CL_{50} d'un facteur pouvant aller jusqu'à 10. Il ne s'agit toutefois que d'une relation empirique, susceptible de ne pas se vérifier dans des cas particuliers. Les observations supplémentaires effectuées au cours de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur, telles que la présence de vers juvéniles, peuvent permettre d'ajuster plus finement la gamme de concentrations expérimentales à appliquer dans l'essai proprement dit.
33. Pour déterminer la CL_{50} avec précision, on recommande de conduire l'essai en y incluant au moins quatre expériences identiques par concentration expérimentale et un nombre suffisant de concentrations pour obtenir au moins quatre résultats moyens différents et statistiquement significatifs à ces concentrations. Le cas échéant, un nombre identique de concentrations et d'expériences identiques sera mis à l'essai pour les témoins.

Conception de l'essai de reproduction proprement dit

34. Trois conceptions, s'appuyant sur les recommandations émises à l'issue d'un essai tournant sont proposées (2):
- Pour déterminer la CSEO, tester au moins cinq concentrations formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques par concentration expérimentale et huit témoins. Les concentrations sont espacées d'un facteur n'excédant pas 1,8.
 - Pour déterminer la CE_x (CE_{10} , CE_{50} , par exemple), tester au moins cinq concentrations couvrant la CE_x , de façon à interpoler la CE_x au lieu de l'extrapoler. Il est recommandé d'inclure au moins quatre expériences identiques par concentration expérimentale et quatre témoins identiques. Le facteur d'espacement peut varier: il est inférieur ou égal à 1,8 dans la gamme censée produire un effet et supérieur à 1,8 aux concentrations supérieures et inférieures.
 - Une approche combinée permet de déterminer à la fois la CSEO et la CE_x . Pour ce faire, on utilise huit concentrations formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques par concentration et huit témoins. Les concentrations sont espacées d'un facteur n'excédant pas 1,8.
35. Chaque récipient expérimental contient dix vers adultes (voir paragraphe 23). La nourriture est déposée dans les récipients expérimentaux au début de l'essai, puis une fois par semaine (voir paragraphe 29) jusqu'au 21^{ème} jour inclus. Le 21^{ème} jour, on prélève soigneusement à la main les échantillons de sol, afin d'observer et de compter les vers adultes vivants et de recenser leurs éventuels changements de comportement (incapacité de creuser le sol, prostration contre la paroi en verre du récipient expérimental, par exemple) et de morphologie (blessures ouvertes, par exemple). Tous les vers adultes sont ensuite retirés des récipients expérimentaux et du sol d'essai. Le sol d'essai renfermant des cocons est incubé durant trois semaines supplémentaires dans les mêmes conditions expérimentales, à ceci près que la nourriture n'est administrée que le 35^{ème} jour (25 mg de flocons d'avoine moulus par récipient).
36. Après six semaines, les vers éclos sont comptés. On recommande d'appliquer la méthode de coloration au rouge de Bengale (voir Appendice 6), bien que d'autres techniques d'extraction et de flottation par voie humide (mais sans chauffage) (voir Appendice 6) aient également fait leurs preuves (4)(10)(11)(20). La coloration au rouge de Bengale est recommandée car l'extraction par voie humide à partir d'un sol peut être gênée par la turbidité causée par les particules d'argile en suspension.

Essai limite

37. Si la concentration la plus élevée (1 000 mg/kg) de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur n'engendre aucun effet, l'essai de reproduction peut être conduit comme un essai limite, à la dose de 1 000 mg/kg pour démontrer que la CSEO sur la reproduction est supérieure à cette valeur.

Résumé et calendrier de l'essai

38. Les étapes de l'essai peuvent se résumer comme suit:

Calendrier	Essai de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations	Essai proprement dit
Jour -7 ou précédents	— Préparer le sol artificiel (mélanger les ingrédients secs)	— Préparer le sol artificiel (mélanger les ingrédients secs)
Jour -5	— Vérifier le pH du sol artificiel — Mesurer la capacité de rétention d'eau maximale du sol	— Vérifier le pH du sol artificiel — Mesurer la capacité de rétention d'eau maximale du sol
Jour -5 à -3	— Trier les vers en vue de leur acclimatation	— Trier les vers en vue de leur acclimatation
Jour -3 à 0	— Acclimater les vers durant au moins 24 heures	— Acclimater les vers durant au moins 24 heures
Jour -1	— Préhumidifier le sol artificiel et le diviser en lots	— Préhumidifier le sol artificiel et le diviser en lots
Jour 0	— Préparer les solutions mères — Appliquer la substance chimique d'essai — Peser le substrat expérimental dans les récipients expérimentaux — Y incorporer à la nourriture — Introduire les vers — Mesurer le pH et le taux d'humidité du sol	— Préparer les solutions mères — Appliquer la substance chimique d'essai — Peser le substrat expérimental dans les récipients expérimentaux — Y incorporer la nourriture — Introduire les vers — Mesurer le pH et le taux d'humidité du sol
Jour 7	— Vérifier le taux d'humidité du sol	— Vérifier le taux d'humidité du sol — Administrer la nourriture
Jour 14	— Déterminer la mortalité adulte — Estimer le nombre de vers juvéniles — Mesurer le pH et le taux d'humidité du sol	— Vérifier le taux d'humidité du sol — Administrer la nourriture
Jour 21		— Observer le comportement des adultes — Retirer les adultes — Déterminer la mortalité adulte — Vérifier le taux d'humidité du sol — Administrer la nourriture
Jour 28		— Vérifier le taux d'humidité du sol — Ne pas administrer de nourriture

Calendrier	Essai de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations	Essai proprement dit
Jour 35		— Vérifier le taux d'humidité du sol — Administrer la nourriture
Jour 42		— Compter les vers juvéniles — Mesurer le pH et le taux d'humidité du sol

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

39. La présente méthode d'essai ne prescrit aucune démarche statistique stricte pour analyser les résultats de l'essai, bien que l'Appendice 7 en présente les grandes lignes.
40. Dans l'essai de détermination de l'ordre de grandeur, le principal effet observé est la mortalité. Les changements comportementaux (par exemple, l'incapacité de creuser le sol; la prostration contre la paroi du récipient expérimental) ou morphologiques (par exemple des blessures ouvertes) chez les vers adultes doivent néanmoins aussi être enregistrés, de même que la présence de vers juvéniles. Il faut normalement appliquer l'analyse probit (21) ou la régression logistique pour déterminer la CL_{50} . Toutefois, dans les cas où cette méthode d'analyse ne convient pas (par exemple si l'on obtient moins de trois concentrations engendrant une mortalité partielle), d'autres méthodes peuvent être utilisées, notamment les moyennes mobiles (22), la méthode de Spearman-Kärber simplifiée (23) ou une simple interpolation (par exemple la moyenne géométrique de la CL_0 et de la CL_{100} , calculée en multipliant la racine carrée de la CL_0 par la CL_{100}).
41. Dans l'essai proprement dit, l'effet observé est la fécondité (c'est-à-dire le nombre de vers juvéniles produits). Néanmoins, comme dans l'essai de détermination de l'ordre de grandeur, tous les autres signes de nocivité doivent être consignés dans le rapport final. Pour calculer les résultats de la reproduction, il faut connaître la moyenne arithmétique et l'écart-type par traitement et par témoin afin d'effectuer l'analyse statistique.
42. Si on a pratiqué une analyse de la variance, l'écart-type, s , et les degrés de liberté, dl , peuvent être remplacés respectivement par l'estimation de la variance "fusionnée" obtenue par analyse de la variance (ANOVA) et par ses degrés de liberté, à condition que la variance ne dépende pas de la concentration. Dans ce cas, on utilisera les variances uniques des témoins et des échantillons traités. On calcule généralement ces valeurs à l'aide d'un logiciel statistique commercial, en utilisant les résultats par récipient comme des expériences identiques. Si la fusion des résultats relatifs aux témoins négatifs et au(x) témoin(s) contenant le solvant semble plus pertinente que de calculer les résultats de l'essai comparativement à l'un de ces deux témoins, il faudra vérifier à l'aide d'un test qu'ils ne présentent pas de différence significative (pour les tests appropriés, voir au paragraphe 45 et à l'Appendice 7).
43. Si les résultats des expériences identiques présentent une distribution normale et des variances homogènes, d'autres tests statistiques et déductions pourront être effectués.

Estimation de la CSEO

44. Il est préférable d'appliquer des tests puissants. Il faudrait savoir si les données ont une distribution à peu près normale, en se reportant, par exemple, aux expériences précédentes (essais tournants) ou à d'autres données antérieures. L'homogénéité de la variance est plus déterminante. On a constaté empiriquement que la variance s'accroît souvent lorsque la moyenne s'accroît. Dans ce cas, une transformation des données pourrait déboucher sur l'homogénéité de la variance. Néanmoins, cette transformation devrait s'appuyer sur des données antérieures plutôt que sur les données en cours d'étude. En présence de données homogènes, il faudrait recourir à des tests t de comparaison multiple, tels que le test de Williams ($\alpha = 0,05$, unilatéral) (24)(25), ou, dans certains cas, le test de Dunnett (26)(27). Remarquons que, dans le cas d'une reproduction inégale, les valeurs de t en tableau doivent être corrigées, comme l'ont suggéré Dunnett et Williams. En présence d'une variation importante, il peut arriver que la croissance ou la décroissance des résultats ne soit pas régulière. Avec un tel écart à la monotonie, le test de Dunnett est plus approprié. Si la variance n'est pas homogène, il peut être utile d'examiner de plus près les répercussions possibles sur la variance afin de déterminer si les tests t peuvent

être appliqués sans perdre beaucoup en puissance (28). Sinon, un test U de comparaison multiple, par exemple un test U de Bonferroni selon Holm (29), ou, si ces données présentent une variance hétérogène, mais concordent par ailleurs avec une relation dose-effet sous-jacente monotone, un autre test non paramétrique [par exemple un test de Jonckheere-Terpstra (30)(31) ou de Shirley (32)(33)] peuvent être appliqués et sont généralement préférables aux tests *t* à variance inégale. (voir aussi le schéma exposé à l'Appendice 7).

45. Si un essai limite a été conduit et que les conditions requises par les tests paramétriques (normalité, homogénéité) sont remplies, le test *t* de Student en paire peut être utilisé ou, sinon, le test U de Mann-Whitney (29).

Estimation de la CE_x

46. Pour calculer une quelconque valeur de CE_x , on utilise la moyenne par traitement dans l'analyse de la régression (linéaire ou non linéaire), après avoir obtenu une fonction dose-effet appropriée. S'agissant de la croissance des vers considérée comme une réponse continue, les valeurs de la CE_x peuvent être estimées à l'aide d'une analyse de la régression adéquate (35). Les fonctions appropriées aux résultats épousant une valeur de tout ou rien (mortalité/survie et nombre de descendants produits) sont les fonctions sigmoïdes normales, logistiques ou de Weibull, à deux ou quatre paramètres, dont certaines peuvent aussi modéliser des réponses hormétiques. Si la fonction dose-effet a été ajustée par une analyse de la régression linéaire, il faudrait trouver un r^2 (coefficient de détermination) et/ou une pente significatifs avant d'estimer la CE_x en insérant une valeur correspondant à x % de la moyenne du témoin dans l'équation obtenue par l'analyse de la régression. Des limites de confiance à 95 % sont calculées selon la méthode de Fieller (mentionnée par Finney (21)) ou par une autre méthode récente appropriée.
47. Sinon, la réponse est modélisée comme un pourcentage ou une proportion du paramètre du modèle, paramètre qui est interprété comme le résultat moyen du témoin. Dans ce cas, la courbe sigmoïde normale (logistique, Weibull) peut souvent être facilement ajustée aux résultats à l'aide de la régression probit (21). Dans ce cas, la fonction de pondération doit être ajustée pour les résultats métriques selon Christensen (36). Cependant, si on observe une hormèse, l'analyse probit doit être remplacée par une fonction logistique ou de Weibull à quatre paramètres, ajustée par une régression non linéaire (36). S'il est impossible d'ajuster une fonction dose-effet appropriée aux données, d'autres méthodes peuvent être utilisées pour estimer la CE_x et ses limites de confiance, telles que les moyennes mobiles d'après Thompson (22) et la méthode simplifiée de Spearman-Kärber (23).

RAPPORT D'ESSAI

48. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Substance chimique d'essai:

- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (par exemple hydrosolubilité, pression de vapeur);
- identification chimique de la substance chimique d'essai selon la nomenclature de l'IUPAC, numéro CAS, lot de fabrication, lot de conditionnement, formule structurale et pureté.
- date d'expiration de l'échantillon.

Espèce d'expérience

- animal d'expérience utilisé: espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage.

Conditions expérimentales:

- ingrédients et préparation du sol artificiel;
- méthode d'application de la substance chimique d'essai;
- description des conditions expérimentales, notamment la température, le taux d'humidité, le pH, etc.;
- description complète de la conception de l'essai et du mode opératoire.

Résultats de l'essai:

- mortalité des vers adultes après deux semaines et nombre de vers juvéniles à la fin de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur;
- mortalité des vers adultes après trois semaines d'exposition et recensement complet des vers juvéniles à la fin de l'essai proprement dit;
- tout symptôme physique ou pathologique et changement comportemental observé chez les organismes d'expérience;
- CL_{50} , CSEO et/ou CE_x (par exemple CE_{50} , CE_{10}) pour la reproduction si certaines d'entre elles sont applicables avec des intervalles de confiance et représentation graphique du modèle ajusté utilisé pour leur calcul, toutes les informations et observations utiles à l'interprétation des résultats.

Écarts par rapport aux procédures décrites dans la présente méthode d'essai et faits inhabituels survenus au cours de l'essai.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen — Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.
- (2) Römbke, J. and Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.
- (3) Westheide, W. and Bethge Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Amsterdam,
- (4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.
- (5) Chapitre C.8 de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre.
- (6) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1993). Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) Partie 1: Détermination de la toxicité aiguë en utilisant des substrats de sol artificiel. No 11268-1. ISO, Genève.
- (7) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1996). Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction. No 11268-2. ISO, Genève.
- (8) Rundgren, S. and A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia shagnetorum* (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.
- (9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23, 217-232.
- (10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.
- (11) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- (12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37, 2-29.
- (13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen — Prüfungskategorien der Forschung. UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.
- (14) Römbke, J. and Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.
- (15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (16) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1994). Qualité du sol — Détermination du pH. n0 10390. ISO, Genève.

-
- (17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.
- (18) Nielsen, C.O. and Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1-160.
- (19) Bouguenec, V. and Giani, N. (1987). Deux nouvelles espèces d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et redescription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9-22.
- (20) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestník Československo Společnosti Zoologické 32, 300-305.
- (21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (22) Finney, D.J. (1978). Statistical method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (23) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.
- (24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.
- (25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.
- (26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.
- (27) Dunnett, C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.
- (28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361.
- (29) Holm, S., (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.
- (30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.
- (31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.
- (32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.
- (33) Williams, D.A. (1986). A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.
- (34) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- (35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.
- (36) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.
-

*Appendice 1***Définitions**

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai:

Substance chimique: une substance ou un mélange.

CE_x (concentration efficace à x %): concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'expérience durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Dans cet essai, les concentrations efficaces sont exprimées en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental.

CL₀ (concentration non létale): concentration d'une substance chimique d'essai qui ne tue aucun des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL₀ s'exprime en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental.

CL₅₀ (concentration létale moyenne): concentration d'une substance chimique d'essai qui entraîne la mort de 50 % des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL₅₀ s'exprime en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental.

CL₁₀₀ (concentration totalement létale): concentration d'une substance chimique d'essai qui entraîne la mort de 100 % des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL₁₀₀ s'exprime en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental.

CMEO (concentration minimale avec effet observé): la plus faible concentration de la substance chimique d'essai qui exerce un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$). Dans cet essai, la CMEO s'exprime en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental. Toutes les concentrations expérimentales supérieures à la CMEO doivent normalement produire un effet statistiquement différent du résultat observé sur le témoin. Tous les écarts à ce qui précède dans la détermination de la CMEO doivent être justifiés dans le rapport d'essai.

CSEO (concentration sans effet observé): la plus haute concentration de la substance chimique d'essai directement inférieure à la CMEO et à laquelle aucun effet n'est observé. Dans cet essai, la concentration correspondant à la CSEO n'a pas d'effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

Taux de reproduction: rapport du nombre moyen de vers juvéniles produits par le nombre d'adultes durant la période de l'essai.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Appendice 2

Détermination de la capacité maximale de rétention d'eau**Détermination de la capacité de rétention d'eau du sol artificiel**

La méthode suivante a fait ses preuves. Elle est décrite à l'annexe C de la norme ISO DIS 11268-2

Prélevez une quantité déterminée (5 g, par exemple) du sol expérimental servant de substrat à l'aide d'un instrument approprié (tarière, etc.). Couvrez le fond de la tarière avec un morceau de papier filtre et, après l'avoir remplie d'eau, placez-la sur un support dans un bain d'eau. La tarière doit être progressivement submergée jusqu'à ce que le niveau d'eau dépasse le sommet de la carotte de sol. Laissez la tarière dans l'eau durant environ trois heures. Comme l'eau absorbée par les capillaires du sol ne peut pas être retenue en totalité, laissez l'échantillon de sol dégorger durant deux heures en plaçant le tube sur un lit de sable quartzique fin très humide contenu dans un récipient fermé (pour empêcher le séchage). Pesez l'échantillon et séchez-le à 105 °C jusqu'à ce qu'il atteigne une masse constante. La capacité de rétention d'eau (CRE) se calcule comme suit:

$$\text{CRE (en \% de masse sèche)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

où:

S = masse du substrat saturé en eau + masse de la tarière + masse du papier filtre

T = tare (masse de la tarière + masse du papier filtre)

D = masse sèche du substrat

RÉFÉRENCES:

ISO (Organisation internationale de normalisation) (1996). Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction. No 11268-2. ISO, Genève.

*Appendice 3***Détermination du pH du sol**

La méthode de détermination du pH d'un échantillon de sol, décrite ci-dessous, s'appuie sur la norme ISO 10390 (Qualité du sol — Détermination du pH).

Laissez sécher une quantité définie de sol à température ambiante durant au moins 12 heures. Confectionnez une suspension du sol (contenant au moins 5 g de sol) dans cinq fois le volume du sol soit d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M de qualité pour analyse, soit d'une solution de chlorure de calcium (CaCl_2) 0,01 M de qualité pour analyse. Agitez énergiquement la suspension durant cinq minutes. Laissez reposer la suspension durant au moins deux heures, mais pas plus de 24 heures. Mesurez le pH de la phase liquide à l'aide d'un pH-mètre, étalonné avant chaque mesure avec une série appropriée de solutions tampons (pH 4,0 et 7,0, par exemple).

RÉFÉRENCES:

ISO (Organisation internationale de normalisation) (1994). Qualité du sol — Détermination du pH. N° 10390. ISO, Genève.

Appendice 4

Conditions de culture d'*Enchytraeus* sp.

Les enchytrées de l'espèce *Enchytraeus albidus* (ainsi que d'autres espèces d' *Enchytraeus*) peuvent être cultivés dans de grandes boîtes en plastique (30 × 60 × 10 cm, par exemple) garnies d'un mélange 1/1 de sol artificiel et de sol naturel de jardin non contaminé. L'emploi de compost, qui risque de contenir des substances chimiques toxiques, telles que des métaux lourds, est à éviter. La faune doit être éliminée du sol avant utilisation de ce dernier (par congélation, par exemple). Un substrat composé uniquement de sol artificiel peut être utilisé, mais le taux de reproduction risque d'être inférieur à celui obtenu avec un sol mixte. Le substrat destiné à la culture doit avoir un pH de $6,0 \pm 0,5$.

La culture est gardée à l'obscurité à une température de $15 \text{ à } 20 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$. La température ne devrait pas dépasser 23 °C . Le sol doit rester humide sans s'engorger. L'humidité du sol est correcte si, lorsqu'on presse doucement une poignée de sol dans une main, de petites gouttes d'eau perlent entre les doigts. On évitera de créer des conditions anoxiques en s'assurant que les couvercles des récipients de culture autorisent suffisamment d'échanges gazeux avec l'atmosphère. Il faudrait retourner soigneusement le sol chaque semaine pour favoriser l'aération.

Les vers peuvent être nourris avec des flocons d'avoine. Les flocons doivent être conservés dans des récipients hermétiquement fermés, et autoclavés ou chauffés avant l'emploi afin de prévenir une infestation par des mites de la farine (*Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*, par exemple) ou des mites prédatrices [(*Hypoaspis* (*Cosmolaelaps*) *miles*, *Gamasida*, *Acarina*, par exemple)]. Après avoir été chauffés, les flocons doivent être moulus de façon à pouvoir être facilement parsemés à la surface du sol. De temps à autre, la ration de flocons d'avoine pourra être enrichie de vitamines, de lait et d'huile de foie de morue. D'autres aliments, tels que la levure de boulanger et la nourriture pour poissons "Tetramin", conviennent également.

La ration alimentaire est administrée environ deux fois par semaine. Une quantité appropriée de flocons d'avoine est répandue à la surface du sol ou délicatement mélangée au substrat lorsqu'on remue le sol pour favoriser l'aération. La quantité absolue de nourriture fournie dépend du nombre de vers peuplant le substrat. À titre indicatif, la ration doit être augmentée si elle est entièrement consommée le jour où elle a été donnée. Par contre, si des restes de nourriture subsistent encore à la surface du sol lors de l'administration de la deuxième ration (une semaine plus tard), la ration doit être diminuée. La nourriture contaminée par des champignons doit être enlevée et remplacée. Après trois mois, les vers sont transférés dans un substrat fraîchement préparé.

Les conditions de culture sont jugées satisfaisantes si les vers: a) ne tentent pas de quitter le substrat, b) se déplacent rapidement dans le sol, c) présentent une surface extérieure brillante sur laquelle les particules de sol n'adhèrent pas, d) ont une couleur plus ou moins blanchâtre, e) présentent diverses tranches d'âge et f) se reproduisent continuellement.

Appendice 5

Conduite de l'essai avec d'autres espèces d'*Enchytraeus***Sélection des espèces**

Il est possible d'utiliser d'autres espèces qu'*E. albidus*, mais le mode opératoire et les critères de validité doivent être adaptés en conséquence. Comme de nombreuses espèces d'*Enchytraeus* sont faciles à se procurer et supportent bien les conditions de laboratoire, le critère le plus important pour sélectionner une espèce autre qu'*E. albidus*, est sa pertinence écologique et, d'autre part, sa sensibilité comparable. On est parfois obligé d'utiliser une autre espèce d'*Enchytraeus*; par exemple, dans les pays où *E. albidus* est absent et impossible à importer (en raison de restrictions imposées par une quarantaine, par exemple).

Exemples d'autres espèces appropriées

- *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe, 1992): Ces dernières années, cette espèce a souvent été utilisée dans des études écotoxicologiques en raison de sa facilité d'élevage et de mise à l'essai. Néanmoins, elle est petite, ce qui la rend plus difficile à manipuler qu'*E. albidus* (en particulier aux stades précédant l'emploi de la méthode de coloration). L'existence d'*E. crypticus* dans la nature n'est pas certaine, cette espèce n'ayant été décrite que dans les cultures de lombrics. Aussi, ses besoins écologiques sont-ils inconnus.
- *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky, 1879): Ce nom recouvre probablement un groupe d'espèces très proches, difficiles à distinguer sur le plan morphologique. Son usage à des fins expérimentales est déconseillé si les individus destinés à l'essai ne peuvent être identifiés jusqu'au niveau de l'espèce. *E. buchholzi* fréquente habituellement les prairies et des sites dérangés tels que les bords de routes.
- *Enchytraeus luxuriosus*: Dénommée à l'origine *E. minutus*, cette espèce a été décrite récemment (1). Elle a été découverte pour la première fois par U. Graefe (Hambourg) dans une prairie proche de St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, Allemagne). *E. luxuriosus* atteint environ la moitié de la taille d'*E. albidus*, mais est plus grand que les autres espèces décrites ici, ce qui pourrait en faire un bon remplaçant d'*E. albidus*.
- *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen, 1963): Jusqu'à présent, la présence de cette espèce a été signalée dans des sols minéraux allemands et espagnols, où elle est commune, mais généralement pas très abondante. En comparaison avec d'autres petites espèces de ce genre, elle est relativement facile à identifier. On ne sait rien de son comportement dans des essais de laboratoire, ni de sa sensibilité aux produits chimiques. Néanmoins, elle s'est avérée facile à cultiver (E. Belotti, communication personnelle).

Conditions d'élevage

Toutes les espèces d'*Enchytraeus* susmentionnées peuvent être cultivées sur les mêmes substrats qu'*E. albidus*. Comme elles sont plus petites, elles peuvent être cultivées dans des récipients plus petits et recevoir une ration alimentaire de la même composition, mais plus réduite. Ces espèces ayant un cycle de vie plus court qu'*E. albidus*, elles doivent être nourries plus fréquemment.

Conditions expérimentales

Les conditions expérimentales sont généralement identiques à celles qui s'appliquent à *E. albidus*, à ceci près que:

- la dimension des récipients expérimentaux peut (mais ne doit pas) être inférieure;
- la durée de l'essai de reproduction peut (mais ne doit pas) être plus courte, c'est-à-dire quatre au lieu de six semaines, mais la durée de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur ne doit pas être modifiée;
- compte tenu de la petitesse des vers juvéniles, l'utilisation de la méthode de coloration est fortement recommandée pour le comptage;
- le critère de validité relatif au "nombre de vers juvéniles par récipient témoin" doit être porté à "50".

RÉFÉRENCES

- (1). Schmelz, R.M. and Collado, R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). *Carolinae* 57, 93-100.
-

Appendice 6

Description détaillée des techniques d'extraction

Coloration au rouge de Bengale

Cette méthode, développée à l'origine en écologie limnique (1) a été proposée la première fois pour le dénombrement des enchytrées juvéniles dans un essai de reproduction des enchytrées par W. de Coen (Université de Gand, Belgique). Une version modifiée (rouge de Bengale mélangé avec du formaldéhyde au lieu de l'éthanol) a été mise au point indépendamment par le RIVM (Bilthoven, Pays-Bas) (2)(3).

À la fin de l'essai proprement dit (après six semaines), le sol des récipients expérimentaux est transféré dans un récipient peu profond. Un récipient Bellaplast ou une cuve de développement photographique munie d'un fond strié sont utiles à cet effet, et ce, dans le cas de la cuve, parce que les stries restreignent le mouvement des vers dans le champ d'observation. Les vers juvéniles sont fixés avec de l'éthanol (environ 5 ml par expérience identique). Ensuite, les récipients sont remplis d'eau sur une hauteur de 1 à 2 cm. On ajoute quelques gouttes (200 à 300 µl) de rouge de Bengale (solution à 1 % dans de l'éthanol) ou d'une solution d'éosine à 0,5 % et les deux composés sont soigneusement mélangés. Après 12 heures, les vers devraient présenter une coloration rougeâtre et être faciles à compter car ils reposeront à la surface du substrat. Une autre possibilité consiste à tamiser le mélange substrat/alcool (dimension des mailles: 0,250 mm) avant le comptage des vers. De cette manière, la kaolinite, la tourbe et une partie du sable seront évacuées à travers le tamis et les vers colorés en rouge seront plus faciles à voir et à compter. L'utilisation de loupes éclairées (dimension des lentilles: au moins 100 × 75 mm, avec un facteur d'agrandissement de 2 à 3) facilitera également le comptage.

La technique de coloration réduit la durée du comptage à quelques minutes par récipient et, à titre indicatif, une seule personne devrait pouvoir évaluer tous les récipients d'un essai en deux jours maximum.

Extraction par voie humide

L'extraction par voie humide doit être pratiquée immédiatement après la fin de l'essai. Le sol de chaque récipient expérimental est versé dans des tamis en plastique dont les trous mesurent environ 1 mm. Les tamis sont ensuite suspendus dans des bols en plastique sans toucher le fond. On verse doucement de l'eau dans les bols jusqu'à ce que les échantillons contenus dans les tamis soient complètement submergés. Pour obtenir un taux de récupération de plus de 90 % des vers présents, la période d'extraction doit durer 3 jours à 20 ± 20°C. À la fin de la période d'extraction, on enlève les tamis et on laisse l'eau décanter lentement (exception faite d'une petite quantité), en prenant soin de ne pas remuer le sédiment au fond des bols. Ensuite, on agite légèrement les bols en plastique pour suspendre le sédiment dans l'eau sus-jacente. L'eau est transférée dans une boîte de Petri et, après le dépôt des particules de sol, les enchytrées peuvent être identifiées, enlevées et comptées sous un stéréomicroscope, à l'aide de pinces souples en acier.

Flottation

Une méthode fondée sur la flottation a été décrite dans une note rédigée par R. Kuperman (4). Après avoir fixé le contenu du récipient expérimental avec de l'éthanol, on submerge le sol en versant du Ludox (silice colloïdale AM-30, suspension aqueuse à 30 % en poids) jusqu'à une hauteur de 10 à 15 mm au-dessus de la surface du sol. Après que le sol a été bien mélangé à l'agent de flottation durant 2 à 3 minutes, les vers juvéniles flottant à la surface se comptent aisément.

RÉFÉRENCES

- (1) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, *Vestnik Československo Spolecnosti Zoologicke* 32, 300-305.
- (2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

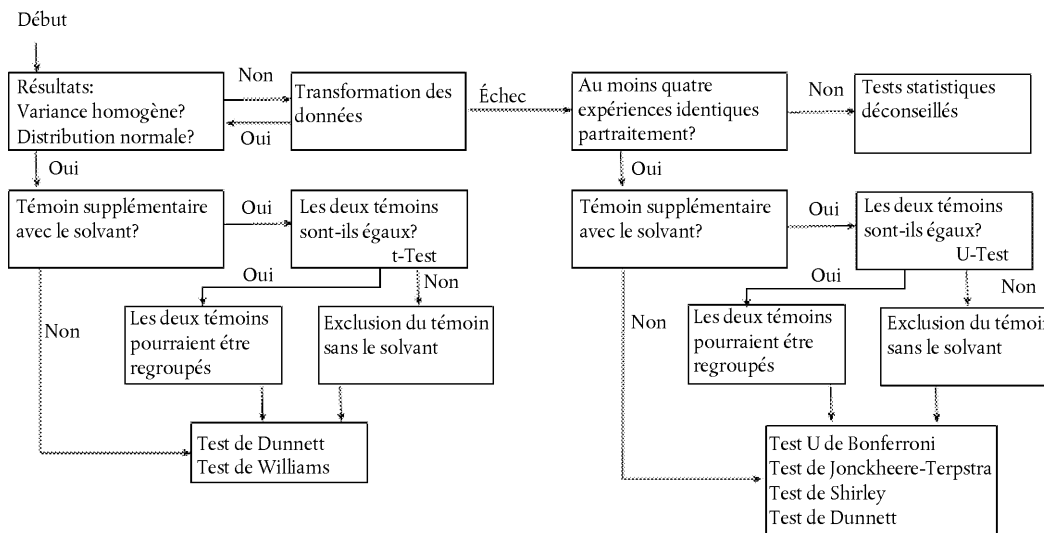
-
- (3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. en Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. *Ecotox. Envir. Safety* 38, 108-121.
 - (4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. and Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the OConnor Method for Extracting Enchytraeids from soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, p. 157.
-

Appendice 7

Description schématique de l'évaluation statistique des résultats (détermination de la CSEO)

Tests paramétriques

Tests non paramétriques



C.33. ESSAI DE REPRODUCTION CHEZ LE LOMBRIC (*EISENIA FETIDA* /*EISENIA ANDREI*)**INTRODUCTION**

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 222 (2004) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle est destinée à évaluer les effets des substances chimiques dans le sol sur le taux de reproduction (et sur d'autres critères sub-létaux) de deux espèces de lombric: *Eisenia fetida* (Savigny 1826) ou *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2). Cet essai a fait l'objet d'un essai tournant (3). Une méthode d'essai existe pour les essais de toxicité aiguë sur le ver de terre (4). Plusieurs autres lignes directrices nationales et internationales pour les essais de toxicité aiguë et chronique sur le lombric ont été publiées (5)(6)(7)(8).
2. *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* sont considérés comme des représentants de la pédofaune et des vers de terre en particulier. Il existe des informations de référence sur l'écologie des vers de terre et leur utilisation dans les essais d'écotoxicité (7)(9)(10)(11)(12).

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Les vers adultes sont exposés à une série de concentrations de la substance chimique d'essai, soit mélangée au sol, soit, dans le cas des pesticides, appliquée dans ou sur le sol selon des procédures imitant le mode d'emploi de la substance. La méthode d'application dépend de la finalité de l'essai. La gamme de concentrations choisie doit couvrir les concentrations susceptibles de provoquer des effets à la fois sublétaux et létaux sur une période de huit semaines. La mortalité et les effets sur la croissance des vers adultes sont déterminés après quatre semaines d'exposition. Ensuite, les adultes sont extraits du sol et on évalue les effets sur la reproduction à l'issue des quatre semaines suivantes en comptant le nombre de descendants présents dans le sol. On compare le taux de reproduction des vers exposés à la substance chimique d'essai à celui du (des) témoin(s), afin de déterminer i) la concentration sans effet observé (CSEO) et/ou ii) la CE_x (par exemple CE_{10} , EC_{50}), en utilisant un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x % du taux de reproduction. Les concentrations expérimentales doivent couvrir la CE_x (CE_{10} , CE_{50} , par exemple) de façon à ce que la CE_x soit interpolée plutôt qu'extrapolée (voir les définitions à l'Appendice 1).

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

4. Il faudrait connaître les informations suivantes sur la substance chimique d'essai pour pouvoir définir le mode opératoire approprié:
 - hydrosolubilité;
 - $\log K_{oc}$;
 - pression de vapeur;
 - si possible, données sur le devenir et le comportement dans l'environnement (par exemple, vitesse de photolyse et d'hydrolyse si ces paramètres sont pertinents au regard du mode d'application de la substance d'essai).
5. La présente méthode d'essai s'applique à toutes les substances chimiques, indépendamment de leur solubilité dans l'eau. La méthode ne convient pas aux substances volatiles, définies ici comme des substances dont la constante de Henry ou le coefficient de partage air/eau sont supérieurs à un, ni aux substances dont la pression de vapeur excède 0,0133 Pa à 25 °C.
6. La présente méthode d'essai ne tient pas compte de l'éventuelle dégradation de la substance chimique d'essai au cours de l'essai. Par conséquent, il est impossible de garantir que les concentrations d'exposition conserveront leur valeur initiale tout au long de l'essai. Dans ce cas, il est recommandé d'effectuer une analyse chimique de la substance chimique d'essai au début et à la fin de l'essai.

SUBSTANCE CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

7. Il faut déterminer la CSEO et/ou la CE_x d'une substance chimique de référence pour s'assurer que les conditions expérimentales du laboratoire sont adéquates et vérifier que la réaction des organismes d'expérience ne change pas de façon statistiquement significative au fil du temps. Il est conseillé de tester une substance de référence au moins une fois par an, ou, lorsque les essais sont conduits moins fréquemment, parallèlement à la détermination de la toxicité d'une substance chimique d'essai. La carbendazime ou le bénomyl, qui affectent la reproduction, conviennent comme substances de référence (3). Des effets appréciables devraient apparaître entre a) 1 et 5 mg d'ingrédient actif/kg de masse sèche ou b) 250-500 g/ha ou 25-50 mg/m². Si un étalon toxique positif est inclus dans la série d'essais, on n'applique qu'une seule concentration et un nombre d'expériences identiques égal à celui des témoins.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

8. Les témoins devraient satisfaire aux critères suivants pour que le résultat de l'essai soit considéré comme valide:
- chaque expérience identique (sur 10 adultes) aura produit au moins 30 vers juvéniles à la fin de l'essai;
 - le coefficient de variation de la reproduction est $\leq 30\%$;
 - la mortalité adulte durant les quatre premières semaines de l'essai est $\leq 10\%$.

Un essai qui ne remplirait pas les critères de validité susmentionnés doit être abandonné, à moins que la poursuite de l'essai puisse être justifiée. Cette justification doit figurer dans le rapport d'essai.

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Matériel

9. Il convient d'utiliser des récipients expérimentaux en verre ou en un autre matériau chimiquement inerte d'une capacité d'un à deux litres. Les récipients doivent avoir une section horizontale d'environ 200 cm², de sorte que l'ajout de 500 à 600 g de masse sèche de substrat donne un volume de substrat humide d'une profondeur de 5 à 6 cm. La forme du récipient doit permettre les échanges gazeux entre le substrat et l'atmosphère et laisser passer la lumière (couvercle transparent perforé, par exemple), tout en empêchant la fuite des vers. Si la quantité de substrat utilisée est nettement supérieure à 500 à 600 g par récipient expérimental, le nombre de vers doit être augmenté proportionnellement.
10. Cet essai requiert du matériel de laboratoire courant, en particulier:
- armoire à séchage;
 - stéréomicroscope;
 - pH-mètre et photomètre;
 - balances suffisamment précises;
 - instruments appropriés permettant de réguler la température;
 - instruments appropriés permettant de réguler l'humidité (pas essentiel si les récipients expérimentaux ont des couvercles);
 - incubateur ou petite chambre équipée d'un conditionnement de l'air;
 - pinces, crochets ou anses;
 - bain d'eau.

Préparation du sol artificiel

11. Dans cet essai, on utilise un sol artificiel (5)(7) composé comme suit (en poids secs, séchés à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant):
- 10 % de tourbe à sphaigne (pH aussi proche que possible de 5,5-6,0, pas de résidus visibles de plantes, finement broyée, séchée jusqu'à atteindre un taux d'humidité donné, mesuré);
 - 20 % d'argile kaolinique (taux de kaolinite de préférence supérieur à 30 %);

- 0,3 à 1,0 % de carbonate de calcium (CaCO_3 , pulvérisé, de qualité pour analyse) pour obtenir un pH initial de $6,0 \pm 0,5$;
- 70 % de sable quartzique (selon la quantité de CaCO_3 nécessaire) séché à l'air, composé en majorité de sable fin (plus de 50 % des particules mesurent entre 50 et 200 μm).

Remarque 1: La quantité de CaCO_3 requise dépendra des ingrédients du sol, y compris la nourriture, et devrait être déterminée par des mesures effectuées sur des sous-échantillons de sol immédiatement avant l'essai. Le pH est mesuré sur un échantillon de sol mélangé à une solution 1 M de chlorure de potassium (KCl) ou à une solution 0,01 M de chlorure de calcium (CaCl_2) (13).

Remarque 2: Il est possible de réduire la teneur en carbone organique du sol artificiel, par exemple en ramenant le pourcentage de tourbe à 4-5 % et en augmentant le taux de sable en conséquence. Cette réduction de la teneur en carbone organique est susceptible de diminuer les possibilités d'adsorption de la substance chimique d'essai sur le sol (carbone organique) et d'augmenter la disponibilité de la substance chimique d'essai pour les vers. Il a été démontré qu'*Eisenia fetida* peut satisfaire aux critères de validité concernant la reproduction lorsqu'il est testé sur le terrain sur des sols dont la teneur en carbone organique est inférieure (2,7 %, par exemple) (14), et on a constaté expérimentalement que ce ver peut aussi satisfaire aux critères de validité lorsqu'il est mis à l'essai sur un sol artificiel renfermant 5 % de tourbe. Par conséquent, avant d'utiliser ce type de sol dans l'essai proprement dit, il n'est pas nécessaire de démontrer que le sol artificiel permet de répondre aux critères de validité, à moins que le taux de tourbe soit inférieur aux valeurs indiquées ci-dessus.

Remarque 3: Lorsqu'on utilise un sol naturel dans un essai supplémentaire (réalisé à un niveau supérieur dans le cadre d'essais séquentiels, par exemple), l'adéquation du sol à la culture des vers et au respect des critères de validité doit aussi être démontrée.

12. Les ingrédients secs du sol sont mélangés complètement (dans un grand mélangeur de laboratoire, par exemple) dans un endroit bien ventilé. Avant d'entamer l'essai, on humidifiera le sol artificiel sec avec suffisamment d'eau désionisée pour lui conférer environ la moitié de sa teneur finale en eau, à savoir 40 % à 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau (équivalant à 50 ± 10 % d'humidité par masse sèche). De cette manière, on obtient un substrat qui ne rejette pas d'eau libre ou dormante lorsqu'on le presse dans la main. La capacité maximale de rétention d'eau du sol artificiel est déterminée conformément à la procédure décrite à l'Appendice 2, à la norme ISO 11274 (15) ou à la norme UE équivalente.
13. Si la substance chimique d'essai est appliquée à la surface du sol ou mélangée au sol sans eau, la quantité finale d'eau peut être mélangée au sol artificiel durant la préparation du sol. Si la substance chimique d'essai est mélangée au sol avec une certaine quantité d'eau, l'eau supplémentaire peut être ajoutée en même temps que la substance chimique d'essai (voir paragraphe 19).
14. Le taux d'humidité du sol est déterminé au début et à la fin de l'essai, conformément à la norme ISO 11465 (16), et le pH du sol, suivant les instructions données à l'Appendice 3, dans la norme ISO 10390 (13) ou dans la norme UE équivalente. Ces déterminations devraient être conduites sur un échantillon de sol témoin et sur un échantillon de sol de chaque concentration de la substance d'essai. Le pH du sol ne doit pas être ajusté lorsque des substances acides ou basiques sont mises à l'essai. Il faudrait vérifier le taux d'humidité tout au long de l'essai en pesant périodiquement les récipients (voir paragraphe 26 et 30).

Sélection et préparation des animaux d'essai

15. L'espèce utilisée dans cet essai est *Eisenia fetida* ou *Eisenia andrei* (1)(2). Au début de l'essai, les vers sont adultes, âgés de deux mois à un an et pourvus d'un clitellum. Les vers devraient provenir d'une culture synchronisée offrant une structure d'âge relativement homogène (Appendice 4). L'âge des individus d'un même groupe d'essai ne devrait pas s'écarter de plus de 4 semaines.
16. On acclimate les vers sélectionnés pendant au moins un jour dans le type de sol artificiel utilisé pendant l'essai. Durant cette période, les vers reçoivent la même nourriture qu'au cours de l'essai (voir paragraphes 31 à 33).
17. Les vers sont pesés individuellement et répartis au hasard, par groupes de dix, dans les récipients expérimentaux au début de l'essai. Avant la pesée, on lave les vers avec de l'eau désionisée, puis on les dépose un instant sur un papier filtre pour éponger l'excès d'eau. La masse humide de chaque ver sera comprise entre 250 et 600 mg.

Préparation des concentrations expérimentales

18. Deux méthodes d'application de la substance chimique d'essai peuvent être utilisées: mélanger la substance d'essai au sol (voir paragraphes 19 à 21) ou l'appliquer à la surface du sol (voir paragraphes 22 à 24). La sélection de la méthode appropriée dépend de la finalité de l'essai. On recommande, en général, de mélanger la substance d'essai au sol. Cependant, il convient parfois de simuler les pratiques agricoles normales (par exemple, la pulvérisation de préparations liquides ou l'utilisation de présentations spéciales de pesticides telles que les granulés ou des produits de traitement des semences). Les solvants choisis pour faciliter le traitement du sol par la substance chimique d'essai seront peu toxiques pour les vers de terre et l'essai inclura un témoin traité au solvant, le cas échéant (voir paragraphe 27).

Incorporer la substance chimique d'essai au sol

Substance chimique d'essai hydrosoluble

19. Une solution de la substance chimique d'essai dans de l'eau désionisée est préparée juste avant le début de l'essai, en quantité suffisante pour toutes les expériences menées à la même concentration. Il est parfois nécessaire de faciliter la préparation de la solution expérimentale à l'aide d'un co-solvant. On prépare suffisamment de solution pour atteindre le taux d'humidité final (40 à 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau). La solution est mélangée complètement au sol avant d'être introduite dans le récipient expérimental.

Substance chimique d'essai insoluble dans l'eau

20. La substance chimique d'essai est dissoute dans un petit volume d'un solvant organique approprié (par exemple de l'acétone), puis pulvérisée sur, ou mélangée à, une petite quantité de sable quartzique fin. Le solvant est ensuite éliminé par évaporation sous une hotte pendant au moins quelques minutes. Le sable traité est alors mélangé complètement au sol artificiel préhumidifié. On ajoute la quantité d'eau désionisée requise pour atteindre le taux d'humidité final, à savoir 40 à 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau, en la mélangeant au sol. Après quoi, le sol est prêt à être déversé dans les récipients expérimentaux. On veillera à ce que le solvant ne soit pas toxique pour les vers de terre.

Substance chimique d'essai insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques

21. On prépare un mélange composé de 10 g de sable quartzique industriel finement broyé et de la quantité nécessaire de substance d'essai pour obtenir la concentration expérimentale voulue dans le sol. Ce mélange est ensuite mélangé complètement au sol artificiel préhumidifié. On ajoute la quantité d'eau désionisée requise pour atteindre le taux d'humidité final, à savoir 40 à 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau, en la mélangeant au sol. Le sol est alors prêt à être déversé dans les récipients expérimentaux.

Application de la substance chimique d'essai à la surface du sol

22. Le sol est traité après l'ajout des vers. On verse le sol humidifié dans les récipients expérimentaux avant de déposer les vers, préalablement pesés, à la surface du sol. Normalement, un ver sain s'enfouit immédiatement dans le substrat, si bien que tous les vers subsistant à la surface après 15 minutes seront considérés comme lésés et devront être remplacés. Le cas échéant, les remplaçants et les vers écartés devront être pesés, de telle sorte que le poids vif total du groupe de vers exposés et le poids total du récipient contenant les vers soient connus au départ.
23. La substance chimique d'essai est appliquée. Elle ne doit pas être ajoutée au sol dans la demi-heure qui suit l'introduction des vers dans le récipient (ou si des vers sont présents à la surface du sol) de façon à éviter une exposition directe à la substance chimique d'essai par contact cutané. Si la substance d'essai est un pesticide, il peut être pertinent de l'appliquer à la surface du sol par pulvérisation. La substance d'essai devrait être répartie à la surface du sol de façon aussi régulière que possible, à l'aide d'un épandeur de laboratoire apte à simuler la pulvérisation sur un champ. Avant l'application, on enlève le couvercle des récipients expérimentaux et on le remplace par un revêtement interne protégeant les parois latérales du récipient des projections. Le revêtement peut être confectionné avec un récipient expérimental dont la base a été enlevée. L'application devrait avoir lieu à une température de 20 ± 2 °C et, s'agissant de solutions aqueuses, d'émulsions ou de dispersions, à un taux compris entre 600 et 800 µl/m². Il convient de vérifier le taux à l'aide d'une technique d'étalonnage appropriée. L'application des présentations spéciales, telles que les granulés ou les produits de traitement des semences, doit reproduire leur mode d'emploi en agriculture.

24. On laissera les récipients expérimentaux sans couvercle durant une heure pour permettre au solvant volatil associé à l'application de la substance chimique d'essai de s'évaporer, le cas échéant, en prenant garde qu'aucun ver ne s'échappe.

MODE OPÉRATOIRE

Groupes d'essai et témoins

25. Il est recommandé de déposer 10 vers par 500 à 600 g de masse sèche de sol artificiel (soit 50 à 60 g de sol par ver). Si l'on utilise de plus grandes quantités de sol, comme cela pourrait être le cas pour des pesticides exigeant un mode d'application spécial, tels les produits de traitement des semences, la charge de 50 à 60 g de sol par ver doit être maintenue moyennant l'augmentation du nombre de vers. On prépare dix vers par récipient témoin et traité. Les vers sont lavés à l'eau et essuyés, puis déposés un instant sur un papier absorbant pour éponger l'excès d'eau.
26. Afin d'éviter les erreurs systématiques dans la répartition des vers dans les récipients expérimentaux, on mesure l'homogénéité de la population expérimentale en pesant individuellement 20 vers prélevés au hasard dans la population qui fournira les vers d'expérience. Une fois l'homogénéité établie, des lots de vers sont sélectionnés, pesés et répartis dans les récipients expérimentaux selon un procédé de randomisation. Après l'introduction des vers d'expérience, il faut peser chaque récipient expérimental, de façon à obtenir un poids initial de référence pour la mesure du taux d'humidité du sol tout au long de l'essai, comme décrit au paragraphe 30. Les récipients expérimentaux sont ensuite couverts, comme décrit au paragraphe 9 et placés dans le local expérimental.
27. On prépare des témoins appropriés à chacune des méthodes d'application de la substance chimique d'essai décrites aux paragraphes 18 à 24. Les témoins sont préparés de la même façon que les récipients traités, sauf qu'ils ne contiennent pas la substance d'essai. Aussi, le cas échéant, les témoins renfermeront un solvant organique, du sable quartzique ou d'autres véhicules à des concentrations/quantités comparables à celles employées dans les récipients traités. Si la substance chimique d'essai est incorporée à l'aide d'un solvant ou d'un autre véhicule, il convient de préparer un témoin supplémentaire ne contenant ni le véhicule ni la substance d'essai, afin de s'assurer que le véhicule n'influence pas les résultats.

Conditions expérimentales

28. L'essai est conduit à 20 ± 2 °C, avec des cycles réglés de lumière et d'obscurité (de préférence 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité) et un éclairage de 400 à 800 lux dans la zone des récipients expérimentaux.
29. Les récipients expérimentaux ne sont pas aérés durant l'essai, mais les couvercles de ces récipients doivent autoriser les échanges gazeux avec l'atmosphère tout en limitant l'évaporation de l'humidité (voir paragraphe 9).
30. La teneur en eau du substrat des récipients expérimentaux est maintenue constante tout au long de l'essai. Pour ce faire, on pèse périodiquement les récipients sans leurs couvercles et on compense toute perte avec de l'eau désionisée. La teneur en eau ne doit pas varier de plus de 10 % par rapport à sa valeur au début de l'essai.

Alimentation

31. Toute nourriture dont la composition permet au moins de maintenir le poids des vers durant l'essai est jugée acceptable. Les flocons d'avoine, le crottin de cheval ou la bouse de vache ont fait leurs preuves à cet égard. Il faudra s'assurer que les vaches ou les chevaux dont on recueille les déjections ne font pas l'objet d'un traitement vétérinaire avec des substances telles que des activateurs de croissance, des nématicides ou des produits analogues, susceptibles d'être nocives pour les vers durant l'essai. Il est recommandé de ramasser soi-même la bouse de vache, l'expérience ayant démontré que la bouse de vache vendue dans le commerce comme engrais de jardin risque de nuire aux vers. Les déjections doivent être séchées à l'air, finement broyées et pasteurisées avant emploi.
32. Avant de l'utiliser dans l'essai, on administre chaque nouveau lot de nourriture à une culture de vers non expérimentale, afin de vérifier qu'il est d'une qualité appropriée. La croissance et la production des cocons ne devraient pas diminuer par rapport à celles de vers élevés dans un substrat ne contenant pas le nouveau lot de nourriture [conditions décrites dans la méthode d'essai C.8 (4)].

33. La première fois, la nourriture est administrée un jour après l'introduction des vers et l'ajout de la substance chimique d'essai au sol. Environ 5 g de nourriture sont parsemés à la surface du sol de chaque récipient et humidifiés avec de l'eau désionisée (quelque 5 à 6 ml par récipient). Ensuite, la nourriture est dispensée une fois par semaine au cours des quatre semaines de l'essai. Si des restes de nourriture subsistent, il faudra diminuer la ration afin d'éviter une croissance fongique, ou des moisissures. Les adultes sont retirés du sol au 28^{ème} jour de l'essai. Cinq grammes supplémentaires de nourriture sont fournis à chaque récipient expérimental. Aucune nourriture supplémentaire n'est administrée durant les quatre semaines restantes de l'essai.

Sélection des concentrations expérimentales

34. Une connaissance préalable de la toxicité de la substance chimique d'essai, tirée, par exemple, d'un essai de toxicité aiguë (4) et/ou d'une étude de détermination de l'ordre de grandeur, devrait faciliter la sélection des concentrations expérimentales appropriées. Une étude de détermination de l'ordre de grandeur est menée, s'il y a lieu, avec, par exemple, cinq concentrations expérimentales: 0,1, 1,0, 10, 100 et 1 000 mg/kg (masse sèche de sol). Une expérience identique par traitement et témoin suffit. L'étude de détermination de l'ordre de grandeur dure deux semaines et l'on évalue la mortalité à la fin de l'essai.

Conception expérimentale

35. Comme aucun traitement statistique défini ne peut être prescrit pour cet essai, la présente méthode d'essai fournit des instructions pour déterminer la CSEO et la CE_x . La CSEO sera vraisemblablement demandée par les autorités réglementaires dans un avenir proche. L'usage de la CE_x pourrait se généraliser à court terme, pour des raisons statistiques et écologiques. Aussi, la présente méthode d'essai propose-t-elle trois conceptions fondées sur des recommandations émises à l'issue de l'essai tournant d'une méthode d'essai de reproduction chez l'enchytrée (17):
36. En sélectionnant la gamme de concentrations à appliquer, on tiendra compte des aspects suivants:
- s'agissant de déterminer la CSEO, il faudrait tester au moins cinq/douze concentrations formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques pour chaque concentration expérimentale et huit témoins. Les concentrations devraient être espacées d'un facteur n'excédant pas 2,0.
 - s'agissant de déterminer la CEx (CE_{10} , CE_{50} , par exemple), il est recommandé de prévoir suffisamment de concentrations différentes pour obtenir au moins quatre réponses moyennes statistiquement différentes à ces concentrations. Il conviendrait d'inclure au moins deux expériences identiques par concentration expérimentale et six témoins identiques. Le facteur d'espacement peut varier: il doit être inférieur ou égal à 1,8 dans la gamme censée produire un effet et supérieur à 1,8 aux concentrations supérieures et inférieures.
 - une démarche combinée permet de déterminer à la fois la CSEO et la CE_x . On utilise huit concentrations formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques par traitement et huit témoins. Les concentrations devraient être espacées d'un facteur n'excédant pas 1,8.

Durée de l'essai et mesures

37. Le 28^{ème} jour, les vers adultes vivants sont observés et comptés. Tout comportement inhabituel (incapacité de creuser le sol, prostration, par exemple) et changement morphologique (blessures ouvertes, par exemple) sont également notés. Tous les vers adultes sont ensuite retirés des récipients expérimentaux, comptés et pesés. Le transfert du sol renfermant les vers sur un plateau propre, avant l'évaluation, peut faciliter la recherche des adultes. Avant d'être pesés, les vers extraits du sol devraient être lavés avec de l'eau désionisée et déposés un instant sur un papier filtre qui absorbera l'eau excédentaire. Tous les vers non retrouvés à cette étape doivent être consignés comme morts, on suppose en effet que ces vers sont morts et ont été décomposés avant l'évaluation.
38. Si le sol a été retiré des récipients, il faut l'y remettre (sans les vers adultes mais avec tous les cocons engendrés, le cas échéant). Le sol est ensuite incubé durant quatre semaines supplémentaires dans les mêmes conditions expérimentales, si ce n'est que la nourriture n'est administrée qu'une seule fois, au début de cette phase de l'essai (voir paragraphe 33).

39. À la fin de la seconde période de quatre semaines, on dénombre les vers juvéniles éclos des cocons dans le sol expérimental et les cocons, en utilisant les procédures décrites à l'Appendice 5. Tous les signes de nocivité ou les lésions observés sur les vers doivent aussi être enregistrés tout au long de la durée de l'essai.

Essai limite

40. Si aucun effet n'est observé à la plus haute concentration de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur (1 000 mg/kg), l'essai de reproduction est à conduire comme un essai limite, avec une concentration expérimentale de 1 000 mg/kg. L'essai limite permettra de démontrer que la CSEO pour la reproduction est supérieure à la concentration limite et de réduire au minimum le nombre de vers utilisés dans l'essai. Cet essai comprend huit expériences identiques à la fois pour le sol traité et pour le témoin.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

41. La présente méthode d'essai ne prescrit aucune démarche statistique stricte pour analyser les résultats de l'essai, bien que l'Appendice 6 en présente les grandes lignes.
42. L'un des effets observés est la mortalité. Les changements comportementaux (par exemple, l'incapacité de creuser le sol, la prostration contre la paroi en verre du récipient expérimental) ou morphologiques (par exemple des blessures ouvertes) chez les vers adultes doivent néanmoins aussi être enregistrés, de même que la présence de vers juvéniles. La CL_{50} se détermine normalement par analyse probit (18) ou régression logistique. Toutefois, dans les cas où cette méthode d'analyse ne convient pas (par exemple si l'on obtient moins de trois concentrations engendrant une mortalité partielle), d'autres méthodes peuvent être utilisées, notamment les moyennes mobiles (19), la méthode de Spearman-Kärber simplifiée (20) ou une simple interpolation (par exemple la moyenne géométrique de la CL_0 et de la CL_{100} , calculée en multipliant la racine carrée de la CL_0 par la CL_{100}).
43. L'autre effet observé est la fécondité (le nombre de vers juvéniles produits). Néanmoins, comme pour l'essai de détermination de l'ordre de grandeur, tous les autres signes de nocivité doivent être mentionnés dans le rapport final. Pour calculer les résultats de la reproduction, il faut connaître la moyenne arithmétique $\bar{x}$ et l'écart-type par traitement et par témoin afin d'effectuer l'analyse statistique.
44. Si l'on a pratiqué une analyse de la variance, l'écart-type, s , et les degrés de liberté, dl , peuvent être remplacés respectivement par l'estimation de la variance "fusionnée" obtenue par analyse de la variance (ANOVA) et par ses degrés de liberté, à condition que la variance ne dépende pas de la concentration. Dans ce cas, on utilisera les variances uniques des récipients témoins et traités. On calcule généralement ces valeurs à l'aide d'un logiciel statistique commercial, en utilisant les résultats par récipient comme des expériences identiques. Si la fusion des résultats relatifs aux témoins négatifs et au(x) témoin(s) contenant le solvant semble plus pertinente que de calculer les résultats de l'essai comparativement à l'un de ces deux témoins, il faudra vérifier à l'aide d'un test qu'ils ne présentent pas de différence significative (pour le test approprié, voir au paragraphe 47 et à l'Appendice 6).
45. Si les résultats des expériences identiques présentent une distribution normale et des variances homogènes, d'autres tests statistiques et déductions pourront être effectués.

Estimation de la CSEO

46. Il est préférable d'appliquer des tests puissants. Il faudrait savoir si les données ont une distribution à peu près normale, en se reportant, par exemple, aux expériences précédentes (essais tournants) ou à d'autres données antérieures. L'homogénéité de la variance est plus critique. On a constaté empiriquement que la variance s'accroît souvent lorsque la moyenne s'accroît. Dans ce cas, une transformation des données pourrait déboucher sur l'homogénéité de la variance. Néanmoins, cette transformation devrait s'appuyer sur des données antérieures plutôt que sur les données en cours d'étude. En présence de données homogènes, il faudrait recourir à des tests t de comparaison multiple, tels que le test de Williams ($\alpha = 0,05$, unilatéral) (21)(22), ou, dans certains cas, le test de Dunnett (23)(24). Remarquons que, dans le cas d'une reproduction inégale, les valeurs de t en tableau doivent être corrigées, comme l'ont suggéré Dunnett et Williams. En présence d'une variation importante, il peut arriver que la croissance ou la décroissance des résultats ne soit pas régulière. Avec un tel écart à la monotonie, le test de Dunnett est plus approprié. Si la variance n'est pas homogène, il peut être utile d'examiner de plus près les répercussions possibles sur la variance afin de déterminer si les tests t peuvent être appliqués sans perdre beaucoup en puissance (25). Sinon, un test U de comparaison multiple, par exemple

un test U de Bonferroni selon Holm (26), ou, si ces données présentent une variance hétérogène, mais concordent par ailleurs avec une relation dose-effet sous-jacente monotone, un autre test non paramétrique (par exemple un test de Jonckheere-Terpstra (27)(28) ou de Shirley (29)(30)) peuvent être appliqués et sont généralement préférables aux tests de t à variance inégale. (voir aussi le schéma exposé à l'Appendice 6).

47. Si un essai limite a été conduit et que les conditions requises pour les tests paramétriques (normalité, homogénéité) sont remplies, le test t de Student en paire peut être utilisé ou, sinon, le test U de Mann-Whitney (31).

Estimation de la CE_x

48. Pour calculer une quelconque valeur de CE_x , on utilise la moyenne par traitement dans l'analyse de la régression (linéaire ou non linéaire), après avoir obtenu une fonction dose-effet appropriée. S'agissant de la croissance des vers considérée comme une réponse continue, les valeurs de la CE_x peuvent être estimées à l'aide d'une analyse de la régression adéquate (32). Les fonctions appropriées aux résultats épousant une valeur de tout ou rien (mortalité/survie) et le nombre de descendants sont les fonctions sigmoïdes normales, logistiques ou de Weibull, à deux ou quatre paramètres, dont certaines peuvent aussi modéliser des réponses hormétiques. Si la fonction dose-effet a été ajustée par une analyse de la régression linéaire, il faudrait trouver un r^2 (coefficient de détermination) et/ou une pente appréciables avant d'estimer la CE_x en insérant une valeur correspondant à x % de la moyenne du témoin dans l'équation obtenue par l'analyse de la régression. Des limites de confiance à 95 % sont calculées selon la méthode de Fieller [mentionnée par Finney (18)] ou par une autre méthode récente appropriée.
49. Sinon, la réponse est modélisée comme un pourcentage ou une proportion du paramètre du modèle, paramètre qui est interprété comme le résultat moyen du témoin. Dans ce cas, la courbe sigmoïde normale (logistique, Weibull) peut souvent être facilement ajustée aux résultats à l'aide de la régression probit (18). Dans ce cas, la fonction de pondération doit être ajustée selon Christensen (33) pour les résultats métriques. Cependant, si on observe une hormèse, l'analyse probit doit être remplacée par une fonction logistique ou de Weibull à quatre paramètres, ajustée par une régression non linéaire (34). S'il est impossible d'ajuster une fonction dose-effet appropriée aux données, d'autres méthodes peuvent être utilisées pour estimer la CE_x et ses limites de confiance, telles que les moyennes mobiles d'après Thompson (19) et la méthode simplifiée de Spearman-Kärber (20).

RAPPORT D'ESSAI

50. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Substance chimique d'essai:

- description bien fondée de la substance chimique d'essai, lot de fabrication, lot de conditionnement, numéro CAS, pureté;
- propriétés de la substance chimique d'essai (par exemple, log K_{ow}, hydrosolubilité, pression de vapeur, constante de Henry (H) et données concernant son devenir et son comportement).

Organisme d'essai:

- animal d'expérience utilisé: espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage;
- âge, gamme de dimension (masse) des organismes d'expérience.

Conditions expérimentales:

- détails sur la préparation du sol d'essai;
- capacité maximale de rétention d'eau du sol;
- description de la méthode d'application de la substance chimique d'essai dans le sol;
- détails relatifs aux substances auxiliaires utilisées pour administrer la substance chimique d'essai;
- détails relatifs à l'étalonnage de l'appareil de pulvérisation, le cas échéant;
- description de la conception expérimentale et du mode opératoire;
- dimension des récipients expérimentaux et volume du sol d'essai;
- conditions expérimentales: intensité lumineuse, durée des cycles de lumière et d'obscurité, température;

- description du régime d'administration de la nourriture, nature et quantité de nourriture fournie au cours de l'essai, dates d'alimentation;
- pH et teneur en eau du sol au début et à la fin de l'essai.

Résultats de l'essai:

- mortalité adulte (%) dans chaque récipient expérimental, à la fin des quatre premières semaines de l'essai;
- masse totale des adultes au début de l'essai, dans chaque récipient expérimental;
- modification du poids corporel des adultes vivants (% du poids initial) dans chaque récipient expérimental, à l'issue des quatre premières semaines de l'essai;
- nombre de vers juvéniles produits dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai;
- description des effets évidents ou des symptômes pathologiques ou des changements nets de comportement;
- résultats obtenus avec la substance chimique de référence;
- CL_{50} , CSEO et/ou CE_x (par exemple CE_{50} , CE_{10}) pour la reproduction si certaines d'entre elles sont applicables avec des intervalles de confiance et représentation graphique du modèle ajusté utilisé pour leur calcul, toutes les informations et observations utiles à l'interprétation des résultats;
- courbe de la relation dose-effet;
- résultats obtenus avec chaque récipient.

Écarts par rapport aux procédures décrites dans la présente méthode d'essai et faits inhabituels survenus au cours de l'essai.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Jaenicke, J. (1982). "*Eisenia foetida*" is two biological species. *Megadrilogica* 4, 6-8.
- (2) Oien, N and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm — III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. *Comp. Biochem. Physiol.* 78c (2), 277 — 282.
- (3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* — comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. *Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem*, 320, p. 50-82.
- (4) Chapitre C.8. de la présente annexe, Toxicité pour les vers de terre.
- (5) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1996). Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction, N°11268-2. ISO, Genève.
- (6) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1993). Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) Partie 1: Détermination de la toxicité aiguë en utilisant des substrats de sol artificiel, N°11268-1. ISO, Genève.
- (7) SETAC (1998). *Advances in Earthworm Ecotoxicology*. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M. and Posthuma, L. (Eds). SETAC Press, 456 pages.
- (8) EPA (1996). *Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00)*. United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, avril 1996.
- (9) Bouché, M.B. (1972). *Lombriciens de France, Écologie et systématique*. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.
- (10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714EN, Commission of European Communities.
- (11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). *Ecotoxicology of Earthworms*. Intercept.

- (12) Edwards, C.A. and Bohlen, J.P. (1996). *Biology and ecology of Earthworms*, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.
- (13) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1994). *Qualité du sol — Détermination du pH*. n° 10390. ISO, Genève.
- (14) Hund-Rinke, K, Römcke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: *Toxikologische Beurteilung von Böden*. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (15) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1992). *Qualité du sol — Détermination de la caractéristique de la rétention en eau — Méthodes de laboratoire*, N°11274. ISO, Genève.
- (16) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1993). *Qualité du sol — Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau — Méthode gravimétrique*, N°11465. ISO, Genève.
- (17) Römcke, J. and Moser, Th. (1999). *Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test*. UBA-Texte 4/99, 150+223 pp.
- (18) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis* (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (19) Finney, D.J. (1978). *Statistical method in Biological Assay*. Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; Correction *Environ. Sci. Technol.* 12(1998), 417.
- (21) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, 103-117.
- (22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, 519-531.
- (23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- (24) Dunnett, C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20, 482-491.
- (25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? *Ecotoxicology* 7: 355-361.
- (26) Holm, S., (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- (27) Jonckheere, A.R. (1954). A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, *Biometrika* 41, 133-145.
- (28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, *Indagationes Math.* 14, 327-333.
- (29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, *Applied Statistics* 28, 144-151.
- (30) Williams, D.A. (1986). A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, *Biometrics* 42, 183-186.
- (31) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). *Biometry. The principle and practice of statistics in biological research*. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- (32) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 1485-1494.
- (33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18, 213-221.
- (34) Van Ewijk, P.H. and Hoekstra, J.A., (1993). (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. *Ecotox, Environ. Safety.* 25, 25-32.

Appendice 1

Définitions

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai:

Substance chimique: une substance ou un mélange.

CE_x (concentration efficace à x %): concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'expérience durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, la CE₅₀ est la concentration estimée causer un effet déterminé sur 50 % d'une population exposée durant une période définie. Dans cet essai, les concentrations efficaces sont exprimées en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental ou en masse de substance chimique d'essai par unité de superficie du sol.

CL₀ (concentration non létale): désigne la concentration d'une substance chimique d'essai qui ne tue aucun des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL₀ s'exprime en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental.

CL₅₀ (concentration létale moyenne): concentration d'une substance chimique d'essai qui entraîne la mort de 50 % des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL₅₀ s'exprime en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental ou en masse de substance chimique d'essai par unité de superficie du sol.

CL₁₀₀ (concentration totalement létale): concentration d'une substance chimique d'essai qui entraîne la mort de 100 % des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL₁₀₀ s'exprime en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental.

CMEO (concentration minimale avec effet observé): désigne la plus faible concentration de la substance chimique d'essai qui exerce un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$). Dans cet essai, la CMEO s'exprime en masse de substance chimique d'essai par masse sèche de sol expérimental ou en masse de substance chimique d'essai par unité de superficie du sol. Toutes les concentrations expérimentales supérieures à la CMEO doivent normalement produire un effet statistiquement différent du résultat observé sur le témoin. Tous les écarts à ce qui précède dans la détermination de la CMEO doivent être justifiés dans le rapport d'essai.

CSEO (concentration sans effet observé): désigne la plus haute concentration de la substance chimique d'essai directement inférieure à la CMEO et à laquelle aucun effet n'est observé. Dans cet essai, la CSEO n'a pas d'effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

Taux de reproduction: le taux de reproduction est le rapport du nombre moyen de vers juvéniles engendrés durant la période de l'essai par le nombre d'adultes.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Appendice 2

Détermination de la capacité maximale de rétention d'eau du sol

La méthode suivante pour déterminer la capacité maximale de rétention d'eau du sol a fait ses preuves. Elle est décrite à l'annexe C de la norme ISO DIS 11268-2 (1).

Prélevez une quantité déterminée (5 g, par exemple) du sol expérimental servant de substrat à l'aide d'un instrument approprié (tarière, etc.). Couvrez le fond de la tarière avec un morceau de papier filtre et, après l'avoir remplie d'eau, placez-la sur un support dans un bain d'eau. La tarière doit être progressivement submergée jusqu'à ce que le niveau d'eau dépasse le sommet de la carotte de sol. Laissez la tarière dans l'eau durant environ trois heures. Comme l'eau absorbée par les capillaires du sol ne peut pas être retenue en totalité, laissez l'échantillon de sol dégorger durant deux heures, en plaçant le tube sur un lit de sable quartzique fin très humide contenu dans un récipient fermé (pour empêcher le séchage). Pesez l'échantillon et séchez-le à 105 °C jusqu'à ce qu'il atteigne une masse constante. La capacité de rétention d'eau (CRE) se calcule comme suit:

$$\text{CRE (en \% de masse sèche)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

où:

S = masse du substrat saturé en eau + masse de la tarière + masse du papier filtre

T = tare (masse de la tarière + masse du papier filtre)

D = masse sèche du substrat

RÉFÉRENCE:

- 1). ISO (Organisation internationale de normalisation) (1996). Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction, N°11268-2. ISO, Genève.

*Appendice 3***Détermination du pH du sol**

La méthode de détermination du pH d'un échantillon de sol, décrite ci-dessous, s'appuie sur la norme ISO 10390 (Qualité du sol — Détermination du pH) (1).

Laissez sécher une quantité définie de sol à température ambiante durant au moins 12 heures. Confectionnez une suspension du sol (contenant au moins 5 g de sol) dans cinq fois son volume soit d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M de qualité pour analyse, soit d'une solution de chlorure de calcium (CaCl_2) 0,01 M de qualité pour analyse. Agitez énergiquement la suspension durant cinq minutes. Laissez reposer la suspension durant au moins deux heures, mais pas plus de 24 heures. Mesurez le pH de la phase liquide à l'aide d'un pH-mètre, étalonné avant chaque mesure avec une série appropriée de solutions tampons (pH 4,0 et 7,0, par exemple).

RÉFÉRENCE:

- 1). ISO (Organisation internationale de normalisation) (1994). Qualité du sol — Détermination du pH. n° 10390. ISO, Genève.

Appendice 4

Élevage d'*eisenia fetida*/Eisenia andrei

Il est préférable d'élever ces espèces dans un local climatisé à $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. À cette température et à condition d'être suffisamment nourris, les vers atteignent leur maturité au bout de 2 à 3 mois.

Ces deux espèces peuvent être élevées dans des déchets animaux très divers. Le milieu de culture recommandé est un mélange 50/50 de crottin de cheval ou de bouse de vache et de tourbe. Il faudra s'assurer que les vaches ou les chevaux dont on recueille les déjections ne font pas l'objet d'un traitement vétérinaire avec des substances telles que des activateurs de croissance, des nématicides ou des produits analogues, susceptibles d'être nocives pour les vers durant l'essai. Il est recommandé de récolter soi-même les déjections dans un élevage de l'agriculture biologique, l'expérience ayant démontré que les déjections vendues dans le commerce comme engrais de jardin risquent d'être nocives pour les vers. Le milieu devrait avoir un pH d'environ 6 à 7 (ajusté avec du carbonate de calcium), une faible conductivité ionique (une concentration de sels inférieure à 0,5 % ou à 6 mg) et ne devrait pas être trop contaminé par de l'ammoniac ou des urines animales. Le substrat doit être humide, mais pas engorgé. Des boîtes d'élevage d'une capacité de 10 à 50 litres conviennent.

Pour obtenir une population de vers homogène quant à l'âge et à la taille (masse), il vaut mieux commencer la culture avec des cocons. Une fois que la culture a été lancée, on la poursuit en transférant les vers adultes dans une boîte d'élevage garnie d'un substrat neuf et en les y laissant durant 14 à 28 jours pour leur permettre d'engendrer de nouveaux cocons. Les adultes sont ensuite enlevés et les juvéniles issus des cocons utilisés comme population de départ pour la prochaine culture. Les vers sont nourris en continu avec des déchets animaux et transférés de temps en temps dans un substrat neuf. On a constaté que les flocons d'avoine, du crottin de cheval ou de la bouse de vache séchés à l'air et finement broyés constituent une alimentation appropriée. Il faudra vérifier que les vaches ou les chevaux dont proviennent les déjections ne sont pas traités par des médicaments vétérinaires tels que des activateurs de croissance, susceptibles d'être nocifs pour les vers durant la culture à long terme. Les vers éclos des cocons sont utilisés dans l'essai dès qu'ils sont âgés de 2 à 12 mois et considérés comme adultes.

Les vers peuvent être considérés comme sains s'ils se déplacent dans le substrat, ne tentent pas de s'en échapper et se reproduisent continuellement. L'épuisement du substrat est révélé par le fait que les vers se déplacent très lentement et présentent une extrémité postérieure jaune. Dans ce cas, il est recommandé de renouveler le substrat et/ou de diminuer la densité de peuplement des boîtes.

Appendice 5

Techniques de comptage des vers juvéniles éclos des cocons

Le tri manuel des vers présents dans le substrat exigeant un temps considérable, deux autres méthodes sont recommandées:

- a) Les récipients expérimentaux sont déposés dans un bain d'eau, dont la température initiale de 40 °C est portée à 60 °C. Après une vingtaine de minutes, les vers juvéniles devraient apparaître à la surface du sol, d'où il est facile de les enlever et de les compter.
- b) Le sol d'essai peut être rincé à travers un tamis selon la méthode mise au point par Van Gestel et al. (1), à condition que la tourbe et les déjections ou les flocons d'avoine ajoutés au sol aient été moulus en poudre fine. Deux tamis dont les mailles mesurent 0,5 mm (diamètre 30 cm) sont placés l'un au-dessus de l'autre. Le contenu du récipient expérimental est versé sur un tamis sous un puissant jet d'eau du robinet, de façon à retenir la majorité des jeunes vers et des cocons dans le tamis supérieur. Il importe de noter que toute la surface du tamis supérieur doit rester mouillée durant cette opération de façon que les vers juvéniles flottent sur un film d'eau, ce qui les empêche de se faufiler à travers les mailles du tamis. On obtient le meilleur résultat avec une pomme de douche.

Dès que la totalité du substrat est passée à travers le tamis, le tamis supérieur peut être rincé au-dessus d'un bol de façon à y recueillir les juvéniles et les cocons. On laisse reposer le contenu du bol jusqu'à ce que les cocons vides flottent à la surface et les cocons pleins ainsi que les juvéniles tombent au fond. Après quoi, l'eau du bol est vidée et les jeunes vers et les cocons sont transférés dans une boîte de Petri contenant un peu d'eau. On peut alors compter les vers en les enlevant à l'aide d'une aiguille ou d'une pince.

L'expérience a montré que la méthode a) convient mieux à l'extraction des vers juvéniles, susceptibles de passer à travers les mailles, même avec une ouverture de 0,5 mm.

L'efficacité de la méthode employée pour extraire les vers (et les cocons, le cas échéant) du sol devrait toujours être déterminée. Si les vers juvéniles sont enlevés par tri manuel, on conseille de répéter l'opération une fois sur tous les échantillons.

RÉFÉRENCE:

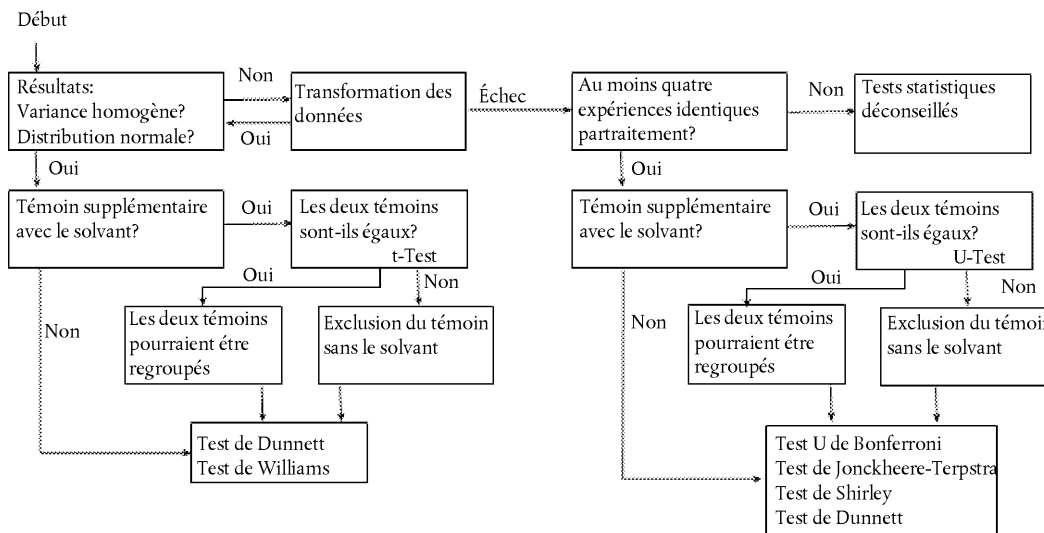
- (1) Van Gestel, C.A.M., van Dis, W.A., van Breemen, E.M., Sparenburg, P.M. (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32: 367-371.

Appendice 6

Description schématique de l'évaluation statistique des résultats (détermination de la CSEO)

Tests paramétriques

Tests non paramétriques



**C.34. DÉTERMINATION DE L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ DES BACTÉRIES ANAÉROBIES —
RÉDUCTION DE LA PRODUCTION DE GAZ PAR UNE BOUE (D'EAUX USÉES) À DIGESTION
ANAÉROBIE**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 224 (2007) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les produits chimiques rejetés dans l'environnement aquatique traversent des zones aérobies et des zones anaérobies, dans lesquelles ils peuvent être dégradés et/ou ils peuvent inhiber l'activité bactérienne; dans certains cas, ils peuvent demeurer dans des zones anaérobies pendant des décennies ou des durées plus longues sans perturbation aucune. Lors du traitement des eaux usées, la première étape, la décantation primaire, est aérobie dans le liquide surnageant et anaérobie dans les boues sous-nageantes. Ensuite, l'étape secondaire fait intervenir une zone aérobie dans le bassin d'aération à boues activées et une zone anaérobie dans la boue sous-nageante dans le bassin de décantation secondaire. Les boues issues de ces deux étapes sont généralement soumises à un traitement anaérobie, et produisent alors du méthane et du dioxyde de carbone habituellement utilisés en production d'électricité. Dans les milieux moins confinés, les produits chimiques qui rejoignent les sédiments dans les baies, les estuaires et la mer ont toutes les chances de rester dans ces zones anaérobies indéfiniment s'ils ne sont pas biodégradables. Certaines propriétés physiques telles qu'une médiocre solubilité dans l'eau, une capacité d'adsorption élevée sur les solides en suspension, ou une inaptitude à la biodégradation aérobie permettront à quelques produits chimiques d'atteindre ces zones en proportions plus importantes.
2. Il est préférable que les produits chimiques rejetés dans l'environnement soient biodégradables en conditions anaérobies et aérobies, mais il est également essentiel qu'ils n'inhibent pas l'activité des microorganismes dans l'une ou l'autre zone. Au Royaume-Uni, quelques cas d'inhibition complète de la production de méthane due, par exemple, au pentachlorophénol présent dans les décharges industrielles, ont été signalés, qui ont engendré des frais considérables de transport des boues inhibées depuis les digesteurs vers des sites "sûrs" et d'importation de boue de digestion non contaminée en provenance d'installations proches. Il existe toutefois de nombreux cas d'interruption moins drastiques de la digestion par plusieurs autres produits chimiques, notamment des hydrocarbures aliphatiques halogénés (nettoyage à sec) et des détergents, qui nuisent gravement à l'efficacité des digesteurs.
3. Seule la méthode d'essai C.11 (1) traite de l'inhibition de l'activité bactérienne (Respiration de boues activées), et évalue l'effet de substances chimiques d'essais sur la vitesse d'absorption de l'oxygène en présence de substrat. La méthode a été largement utilisée en guise d'alerte précoce d'effets potentiellement nocifs de produits chimiques sur le traitement aérobie des eaux usées, ainsi que pour déterminer les concentrations non inhibitrices des substances chimiques d'essai susceptibles d'être utilisées dans les divers essais de biodégradabilité. La méthode d'essai C.43 (2) permet de déterminer dans une certaine mesure la toxicité d'une substance chimique d'essai sur la production de gaz par une boue anaérobie, diluée dix fois par rapport à sa concentration normale de solides afin d'obtenir la précision requise dans l'évaluation du pourcentage de biodégradation. Les boues diluées étant parfois plus sensibles aux substances inhibitrices, le groupe ISO a décidé de mettre au point une méthode employant une boue non diluée. Trois textes au moins ont été examinés (issus du Danemark, de l'Allemagne et du Royaume-Uni), pour aboutir finalement à la mise au point de deux normes ISO, l'une employant une boue non diluée, ISO 13 641-1 (3) et l'autre une boue diluée cent fois, ISO 13 641-2 (4), dans l'objectif de représenter les vases et les sédiments à faibles populations bactériennes. Les deux méthodes ont été soumises à un essai tournant (5); la première a été reconnue comme une norme acceptable, mais la seconde n'a pu faire l'objet d'un accord. Le Royaume-Uni a considéré que la proportion importante de participants signalant une production de gaz très faible ou nulle, en partie parce que la proportion de l'espace gazeux était trop élevée (75 %) pour une sensibilité optimale, appelait à un nouvel examen de la méthode.
4. Des travaux préliminaires menés au Royaume-Uni (6)(7) font état d'une méthode manométrique sur boue de digestion non diluée additionnée de boue d'eaux usées à titre de substrat, dans des récipients de 500 ml; l'appareil était encombrant et l'odeur de la boue brute nauséabonde. Par la suite, l'appareil plus compact et plus pratique de Shelton et Tiedje (8), amélioré par Battersby et Wilson (9) a été exploité avec succès par Wilson et al. (10). Kawahara et al (11) sont parvenus à préparer des boues plus homogènes au laboratoire, pour les utiliser dans des essais de biodégradabilité anaérobie et d'inhibition sur plusieurs produits chimiques. De surcroît, le substrat de boue brute a été remplacé afin de procéder à l'essai avec une boue anaérobie diluée cent fois ou avec des vases, des sédiments, etc., à faible activité bactérienne.
5. Cette méthode permet d'obtenir des informations utiles pour prédire l'effet probable d'une substance chimique d'essai sur la production de gaz dans des digesteurs anaérobies. Toutefois, seuls des essais plus longs qui simulent plus rigoureusement le fonctionnement de digesteurs sont capables d'indiquer si les microorganismes peuvent s'adapter à la substance chimique d'essai ou si ces substances susceptibles d'être absorbées ou adsorbées sur les boues peuvent s'accumuler jusqu'à atteindre une concentration toxique, sur une période plus longue que celle testée dans cet essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Des fractions aliquotes d'un mélange de boue à digestion anaérobie (20 g/l à 40 g/l de matières solides totales) et d'une solution de substrat dégradable sont incubées seules et, en parallèle, avec la substance chimique d'essai en quantités comprises dans un intervalle de concentrations, dans des récipients scellés, pendant une durée pouvant atteindre trois jours. La quantité de gaz produits (méthane plus dioxyde de carbone) est mesurée par l'augmentation de la pression (Pa) dans les flacons. Les pourcentages d'inhibition de la production de gaz attribuables aux diverses concentrations de la substance chimique d'essai sont calculés à partir des quantités produites dans les flacons d'essai et témoins respectifs. La CE_{50} et d'autres concentrations efficaces sont calculées à partir des courbes du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des substances chimiques d'essai, ou, le plus souvent, de son logarithme.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

7. Les substances chimiques d'essai sont habituellement utilisées sous la forme la plus pure facilement accessible, car les impuretés contenues dans certaines substances chimiques, par exemple, les chlorophénols, sont parfois plus toxiques que la substance d'essai elle-même. Il peut toutefois se révéler utile de tester les substances chimiques sous la forme dans laquelle elles sont produites ou commercialisées. L'utilisation en routine de produits formulés est déconseillée, mais convient parfois pour les substances chimiques d'essais de solubilité médiocre. Il convient de connaître les propriétés suivantes de la substance chimique d'essai: solubilité dans l'eau et dans certains solvants organiques, pression de vapeur, coefficient d'adsorption, hydrolyse et biodégradabilité en conditions anaérobies.

CHAMP D'APPLICATION DE LA METHODE

8. Cet essai s'applique à des substances solubles ou insolubles dans l'eau, y compris les substances volatiles. Toutefois, des précautions particulières sont indispensables avec les matériaux à faible solubilité dans l'eau [voir réf. (12)] et à volatilité élevée. Il est également possible d'utiliser des inoculums provenant d'autres sites anaérobies, par exemple, vases, sols saturés et sédiments. Les systèmes bactériens anaérobies préalablement exposés à des substances toxiques peuvent être adaptés de façon à ce que leur activité soit maintenue en présence de produits chimiques xénobiotiques. Les inoculums issus de systèmes bactériens adaptés font parfois preuve d'une tolérance plus élevée aux substances chimiques d'essais que des inoculums obtenus à partir de systèmes non adaptés.

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

9. Pour vérifier le mode opératoire, on teste une substance chimique de référence parallèlement à la substance d'essai dans des récipients appropriés en suivant le même protocole; le 3,5-dichlorophénol s'est révélé un inhibiteur type de la production de gaz anaérobie, ainsi que de la consommation d'oxygène par les boues activées et d'autres réactions biochimiques. Deux autres produits chimiques présentent une capacité d'inhibition plus élevée que celle du 3,5-dichlorophénol sur la production de méthane, le bis-thiocyanate de méthylène et le pentachlorophénol, mais les résultats les concernant n'ont pas encore été validés. Le pentachlorophénol n'est pas recommandé, car il est difficile à obtenir sous forme pure.

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS

10. Dans un essai tournant international (5), une reproductibilité seulement moyenne a été relevée entre les valeurs de CE_{50} de 10 laboratoires participants pour le 3,5-dichlorophénol et d'acide 2-bromo-éthane-sulfonique (l'intervalle pour le premier allait de 32 mg/l à 502 mg/l et pour le second de 220-2 190 mg/l.)

Nombre de laboratoires	En mg/l			En mg/g de boue		
	moyenne	e.t.	cv(%)	moyenne	e.t.	cv(%)
	3, 5-Dichlorophénol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	Acide 2-bromo-éthane-sulfonique					
10	1 058	896	85	34	26	76

Données CE_{50} de l'essai tournant — boue non diluée

11. Les coefficients de variations élevés entre les laboratoires s'expliquent dans une large mesure par des différences de sensibilité des microorganismes des boues qui ont été ou non préalablement exposés à la substance chimique d'essai ou à d'autres substances de même nature chimique. La précision de la détermination de la valeur de CE_{50} en fonction de la concentration de boue était à peine meilleure que celle de la valeur "volumétrique" (mg/l). Dans les trois laboratoires ayant indiqué la précision de leur valeur de CE_{50} pour le 3,5-dichlorophénol, les coefficients de variation étaient nettement inférieurs (22, 9 et 18 % respectivement pour la CE_{50} en mg/g) que ceux des moyennes des dix laboratoires réunies. Les moyennes individuelles des trois laboratoires s'élevaient à 3,1; 3,2 et 2,8 mg/g, respectivement. Les coefficients de variation plus faibles et acceptables au sein d'un même laboratoire, comparés aux coefficients beaucoup plus élevés entre les valeurs des laboratoires, c'est-à-dire 9-22 % cf. 92 %, révèlent des différences significatives entre les propriétés des boues individuelles.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

12. L'utilisation de matériel courant de laboratoire et des équipement suivants est requise:

- a) Incubateur — anti-étincelles et thermostaté à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;
- b) Récipients expérimentaux en verre résistant à la pression d'une capacité nominale appropriée ⁽¹⁾, munis d'un septum étanche au gaz, capable de supporter une pression d'environ 2 bars ou 2×10^5 Pa (le revêtement utilisé sera, par exemple du PTFE = polytétrafluoréthylène). L'utilisation de flacons à sérum en verre d'un volume nominal de 125 ml, et d'un volume réel d'environ 160 ml, obturé par des septum ⁽²⁾ adaptés aux flacons à sérum et des capsules en aluminium serties est recommandée; il est également possible d'utiliser des flacons d'un volume total compris entre 0.1 et 1 litre;

- c) Manomètre de précision ⁽³⁾ et aiguilles fixées

La production totale de gaz (méthane plus dioxyde de carbone) est mesurée à l'aide d'un manomètre capable de mesurer et d'évacuer les gaz produits, par exemple, un manomètre de précision manuel relié à une aiguille de seringue; un robinet à trois voies étanche aux gaz permet la libération de la pression excédentaire (Appendice 1). Le volume interne des tuyaux et du robinet du transducteur de pression doit être aussi faible que possible, de telle sorte que les erreurs introduites en négligeant le volume de l'appareillage restent insignifiantes;

- d) Récipients isolés, pour le transport des boues de digestion;

- e) Robinet à pression trois voies;

- f) Tamis, avec une ouverture de maille de 1 mm;

- g) Réservoir, pour la boue de digestion, flacon en verre ou en polyéthylène haute densité, d'un volume d'environ 5 litres, muni d'un agitateur et d'un dispositif permettant le passage d'un courant d'azote gazeux (voir paragraphe 13) dans l'espace libre;

- h) filtres membranaires (0,2 μm) pour stériliser le substrat;

⁽¹⁾ La capacité préconisée est comprise entre 0,1 et 1 litre.

⁽²⁾ Il est recommandé d'utiliser des septums en silicone étanche au gaz et de vérifier l'étanchéité au gaz des bouchons, en particulier les septums en caoutchouc butylique, car plusieurs types de septum vendus dans le commerce ne sont pas suffisamment étanches au méthane et certains ne sont plus étanches une fois qu'ils ont été percés par une aiguille dans les conditions de l'essai.

— Les septums revêtus étanches au gaz sont recommandés et doivent être utilisés pour les substances volatiles (certains septum du commerce sont relativement minces, d'une épaisseur inférieure à 0,5 cm, et ne sont plus étanches après avoir été percés par une aiguille de seringue).

— Les septums en caoutchouc butylique (environ 1 cm) sont recommandés, si les substances d'essai ne sont pas volatiles (ils sont normalement toujours étanches au gaz après avoir été percés).

— Il est conseillé de vérifier soigneusement avant le test que les septum restent étanches au gaz après avoir été percés.

⁽³⁾ Le manomètre doit être utilisé et étalonné régulièrement, conformément aux instructions du fabricant. Si l'on utilise un manomètre de la qualité prescrite, par exemple encapsulé avec une membrane en acier, il n'est pas nécessaire de l'étalonner au laboratoire, mais cette opération sera effectuée par un institut autorisé aux intervalles recommandés. L'exactitude de l'étalonnage peut être vérifiée au laboratoire par une mesure unique à 1×10^5 Pa sur un manomètre à affichage mécanique. Une mesure correcte de ce point assure que la linéarité n'a pas non plus changée. Lorsque l'on utilise d'autres dispositifs de mesure (sans étalonnage certifié par le fabricant), il est recommandé de procéder à une reconversion sur l'intervalle total à intervalles réguliers (Appendice 2).

- i) micro-seringues, pour la connexion étanche au gaz du transducteur de pression [voir paragraphe 12(c)] à l'espace libre des bouteilles [voir paragraphe 12(b)]; elles servent également à ajouter les matériaux d'essai liquides dans les flacons;
- j) boîte à gants, en option, mais recommandée, avec une pression d'azote légèrement positive.

Réactifs

13. Des réactifs de qualité analytique sont utilisés dans tout l'essai. Il faut toujours utiliser de l'azote gazeux très pur avec une concentration d'oxygène inférieure à 5 µM.

Eau

14. Si une dilution s'avère nécessaire à quelque étape que ce soit, il convient d'utiliser de l'eau désionisée préalablement désaérée. Il n'est pas indispensable de contrôler analytiquement cette eau, mais plutôt de s'assurer que l'appareil de désionisation est régulièrement entretenu. Les solutions mères doivent également être préparées avec de l'eau désionisée. On s'assurera que toutes les solutions ou les dilutions du matériel d'essai sont exemptes d'oxygène avant d'y ajouter l'inoculum anaérobie. Cette absence peut se vérifier par soufflage d'azote gazeux dans l'eau de dilution (ou dans les dilutions) une heure avant l'addition de l'inoculum, ou bien en chauffant l'eau de dilution jusqu'à son point d'ébullition et en la refroidissant à température ambiante dans une atmosphère sans oxygène.

Boue digérée

15. Les boues de digestion activées sont prélevées dans un digesteur de station d'épuration d'eaux usées, ou bien dans un digesteur de laboratoire, affecté au traitement de boues principalement dérivées d'eaux usées domestiques. Les informations pratiques concernant les boues de digesteurs de laboratoire sont disponibles dans d'autres références (11). S'il est prévu d'utiliser un inoculum adapté, il faudra peut-être envisager de prélever une boue de digestion dans une station d'épuration d'effluents industriels. Pour récolter ces boues, il est préférable d'utiliser des flacons à large ouverture en polyéthylène haute densité ou un matériau similaire, capables de se dilater. Remplir ces flacons de boue jusqu'à environ 1 cm de leur embouchure et les fermer hermétiquement, de préférence avec une soupape de sécurité [paragraphe 12 (e)], et les placer dans des réceptacles isolés [paragraphe 12 (d)] pour réduire au minimum le choc thermique, jusqu'à leur transfert dans un incubateur maintenu à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. À l'ouverture des flacons, prendre soin de relâcher la pression de gaz en excès en ouvrant avec précaution le bouchon, ou grâce au robinet de libération de la pression trois voies (paragraphe 12 (e)). Il est préférable d'utiliser la boue dans les quelques heures qui suivent sa récolte ou bien de la conserver à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ sous un espace libre rempli d'azote pendant une durée inférieure à 3 jours, dans le cas où la perte d'activité normale est faible.

Avertissement — Les boues de digestion présentent des risques d'incendie ou d'explosion à cause des gaz inflammables qu'elles dégagent: elles renferment également des organismes potentiellement pathogènes, de sorte que ces boues sont à manipuler avec prudence. Pour des raisons de sécurité, il n'est pas conseillé de recueillir les boues dans des récipients en verre.

Inoculum

16. Immédiatement avant son utilisation, mélanger la boue par agitation douce et la faire passer sur un tamis à mailles de 1 mm² [paragraphe 12(f)] avant de l'introduire dans un flacon approprié [paragraphe 12(g)] en la faisant traverser l'espace vide balayé par un courant d'azote. Prélever un échantillon pour la mesure de la concentration des matières solides sèches totales (voir, par exemple, la norme ISO 11 923 (13) ou la norme UE équivalente). En général, la boue est utilisée sans dilution. La concentration de solides est généralement comprise entre 2 % et 4 % (p/v). Contrôler la valeur du pH de la boue et l'ajuster, s'il y a lieu, à 7 ± 0.5 .

Substrat d'essai

17. Dissoudre 10 g de bouillon nutritif (par exemple Oxoid), 10 g d'extrait de levure et 10 g de D-glucose dans de l'eau désionisée et diluer à 100 ml. Stériliser par filtration sur un filtre membranaire de 0,2 µm [paragraphe 12 (h)] et utiliser immédiatement ou conserver à 4 °C pendant 1 jour au maximum.

Substance chimique d'essai

18. Préparer une solution mère séparée de chaque substance chimique d'essai hydrosoluble de sorte qu'elle contienne, par exemple, 10 g/l de la substance dans de l'eau de dilution sans oxygène (paragraphe 14). Utiliser des volumes appropriés de ces solutions mères pour préparer des mélanges réactionnels de concentrations croissantes. Il est également possible de préparer des dilutions en série de chaque solution mère afin d'ajouter un volume identique dans chaque flacon d'essai pour chaque concentration finale requise. Le pH des solutions mères est ajusté à 7 ± 0.2 , s'il y a lieu.

19. Pour les substances chimiques d'essai insuffisamment solubles dans l'eau, se reporter à la norme ISO 10 634 (12) ou à la norme UE équivalente. Lorsqu'il faut utiliser un solvant organique, il convient d'éviter l'emploi de solvants tels que le chloroforme, et le tétrachlorure de carbone dont le puissant effet d'inhibition de la production de méthane est notoire. Préparer une solution de concentration appropriée de substance insoluble dans l'eau dans un solvant volatil adapté, par exemple, l'acétone ou l'éther diéthylique. Ajouter des volumes nécessaires de solution de solvant aux flacons d'essai vides (paragraphe 12(b)) et évaporer le solvant avant l'addition de la boue. Pour d'autres traitements, consulter la norme ISO 10 634 (12) ou la norme UE équivalente en gardant à l'esprit que tout tensioactif utilisé pour produire des émulsions peut inhiber la production de gaz anaérobie. Si l'on estime que la présence de solvants organiques et d'agents émulsifiants est susceptible d'engendrer des artefacts, la substance chimique d'essai peut être directement ajoutée au mélange d'essai sous forme d'une poudre ou d'un liquide. Il est possible d'injecter les substances volatiles et les substances chimiques d'essai liquides insolubles dans l'eau dans les flacons de sérum inoculé à l'aide de micro-seringues [paragraphe 12(i)].
20. Ajouter les substances chimiques d'essai aux flacons afin d'obtenir une série géométrique de concentrations, par exemple, 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l, et 15,6 mg/l. Lorsque l'intervalle de toxicité n'est pas prévisible en se basant sur des substances similaires, il convient de réaliser tout d'abord un essai préliminaire de détermination de l'intervalle de toxicité approprié sur des concentrations de 1 000 mg/l, 100 mg/l et 10 mg/l.

Substance chimique de référence

21. Préparer une solution aqueuse de 3,5-dichlorophénol (10 g/l) en ajoutant progressivement la quantité minimale de 5 mol/l de solution d'hydroxyde de sodium au solide, sous agitation, jusqu'à dissolution. Ajouter ensuite de l'eau de dilution désaérée (paragraphe 14) pour ajuster le volume requis; une sonication peut favoriser la dissolution. D'autres substances de référence peuvent être utilisées lorsque l'intervalle moyen de la CE_{50} a été obtenu dans au moins trois tests employant des inoculums différents (sources différentes ou dates de récolte différentes).

INTERFÉRENCE/ERREURS

22. Il est vraisemblable que certains des constituants de la boue réagissent avec des inhibiteurs potentiels, ce qui annulera leurs effets sur les micro-organismes, avec pour résultat une inhibition plus faible, voir nulle. En outre, si la boue contient déjà une substance inhibitrice, l'essai avec la substance donnera des résultats erronés. Ces exemples, et de nombreux autres facteurs identifiés, peuvent produire de faux résultats. Ils sont indiqués dans l'Appendice 3, conjointement à des méthodes permettant d'éliminer ou au moins de réduire les erreurs.

MODE OPÉRATOIRE

23. Le nombre de répétitions requis dépend du degré de précision exigé pour les indices d'inhibition. Si les bouchons des flacons sont suffisamment étanches aux gaz pendant la durée du test, ne préparer qu'un seul lot (au moins trois répétitions) de flacons d'essai à chaque concentration requise. En parallèle, préparer un lot de flacons avec la substance chimique de référence et un ensemble de témoins. Toutefois, lorsque la fiabilité des bouchons des flacons n'est assurée que pour une ou quelques percées, préparer un lot (par exemple trois répétitions) des flacons d'essai pour chaque intervalle de temps (t) auquel sont requis les résultats à toutes les concentrations d'une substance chimique chimique d'essai. Parallèlement, préparer des lots 't' de flacons équivalents pour la substance chimique de référence et les témoins.
24. L'utilisation d'une boîte à gants [paragraphe 12 j)] est recommandée. Au moins 30 minutes avant le début de l'essai, faire passer un courant d'azote à travers la boîte à gants contenant tout l'équipement nécessaire. S'assurer que la température de la boîte est $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ pendant la manipulation et la fermeture hermétique des flacons.

Essai préliminaire

25. Lorsque l'activité de la boue est inconnue, il est recommandé de procéder à un essai préliminaire. Préparer des témoins dont les concentrations de matières solides s'élèvent à 10 g/l, 20 g/l et 40 g/l, par exemple, additionnés de substrat, mais sans substance d'essai. Utiliser également différents volumes de mélange réactionnel afin de disposer de trois ou quatre rapports entre volume d'espace libre et volume de liquide. On choisira parmi les résultats de volumes de gaz produits à divers intervalles de temps les conditions les mieux appropriées à l'obtention de deux mesures quotidiennes caractérisées par des volumes significatifs de gaz et une libération de pression par jour avec une sensibilité optimale ⁽¹⁾ sans risque d'explosion.

⁽¹⁾ Ceci s'applique au modèle expérimental et aux conditions expérimentales dans lesquels les volumes de gaz produits — par les témoins à blanc et les récipients indiquant une inhibition de 70-80 % — peuvent être estimés avec des marges d'erreurs acceptables.

Addition des substances chimiques d'essai

26. Ajouter les substances chimiques d'essai hydrosolubles aux flacons d'essai vides [paragraphe 12(b)] sous forme de solutions aqueuses (paragraphe 18). Utiliser des lots de flacons comportant au moins trois répétitions pour chaque concentration de l'intervalle (paragraphe 20). Lorsque les substances chimiques d'essai sont insolubles ou médiocrement solubles, les injecter en solution dans des solvants organiques à l'aide d'une micro-seringue dans les flacons vides pour préparer des lots de répétition des cinq concentrations de substance d'essai. Évaporer le solvant par purge à l'aide d'un jet d'azote gazeux sur la surface des solutions dans les flacons d'essai. Il est également possible d'ajouter des quantités pesées des produits chimiques insolubles solides directement dans les flacons d'essai.
27. Les substances chimiques d'essai liquides insolubles et médiocrement solubles dans l'eau ajoutées sans solvant sont introduites directement par une micro-seringue dans les flacons d'essai après addition de l'inoculum et du substrat d'essai (voir paragraphe 30). Cette technique peut également s'appliquer aux substances d'essai volatiles.

Addition d'inoculum et de substrat

28. Agiter un volume approprié de boue de digestion tamisée (voir paragraphe 16) dans un flacon de 5 litres [paragraphe 12 (g)], en faisant passer un courant d'azote dans l'espace vide. Purger les flacons d'essai, qui contiennent les solutions aqueuses ou les solutions dans un solvant évaporé de substances d'essai, avec un courant d'azote, pendant environ 2 minutes pour éliminer l'air. Répartir des fractions aliquotes, par exemple de 100 ml, de boue bien mélangée dans les flacons d'essai à l'aide d'une pipette à grande pointe ou d'une éprouvette graduée. Il est essentiel de remplir la pipette en une seule fois jusqu'au volume exact de boue nécessaire, car les matières solides de la boue sédimentent facilement. Dans le cas d'un prélèvement trop important, vider la pipette et recommencer.
29. Ajouter ensuite une quantité suffisante de solution de substrat (paragraphe 17) pour ajuster à 2 g / l la concentration dans le mélange de chacun des composants suivants: bouillon nutritif, extrait de levure et D-glucose, tout en poursuivant la purge à l'azote. Le tableau suivant présente un exemple de lots d'essai

Concentration finale en masse de la substance chimique d'essai dans les flacons d'essai (mg/l)	Volume de substance chimique d'essai (ml)		Réactifs et milieux (ml)		
	Solution stock a) 10 g/l para. 18	Solution stock b) 1 g/l para. 18	Dilution dans l'eau para. 14	Inoculum para. 16	Substrat para. 17
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Volume total du flacon = 160 ml. Volume de liquide = 103 ml

Volume de gaz = 57 ml, soit 35,6 % du volume total.

30. Purger à l'azote de la même manière un nombre suffisant de flacons d'essai vides pour éliminer tout produit volatil et substance chimique d'essai liquide insoluble (voir paragraphe 27).

Témoins et substance chimique de référence

31. Préparer des lots comportant au moins trois répétitions contenant seulement la boue et le substrat, en guise de témoins. Préparer également des flacons en deux exemplaires contenant de la boue et du substrat additionnés d'une quantité suffisante de solution mère de la substance chimique de référence, le 3,5- dichlorophénol (paragraphe 21) pour ajuster la concentration finale à 150 mg/l. Cette concentration devrait inhiber la production de gaz d'environ 50 %. Il est également possible de préparer la substance de référence à plusieurs concentrations couvrant un intervalle. Trois flacons supplémentaires serviront à la mesure du pH, et contiendront la boue, de l'eau désoxygénée et le substrat. Ajouter la substance chimique d'essai à deux flacons à la concentration la plus élevée de l'essai et ajouter de l'eau désoxygénée aux deux autres flacons.

32. Il convient de s'assurer que toutes les flacons, d'essai, de substances de référence et témoins, contiennent le même volume (V_R) de liquide; s'il y a lieu, ajouter de l'eau désionisée désoxygénée (paragraphe 14) pour ajuster le volume. L'espace libre doit représenter entre 10 % et 40 % du volume du flacon et sa valeur exacte est choisie en se fondant sur les données obtenues dans l'essai préliminaire. Après introduction de tous les constituants dans les flacons, retirer l'aiguille d'alimentation en gaz et fermer hermétiquement chaque flacon avec un bouchon de caoutchouc et une capsule d'aluminium (paragraphe 12 (b)) en humidifiant le bouchon avec une goutte d'eau désionisée pour faciliter son insertion. Mélanger le contenu de chaque flacon par agitation.

Incubation des flacons

33. Transférer les flacons dans l'incubateur thermostaté, muni de préférence d'un dispositif d'agitation et maintenu à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Les flacons sont incubés à l'obscurité. Au bout d'environ 1 heure, équilibrer la pression dans les flacons avec la pression atmosphérique en insérant l'aiguille de seringue, reliée au manomètre (paragraphe 12 (c)), à travers le bouchon de chaque flacon, ouvrir le robinet jusqu'à ce que le manomètre affiche zéro, puis fermer le robinet. Il convient d'insérer l'aiguille à un angle d'environ 45° pour éviter la fuite du gaz contenu dans les flacons. Si les flacons incubés sont dépourvus de dispositif d'agitation, les agiter manuellement deux fois par jour pendant toute la période d'incubation afin d'équilibrer le système. Incuber les flacons en position inversée pour éviter la perte de gaz à travers le septum. Toutefois, l'inversion est déconseillée dans le cas où des substances chimiques d'essai insolubles sont susceptibles d'adhérer au fond du flacon.

Mesures de pression

34. Lorsque la température de tous les flacons a atteint $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, mesurer et noter le pH du contenu de deux des quatre flacons préparés à cette fin et en jeter le contenu. Poursuivre l'incubation des flacons restants à l'obscurité. Mesurer et noter la pression dans les flacons deux fois par jour pendant les 48 à 72 heures suivantes en insérant l'aiguille du manomètre à travers le bouchon de chaque flacon, tout à tour, et en séchant l'aiguille entre chaque mesure. Maintenir toutes les parties du flacon à la température d'incubation pendant la mesure, qui doit être réalisée aussi rapidement que possible. Noter la pression après stabilisation de la mesure. Ouvrir ensuite la soupape de ventilation et la refermer lorsque la valeur de la pression est revenue à zéro. L'essai dure habituellement 48 heures à partir de la première égalisation de la pression, désignée par "temps 0". Dans le cas de substances chimiques volatiles, le nombre de mesures et de ventilations doit être réduit à un (à la fin de l'incubation) ou deux pour limiter au minimum la perte de substance d'essai (10).
35. Si la mesure de pression donne un résultat négatif, il ne faut pas ouvrir la soupape. Il arrive que de l'humidité s'accumule dans l'aiguille et le tube de la seringue, ce qui se traduit par une valeur de pression faiblement négative. Dans ce cas, retirer la seringue, secouer le tube, le sécher avec un mouchoir en papier et monter une aiguille neuve.

Mesure du pH

36. Mesurer et enregistrer le pH du contenu de chaque flacon après la mesure de pression finale.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Expression des résultats

37. La somme et la moyenne des pressions enregistrées sont calculées à chaque intervalle de temps pour chaque ensemble de flacons de répétition et la pression de gaz globale cumulée moyenne est calculée à chaque intervalle de temps pour chaque lot de répétitions. Tracer les courbes de production de gaz cumulée moyenne (Pa) en fonction du temps pour les flacons témoins, d'essai et de référence. Choisir un point temporel dans la partie linéaire de la courbe, généralement 48 heures, et calculer le pourcentage d'inhibition (I) pour chaque concentration par l'équation [1]:

$$I = (1 - P_i/P_c) \times 100 \quad [1],$$

où

I pourcentage d'inhibition;

P_i pression gazeuse produite avec le matériau d'essai à un instant donné, en Pascal (Pa);

P_c pression gazeuse produite dans le flacon témoin au même instant, en Pascal (Pa).

Il est conseillé de tracer deux courbes, la courbe I en fonction de la concentration, et une autre courbe en fonction du logarithme de la concentration, de façon à choisir la courbe la plus proche de la linéarité. La valeur de CE_{50} (mg/l) est évaluée visuellement ou par analyse de régression à partir de la courbe la plus proche de la linéarité. A des fins de comparaison, il peut être utile d'exprimer la concentration de la substance en mg de substance/g de matières solides sèches totales. Pour obtenir cette concentration, il suffit de diviser la concentration volumique (mg/l) par la concentration volumique des matières solides de la boue sèche (g/l) (paragraphe 16).

38. Calculer le pourcentage d'inhibition obtenu par l'unique concentration de la substance chimique de référence utilisée, ou bien la CE_{50} lorsqu'un nombre suffisant de concentrations a été analysé.
39. Convertir la pression moyenne du gaz produit dans le flacon témoin P_c (Pa) en volume en se reportant à la courbe d'étalonnage du manomètre (Appendice 2) et de calculer ainsi le rendement en gaz, exprimé en volume produit en 48 heures par 100 ml de boue non diluée à une concentration de matières solides de 2 % (20 g/l) à 4 % (40 g/l).

Critères de validité

40. Les résultats issus de l'essai ISO inter-laboratoires (5) montrent que la substance chimique de référence (3,5-dichlorophénol) provoque une inhibition de 50 % de la production de gaz dans un intervalle de concentrations allant de 32 mg/l à 510 mg/l, avec une moyenne de 153 mg/l (paragraphe 10). L'ampleur de cet intervalle ne permet pas d'établir des limites précises utilisables comme critères de validité, qui ne seront disponibles que lorsqu'auront été mises au point des techniques de production d'inoculums moins variables. Les volumes de gaz produits dans les flacons témoins en 48 heures étaient compris entre 21 ml/g de matières sèches de boue et 149 ml/g (moyenne 72 ml/g). Aucune relation évidente n'a pu être établie entre le volume de gaz produit et la valeur de CE_{50} correspondante. Le pH final variait entre 6,1 et 7,5.
41. La validité de l'essai est reconnue si une inhibition supérieure à 20 % est obtenue dans le témoin de référence contenant 150 mg/l de 3,5-dichlorophénol, si plus de 50 ml de gaz par g de matières sèches sont produits dans le témoin à blanc et si la valeur du pH est comprise dans l'intervalle de 6,2 à 7,5 à la fin de l'essai.

Rapport d'essai

42. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

Substance chimique d'essai

- nom courant, nom chimique, numéro CAS, formule structurale et propriétés physicochimiques pertinentes;
- pureté (impuretés) de la substance chimique d'essai.

Conditions expérimentales:

- volumes des contenus liquides et de l'espace vide dans les récipients d'essai;
- description des récipients d'essai et de l'appareil de mesure des gaz (par exemple, type de manomètre);
- ajout de la substance chimique d'essai et de la substance chimique de référence au système expérimental, concentrations expérimentales utilisées et recours à un solvant, le cas échéant;
- détails sur l'inoculum utilisé: nom de la station d'épuration des eaux usées, description de la source des eaux usées traitées (par exemple, température de fonctionnement, temps de rétention de la boue, origine principalement domestique ou déchets industriels, etc.), concentration de matières solides, activité de production gazeuse du digesteur anaérobie, exposition préalable ou préadaptation éventuelle à des substances toxiques ou site de récolte de vase, de sédiments etc;
- température d'incubation et intervalle;
- nombre de répétitions.

Résultats:

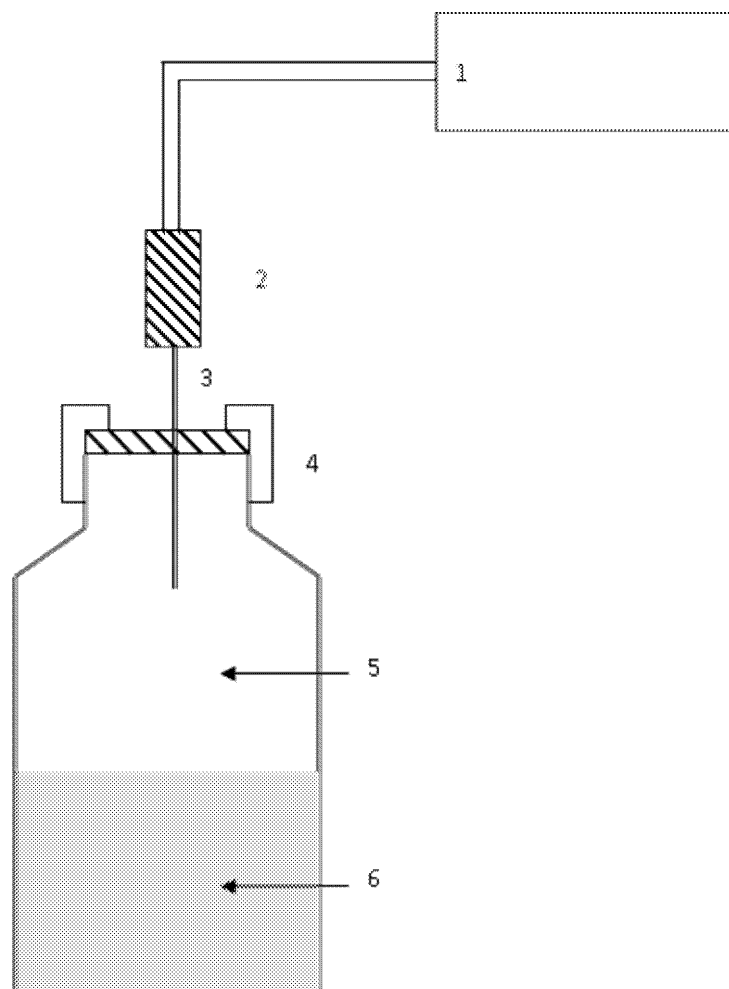
- valeurs de pH à la fin de l'essai;
- toutes les valeurs mesurées dans les récipients d'essai, les témoins à blanc, les témoins contenant la substance chimique de référence, le cas échéant, (par exemple pression en Pa ou en millibars) sous forme de tableau;
- pourcentage d'inhibition dans les flacons d'essai et de référence et courbes d'inhibition en fonction de la concentration;
- calcul des valeurs de CE_{50} , exprimées en mg/l et en mg/g;
- production de gaz par gramme de boue en 48 heures;
- motifs d'un rejet éventuel des résultats de l'essai;
- discussion des résultats, en particulier mention de tous les écarts par rapport aux modes opératoires présentés dans cette méthode d'essai et discussion de tous les écarts observés dans les résultats d'essais dus à des interférences et à des erreurs par rapport aux résultats escomptés;
- objectifs de l'essai: définir si l'essai était destiné à mesurer la toxicité de micro-organismes préalablement exposés ou non.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Chapitre C.11 de la présente annexe: Boues activées, essai d'inhibition de la respiration.
- (2) Chapitre C.43 de la présente annexe: Essai de biodégradabilité anaérobie des composés organiques dans une boue digérée: mesure du dégagement gazeux.
- (3) Organisation internationale de normalisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1: General Test.
- (4) Organisation internationale de normalisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 2: Test for low biomass concentrations.
- (5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.
- (6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. *Wat. Pollut. Control*, 70, 58-70.
- (7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.
- (8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Env. Microbiol.* 47 850-857.
- (9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. *Chemosphere* 17, 2441-2460.
- (10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. *Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods*, GSF Forschungszentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp117-132 (1992).

-
- (11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, and Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. *Chemosphere*, 39 (12), 2007-2018.
 - (12) Organisation internationale de normalisation (1995) ISO 10 634 Qualité de l'eau — Lignes directrices pour la préparation et le traitement de composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.
 - (13) Organisation internationale de normalisation (1997) ISO 11 923 Qualité de l'eau — Dosage des matières en suspension par filtration sur filtre en fibres de verre.
-

Appendice 1

Exemple d'un appareil permettant de mesurer la production de biogaz d'après la pression gazeuse*Légende*

- 1 — Manomètre
- 2 — Robinet 3 voies étanche aux gaz
- 3 — Aiguille de seringue
- 4 — Bouchon étanche aux gaz (septum et capsule sertis)
- 5 — Espace libre
- 6 — Inoculum de boue digérée

Récepteur d'essai maintenu à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

Appendice 2

Conversion des mesures manométriques

Les pressions relevées au manomètre peuvent être rapportées à des volumes gazeux à l'aide d'une courbe de référence à partir de laquelle le volume de gaz produit par gramme de boue sèche par 48 heures peut être calculé. Cet indice d'activité est l'un des critères d'évaluation de la validité des résultats de l'essai. La courbe de référence est obtenue en injectant des volumes de gaz connus à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ dans des flacons à serum contenant un volume d'eau égal à celui du mélange réactionnel, V_R ;

- Verser des fractions aliquotes de V_R ml d'eau, maintenues à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ dans cinq flacons à serum. Fermer hermétiquement les flacons et les plonger dans un bain d'eau à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ pendant 1 heure pour les laisser s'équilibrer;
 - Enclencher le manomètre, attendre qu'il se stabilise et le régler à zéro;
 - Insérer l'aiguille de la seringue à travers le bouchon de l'un des flacons, ouvrir le robinet jusqu'à ce que le manomètre indique zéro et fermer le robinet;
 - Répéter ce processus avec les autres flacons;
 - Injecter 1 ml d'air à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ dans chaque flacon. Insérer l'aiguille (montée sur le manomètre) à travers le bouchon de l'un des flacons et attendre que la valeur affichée se stabilise. Noter la pression, ouvrir le robinet jusqu'à ce que la pression retombe à zéro, puis fermer le robinet;
 - Répéter ce processus avec les autres flacons;
 - Répéter la totalité du processus en appliquant des volumes d'air de 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml et 50 ml;
 - Tracer une courbe de conversion de la pression (Pa) en fonction du volume de gaz injecté (ml). La réponse de l'instrument est linéaire sur l'intervalle compris entre 0 Pa et 70 000 Pa, et entre 0 ml et 50 ml de gaz produit.
-

Appendice 3

Identification des facteurs à l'origine de résultats erronésa) *Qualité des bouchons de flacons*

Différents types de septums pour les flacons de sérums sont disponibles dans le commerce; nombre d'entre eux, en particulier le caoutchouc butyle, perdent leur étanchéité après avoir été percés d'une aiguille dans les conditions de cet essai. Il arrive que la pression chute très lentement une fois le septum percé par l'aiguille de seringue. L'utilisation de septums étanches aux gaz est recommandée pour éviter les fuites [paragraphe 12 b)].

b) *Humidité dans l'aiguille de la seringue*

L'humidité s'accumule parfois dans l'aiguille et le tube de la seringue, ce qui est signalé par une valeur de pression faiblement négative. Cet incident est corrigé en retirant l'aiguille et en secouant le tube, en le séchant avec un mouchoir en papier et en montant une aiguille neuve (paragraphes 12 c) et 35).

c) *Contamination par l'oxygène*

Les méthodes anaérobies sont sensibles aux erreurs engendrées par une contamination par l'oxygène qui peut réduire la production de gaz. L'utilisation de techniques strictement anaérobies, en particulier grâce à la boîte à gants, permet de restreindre au minimum ces problèmes.

d) *Substrats bruts dans la boue*

La production anaérobie de gaz et la sensibilité de la boue sont influencées par des substrats transférés avec l'inoculum dans les flacons d'essais. La boue digérée provenant de digesteurs anaérobies domestiques contient encore souvent des matières identifiables comme des poils et des résidus végétaux de cellulose, qui compliquent la tâche de prélèvement d'échantillons représentatifs. Les matières insolubles grossières peuvent être éliminées de la boue par tamisage, pour augmenter la représentativité de l'échantillonnage (paragraphe 16).

e) *Substances chimiques d'essai volatiles*

Les substances chimiques d'essai volatiles se dégagent dans l'espace vide des flacons d'essai. Elles sont donc susceptibles de s'échapper en partie du système pendant la ventilation qui suit les mesures de pression, ce qui se traduira par des valeurs de CE_{50} fictivement élevées. Ce type d'erreurs peut être réduit par le choix approprié d'un rapport volume vide à volume de liquide et par la suppression de la ventilation après les mesures de pression (10).

f) *Non-linéarité de la production de gaz*

Lorsque la courbe de production de gaz cumulée moyenne en fonction de la durée d'incubation ne tend pas vers la linéarité pendant la période de 48 h, la précision de l'essai peut diminuer. Il est conseillé, pour résoudre ce problème, d'utiliser une boue de digestion d'origine différente ou d'ajouter des concentrations plus élevées de substrat d'essai et de bouillon de nutriment, d'extrait de levure et de glucose (paragraphe 29).

Appendice 4

Application aux échantillons environnementaux à faible concentration de biomasse — vases anaérobies, sédiments, etc.

INTRODUCTION

- A.1 En général, l'activité microbienne spécifique (volume de gaz produit par gramme de solides secs) des vases, des sédiments, et des sols anaérobies naturels est très inférieure à celle d'une boue anaérobie prélevée dans des eaux usées. C'est pourquoi il est nécessaire de modifier certaines conditions expérimentales pour mesurer les effets inhibiteurs de produits chimiques sur ces échantillons moins actifs. Dans ce cas, deux approches sont possibles:
- a) Procéder un essai préliminaire modifié (paragraphe 25) avec l'échantillon de vase, de sol, etc non dilué à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ou à la température du site de prélèvement de l'échantillon, pour optimiser la simulation (comme c'est le cas dans la partie 1 de la norme ISO 13 641);
 - b) ou bien mettre en œuvre l'essai avec une boue de digesteur diluée (100 fois) afin de simuler l'activité réduite escomptée de l'échantillon environnemental, tout en maintenant la température à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (comme dans la partie 2 de la norme ISO 13 641).
- A.2 L'option (a) peut être adoptée conformément à la méthode décrite ici (qui est équivalente à la partie 1 de la norme ISO 13 641), mais il est essentiel de déterminer les conditions optimales par un essai préliminaire (paragraphe 25), à moins qu'elles ne soient déjà connues grâce à des essais antérieurs. L'échantillon de vase ou de sédiment doit être parfaitement mélangé, par exemple dans un mélangeur, et, s'il y a lieu, dilué avec une proportion mineure d'eau de dilution désaérée (paragraphe 14) afin de lui conférer une fluidité suffisante pour son transfert par une pipette à large pointe ou une éprouvette graduée. Dans le cas où l'on estime que la quantité de nutriments pourrait être insuffisante, il est possible de centrifuger l'échantillon de vase (en conditions anaérobies) et de le remettre en suspension dans un milieu minéral contenant de l'extrait de levure (A.11).
- A.3 Option (b). Cette approche reproduit convenablement l'activité réduite des échantillons environnementaux, à l'exception de la concentration élevée en matières solides en suspension présente dans ces échantillons. Le rôle qu'elles jouent dans l'inhibition est inconnu, mais une réaction éventuelle entre les substances chimiques d'essai et les constituants de la vase, ou bien l'adsorption des substances chimiques d'essai sur les solides, pourrait réduire la toxicité de la substance chimique d'essai.
- A.4 La température est un autre facteur important: une simulation rigoureuse exige de procéder aux essais à la température du site d'échantillon, sachant que des groupes différents de consortium méthanogènes de bactéries sont fonctionnels dans des intervalles de températures différents, à savoir les groupes thermophiles ($\sim 30\text{-}35\text{ °C}$), mésophiles ($20\text{-}25\text{ °C}$) et psychrophiles ($< 20\text{ °C}$), dont les modèles d'inhibition peuvent être différents.
- A.5 Durée. Dans l'essai général, Partie 1, sur boue non diluée, la production de gaz en 2-4 jours suffit toujours largement, tandis que dans la partie 2 sur boue diluée 100 fois, la production de gaz, lorsqu'elle existe, s'est révélée insuffisante dans ce délai selon l'essai tournant. Madsen et al (1996), dans leur description de ce second type d'essai, proposent une période de 7 jours.

Essais avec une faible concentration de biomasse (option b)

Les modifications et amendements suivants doivent être apportés, et s'ajoutent à certains des paragraphes ou sous-paragraphes existants du texte principal ou les remplacent.

- A.6 Ajout au paragraphe 6: Principe de l'essai;
- “Cette technique peut être utilisée avec une boue anaérobie diluée 100 fois, pour simuler en partie la faible activité des vases et des sédiments. La température d'incubation peut être égale à 35 °C , ou à la température du site de prélèvement de l'échantillon. En raison d'une activité bactérienne très inférieure à celle d'une boue non diluée, la période d'incubation peut être prolongée jusqu'à au moins 7 jours.”
- A.7 Ajout au paragraphe 12 (a):
- “l'incubateur doit être capable de fonctionner à des températures de l'ordre de 15 °C .”

A.8 Ajout d'un réactif supplémentaire après le paragraphe 13:

“Acide phosphorique (H_3PO_4), 85 % en masse dans l'eau.”

A.9 Ajout à la fin du paragraphe 16:

“Utiliser une concentration finale de $0,20 \pm 0,05$ g/l de matières solides sèches totales dans l'essai.”

A.10 Paragraphe 17. Substrat d'essai

Ce substrat n'est pas utilisé, mais remplacé par de l'extrait de levure (voir paragraphes 17; A.11, A.12, A.13).

A.11 La boue anaérobie doit être diluée par un milieu minéral, contenant des oligo-éléments, et le substrat organique, l'extrait de levure, est ajouté pour des raisons pratiques à ce milieu.

Ajout après le paragraphe 17:

“(a) Milieu minéral d'essai, contenant de l'extrait de levure.

Ce milieu est préparé à partir d'un milieu d'essai concentré 10 fois [paragraphe 17 (b); A.12] contenant une solution d'oligo-éléments [paragraphe 17 (c); A.13]. Utiliser du sulfure de sodium nonahydraté préparé extemporanément (paragraphe 17 (b); A.12) ou lavé et séché avant utilisation afin de s'assurer qu'il soit suffisamment réducteur. Dans le cas où l'essai est mis en œuvre sans boîte à gants [paragraphe 12 (j)], la concentration finale de sulfure de sodium dans la solution mère peut être portée à 2 g/l [au lieu de 1 g/l]. Le sulfure de sodium peut également être ajouté à partir d'une solution mère appropriée à travers le septum des flacons d'essai fermés, ce mode opératoire diminuant le risque d'oxydation, jusqu'à obtenir une concentration finale de 0,2 g/l. On peut également utiliser du citrate de titane (III) [paragraphe 17 (b)]. Celui-ci est ajouté à travers le septum des flacons d'essai fermés, pour ajuster la concentration entre 0,8 mmol/l et 1,0 mmol/l. Le citrate de titane (III) est un agent réducteur très efficace et peu toxique que l'on peut préparer de la manière suivante: dissoudre 2,94 g de citrate de sodium dihydraté dans 50 ml d'eau de dilution sans oxygène (paragraphe 14) (on obtient alors une solution à 200 mmol/l) et ajouter 5 ml d'une solution de chlorure de titane (II) (15 g/100 ml d'eau de dilution). Neutraliser à $\text{pH } 7 \pm 0,5$ avec du carbonate de sodium et verser dans un flacon à serum approprié sous un courant d'azote gazeux. La concentration du citrate de titane (III) dans cette solution mère est égale à 164 mmol/l. Utiliser le milieu d'essai immédiatement ou bien le conserver à 4 °C pendant une journée au maximum.

A.12 b) Milieu d'essai concentré 10 fois, préparé à partir des composants suivants:

dihydrogénophosphate de potassium anhydre (KH_2PO_4)	2,7 g
hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4)	4,4 g
(ou 11,2 g de dodécahydrate)	5,3 g
chlorure d'ammonium (NH_4Cl)	
chlorure de calcium dihydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,75 g
chlorure de magnésium hexahydraté ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
chlorure de fer (II) tétrahydraté ($\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,2 g
résazurine (indicateur d'oxygène)	0,01 g
sulfure de sodium nonahydraté ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
[ou citrate de titane (III) citrate] concentration finale	0,8 mmol/l à 1,0 mmol/l
solution d'oligo-élément [voir paragraphe 17 (c); A.13]	10,0 ml
extrait de levure	100 g
dissoudre dans de l'eau de dilution (paragraphe 14) et ajuster à:	1 000 ml

A.13 c) Solution d'oligo-éléments, préparée à partir des composants suivants:

chlorure de manganèse (II) tétrahydraté ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
acide ortho-borique (H_3BO_3)	0,05 g

chlorure de zinc (ZnCl_2)	0,05 g
chlorure de cuivre (II) (CuCl_2)	0,03 g
molybdate de sodium dihydraté ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,01 g
chlorure de cobalt (II) hexahydraté ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
chlorure de nickel (II) hexahydraté ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
sélénite de sodium (Na_2SeO_3)	0,05 g
dissoudre dans de l'eau de dilution (paragraphe 14) et ajuster à:	1 000 ml"

A.14 Paragraphe 25: Essai préliminaire

Il est essentiel de procéder à un essai préliminaire comme il est décrit dans le paragraphe 24, mais en employant des concentrations de matières solides de boue égales à un centième de celles indiquées, c'est-à-dire 0,1 g/l, 0,2 g/l et 0,4 g/l. La durée d'incubation doit être d'au moins 7 jours.

Note: Dans l'essai tournant (5), le volume vide, qui représentait 75 % du volume total, était beaucoup trop élevé. Il devrait se situer dans l'intervalle recommandé de 10 %-40 %. Le critère décisif à satisfaire est l'obtention d'un volume de gaz produit mesurable avec une précision acceptable (par exemple $\pm 5\%$ à $\pm 10\%$) pour une inhibition d'environ 80 %.

A.15 Paragraphes 26 à 30: Addition de substance chimique d'essai, d'inoculum et de substrat.

L'introduction de ces composants est identique à celle qui est décrite dans ces paragraphes, en remplaçant la solution de substrats (paragraphe 17) par le milieu d'essai additionné de substrat d'extrait de levure (A.11).

En outre, la concentration finale de matières solides de boue sèche est réduite de 2 g/l – 4 g/l à $0,2 \pm 0,05$ g/l (A.9). Le tableau A.1, qui remplace le tableau du paragraphe 29, présente deux exemples d'addition des composants au mélange d'essai.

A.16 Paragraphe 33: Incubation des flacons

La vitesse de production de gaz attendue étant plus faible, l'incubation dure au moins 7 jours.

A.17 Paragraphe 34: Mesures de pression

Le mode opératoire de mesure de la pression dans l'espace vide des flacons est identique à celui décrit au paragraphe 34 lorsqu'il est aussi nécessaire d'analyser les quantités dans la phase gazeuse. Lorsque l'on mesure les quantités totales de CO_2 et de CH_4 , le pH de la phase liquide est abaissé à environ pH 2 par l'injection de H_3PO_4 dans chaque flacon concerné et la pression est mesurée au bout de 30 minutes d'agitation à la température de l'essai. Toutefois, la mesure de la pression dans chaque flacon avant et après acidification fournira davantage d'informations sur la qualité de l'inoculum. Par exemple, si le CO_2 est produit beaucoup plus rapidement que le méthane, la sensibilité des bactéries fermentaires est peut-être modifiée, ou bien les bactéries méthanogènes sont préférentiellement affectées par la substance chimique d'essai.

A.18 Paragraphe 36: mesure du pH

S'il est nécessaire d'utiliser du H_3PO_4 , il convient de préparer quelques flacons supplémentaires sans addition de H_3PO_4 , en particulier pour la mesure du pH.

RÉFÉRENCE:

Madsen, T, Rasmussen, HB; and Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

Tableau A.1

Exemples d'organisation de l'essai pour des lots d'essai

Mélange réactionnel composants	Exemple 1	Exemple 2	Ordre normal d'addition
Concentration de l'inoculum préparé (g/l)	0,42	2,1	—
Volume d'inoculum ajouté (ml)	45	9	4
Concentration d'inoculum dans les flacons d'essai (g/l)	0,20	0,20	—
Volume de milieu d'essai ajouté (ml)	9	9	2
Volume d'eau de dilution ajouté (ml)	36	72	3
Concentration d'extrait de levure dans les flacons d'essai (g/l)	9,7	9,7	—
Volume de solution mère de substance chimique d'essai (ml)	3	3	1
Volume total de liquide (ml) i	93	93	—

*Appendice 5***Définitions**

Aux fins de la présente méthode d'essai, les définitions suivantes s'appliquent:

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

C.35 ESSAI DE TOXICITÉ SUR *LUMBRICULUS* DANS UN SYSTÈME EAU-SÉDIMENT CHARGÉ

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 225 (2007) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les animaux endobenthiques qui ingèrent des sédiments sont soumis à un risque d'exposition substantielle aux substances liées aux sédiments, et soulèvent par conséquent un grand intérêt, par exemple (1), (2), (3). Parmi les organismes de ce type, les oligochètes aquatiques jouent un rôle important dans les sédiments des systèmes aquatiques. Leur implication dans la bioturbation du sédiment et leur fonction de proie pourraient leur conférer une influence considérable sur la biodisponibilité de ces substances pour d'autres organismes, par exemple les poissons benthivores. Au contraire des organismes épibenthiques, les oligochètes aquatiques endobenthiques, (par exemple, *Lumbriculus variegatus*) s'enfouissent dans le sédiment et ingèrent des particules en dessous de la surface sédimentaire. L'exposition des organismes expérimentaux aux substances chimiques d'essai par toutes les voies d'absorption possibles (par exemple contact, ingestion de particules de sédiment contaminé, mais également par l'intermédiaire de l'eau interstitielle, et de l'eau sus-jacente) est ainsi assurée.
2. La présente méthode d'essai a pour objectif d'évaluer les effets d'une exposition prolongée de l'oligochète endobenthique *Lumbriculus variegatus* (Müller) aux substances chimiques associées au sédiment. Elle est fondée sur des protocoles existants d'essais de toxicité et de bioaccumulation dans les sédiments, par exemple (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). La méthode est décrite dans des conditions d'essai statiques. Le mode d'exposition utilisé dans cette méthode d'essai consiste à charger le sédiment de la substance chimique d'essai, dans l'intention de l'utiliser pour simuler un sédiment contaminé par la substance chimique d'essai.
3. Les substances qu'il faut tester sur des organismes vivant dans le sédiment présentent généralement une persistance de longue durée dans ce compartiment. Plusieurs voies d'exposition sont valides pour les organismes résidant dans ce milieu. L'importance relative de chaque voie et le délai nécessaire à leur contribution aux effets toxiques globaux dépendent des propriétés physico-chimiques du produit concerné et de sa destination finale dans l'animal. Dans le cas des substances dont l'absorption est très élevée (par exemple, avec $\log K_{oc} > 5$) ou de substances liées par covalence aux sédiments, l'ingestion d'aliments contaminés peut se révéler une voie d'exposition significative. Pour éviter toute sous-estimation de la toxicité de ces substances, les aliments nécessaires à la reproduction et à la croissance des organismes d'essai sont ajoutés au sédiment avant application de la substance chimique d'essai (11). La méthode décrite ici est suffisamment détaillée pour permettre la conduite de l'essai tout en admettant des adaptations du modèle expérimental aux conditions des laboratoires concernés et aux diverses caractéristiques des substances chimiques d'essais.
4. La méthode expérimentale a pour objectif de déterminer les effets d'une substance chimique d'essai sur la reproduction et la biomasse des organismes d'essai. Les paramètres biologiques mesurés sont les suivants: nombre total de vers survivants et biomasse (poids sec) en fin d'exposition. Ces données sont analysées à l'aide d'un modèle de régression afin d'estimer la concentration responsable d'un effet de x % (par exemple CE_{50} , CE_{25} , et CE_{10}), ou par vérification d'une hypothèse statistique visant à déterminer la concentration sans effet observé (CSEO) et la concentration minimale avec effet observé (CMEO).
5. Le chapitre C.27 de la présente annexe "Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment dopé" (6) fournit de nombreux détails essentiels et utiles à la mise en œuvre de la présente méthode d'essai de toxicité sur sédiment. Par conséquent, ce document a servi de base à laquelle ont été apportées les modifications nécessaires à la réalisation d'essais de toxicité sur sédiment avec *Lumbriculus variegatus*. On se référera également, par exemple, aux documents suivants: ASTM Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates (3), the U.S. EPA Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates (7), et ASTM Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates (12). De surcroît, l'expérience pratique acquise pendant l'essai circulaire de la méthode [(13), rapport d'essai circulaire], et les précisions recueillies dans la littérature constituent des sources d'informations importantes pour la rédaction de ce document.

PRÉREQUIS ET RECOMMANDATIONS

6. Il conviendra d'obtenir avant le début de l'étude des informations concernant la substance chimique d'essai, par exemple, en termes précautions à prendre pour assurer la sécurité, de conditions de stockage appropriées et de méthodes analytiques. Des conseils à propos des substances d'essai dont les propriétés physicochimiques compliquent la mise en œuvre de l'essai sont proposés dans (14).

7. Avant la réalisation d'un essai, les informations suivantes sur la substance chimique d'essai doivent être disponibles:
 - nom courant, nom chimique (de préférence nom IUPAC), formule structurale, numéro d'enregistrement CAS, pureté;
 - pression de vapeur;
 - solubilité dans l'eau.
8. Les informations complémentaires suivantes sont estimées utiles avant le début de l'essai:
 - coefficient de partage octanol-eau, K_{oc} ;
 - coefficient de partage carbone organique-eau, exprimé par K_{co} ;
 - hydrolyse;
 - phototransformation dans l'eau;
 - biodégradabilité;
 - tension superficielle.
9. Des informations sur certaines caractéristiques du sédiment utilisé doivent être connues avant de commencer l'essai (7). On se référera aux paragraphes 22 à 25 pour plus de détails à ce sujet.

PRINCIPE DE L'ESSAI

10. Des vers dans un état physiologique similaire (synchronisés comme il est décrit dans l'Appendice 5) sont exposés à une substance toxique à une série de concentrations appliquées à la phase sédiment d'un système sédiment-eau. Il convient d'utiliser comme milieu un sédiment artificiel et de l'eau reconstituée. Des récipients expérimentaux sans adjonction de substance chimique d'essai servent de témoins. La substance chimique d'essai est introduite dans le sédiment dans un grand volume à chaque concentration afin de réduire au minimum la variabilité entre les expériences identiques et les organismes d'essai sont inoculés ensuite dans les récipients dans lesquels ont été équilibrées les concentrations de sédiments et d'eau (voir paragraphe 29). Les animaux d'essai sont exposés au système sédiment-eau pendant une durée de 28 jours. Le sédiment artificiel ne contenant que de petites quantités de nutriments, il faut l'enrichir par l'apport d'une source d'aliments (voir paragraphes 22 à 23, et Appendice 4) afin de garantir la croissance et la reproduction des vers dans des conditions contrôlées. On s'assure ainsi que l'exposition des animaux expérimentaux s'opère par l'intermédiaire de l'eau et du sédiment ainsi que par leur alimentation.
11. L'effet préférentiellement analysé dans ce type d'étude est la CE_x (par exemple CE_{50} , CE_{25} , et CE_{10} ; concentration avec un effet qui affecte x % des organismes expérimentaux) pour la reproduction et la biomasse, respectivement, relativement au témoin. Toutefois, il convient de noter qu'en raison de l'incertitude élevée qui marque les CE_x aux basses valeurs (e.g. CE_{10} , CE_{25}), qui sont associées à des limites de confiance de 95 % extrêmement élevées (par exemple (15)) et de la puissance statistique calculée au cours de la vérification de l'hypothèse, la CE_{50} est considérée comme le résultat le plus fiable. En outre, on peut calculer la concentration sans effet observé (CSEO) et la concentration minimale avec effet observé (CMEO) pour la biomasse et la reproduction, sous réserve que le modèle d'essai et les résultats permettent ces calculs (voir paragraphes 34 à 38). L'objectif de l'étude, CE_x ou calcul de la CSEO, déterminera le modèle de l'essai.

ESSAI DE RÉFÉRENCE

12. La capacité d'un laboratoire à mener l'essai est d'ordinaire amplement démontré par les performances des organismes témoins, et, lorsque des données historiques sont disponibles, par la répétabilité de l'essai. Il est également possible de mener des essais de toxicité de référence à intervalles réguliers en employant un produit toxique de référence permettant d'évaluer la sensibilité des organismes d'essai. Des tests de toxicité de référence de 96 h dans l'eau devraient suffire à démontrer la sensibilité et la condition des animaux expérimentaux (4)(7). L'Appendice 6 présente des informations sur la toxicité du pentachlorophénol (PCP) dans des essais réalisés (exposition de 28 jours à du sédiment chargé), ainsi que le rapport sur l'essai circulaire de la méthode d'essai (13). La toxicité aiguë du PCP en présence d'eau seule est décrite dans, par exemple, (16). Ces informations peuvent permettre la comparaison de la sensibilité de l'organisme expérimental dans des essais de référence, le PCP faisant fonction de produit toxique de référence. Les produits toxiques de référence recommandés pour *L. variegatus* sont le chlorure de potassium (KCl) ou le sulfate de cuivre ($CuSO_4$) (4)(7). Il est difficile à ce jour d'établir des critères de qualité fondés sur des données de toxicité du KCl, car les résultats de la littérature sur *L. variegatus* font défaut. Des informations sur la toxicité du cuivre sur *L. variegatus* sont fournies dans (17) à (21).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

13. Un essai est validé aux conditions suivantes:

- Un essai circulaire (13) a montré que dans le cas de *Lumbriculus variegatus*, une augmentation d'un facteur d'au moins 1,8 du nombre moyen des vers vivants par expérience dans les témoins entre le début et la fin de l'exposition doit être atteinte.
- Le pH de l'eau sus-jacente doit être compris entre 6 et 9 pendant toute la durée de l'essai.
- La concentration d'oxygène dans l'eau sus-jacente ne doit pas descendre en dessous de 30 % de sa valeur dans l'air saturé (VAS) à la température appliquée pendant l'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Système expérimental

14. Il est recommandé d'utiliser des systèmes statiques sans renouvellement de l'eau sus-jacente. Lorsque le rapport sédiment à eau (voir paragraphe 15) est adéquat, une légère aération suffira habituellement au maintien de la qualité de l'eau à des niveaux acceptables pour les organismes de l'essai (par exemple, avec obtention de niveaux maximaux d'oxygène dissous et accumulation minimale de produits d'excrétion). Il conviendra de réserver l'utilisation de systèmes semi-statiques ou à écoulement continu avec renouvellement intermittent ou continu de l'eau sus-jacente à des cas exceptionnels, car le renouvellement régulier de l'eau sus-jacente est susceptible d'affecter l'équilibre chimique (par exemple, déperditions de substance chimique d'essai par le système expérimental).

Récipients et appareils expérimentaux

15. L'exposition doit être mise en œuvre dans des béciers en verre, par exemple, de 250 ml, et de 6 cm de diamètre. Il est possible d'utiliser d'autres récipients en verre appropriés, sous réserve qu'ils garantissent une profondeur convenable d'eau sus-jacente et de sédiment. Une couche d'environ 1,5-3 cm de sédiment formulé sera introduite dans chaque récipient. Le rapport de la profondeur de la couche de sédiment à la profondeur de la couche d'eau sus-jacente doit être égal à 1:4. Le volume des récipients doit être adapté au taux de charge, c'est-à-dire au nombre de vers de l'essai ajoutés par unité pondérale de sédiment (voir également paragraphe 39).
16. Les récipients expérimentaux et les autres appareils susceptibles d'entrer en contact avec la substance chimique d'essai doivent être entièrement constitués de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte. Il conviendra d'éviter avec soin l'utilisation dans toutes les parties de l'équipement de matériaux capables de dissoudre ou d'absorber les substances chimiques d'essai ou de laisser s'échapper d'autres substances exerçant un effet indésirable sur les animaux de l'essai. Il faut utiliser du polytétrafluoréthylène (PTFE), de l'acier inoxydable et/ou du verre dans tous les équipements entrant en contact avec le milieu d'essai. En présence de substances organiques qui s'adsorbent sur le verre, il faudra éventuellement employer un verre silanisé. Dans ce cas, l'équipement sera jeté après utilisation.

Espèce expérimentale

17. L'espèce expérimentale utilisée dans ce type d'études est l'oligochète d'eau douce *Lumbriculus variegatus* (Müller). Cette espèce tolère une large gamme de sédiments et est largement utilisée dans les essais de toxicité et de bioaccumulation dans les sédiments (par exemple, (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)). Il conviendra de définir l'origine des animaux de l'essai, de confirmer l'identité de l'espèce (par exemple (36)) et d'expliciter les conditions de culture. Il n'est pas nécessaire d'identifier l'espèce avant chaque essai lorsque les organismes proviennent d'une culture sur site.

Culture des organismes expérimentaux

18. Afin de disposer d'un nombre suffisant de vers pour mener des essais de toxicité sur sédiment, il est utile de maintenir en permanence une culture de vers au laboratoire. Des directives pour les méthodes de culture en laboratoire de *Lumbriculus variegatus*, et des sources de culture de départ sont indiquées dans l'Annexe 5. Des détails sur la culture de cette espèce sont fournis dans les références (3), (7), (27).
19. Il est fermement recommandé d'établir des cultures d'espèces individuelles pour garantir la mise en œuvre des essais sur des animaux de la même espèce. On s'assurera que les cultures, et en particulier les vers utilisés dans les essais, sont exemptes de maladies et d'anomalies visibles.

Eau

20. L'utilisation dans les essais d'eau reconstituée conformément au chapitre C.1 de la présente annexe (37) comme eau sus-jacente est recommandée; on peut également l'utiliser pour les cultures des vers en laboratoire (voir Appendice 2 pour la préparation). Si nécessaire, de l'eau naturelle peut être utilisée. La qualité de l'eau choisie doit permettre la croissance et la reproduction de l'espèce expérimentale au cours des périodes d'acclimatation et d'essai, sans manifestation d'une apparence ou d'un comportement anormal quelconque. On a démontré que *Lumbriculus variegatus* survivait, se développait et se reproduisait dans ce type d'eau (30) et elle permet une standardisation maximale des conditions d'essai et de culture. Dans le cas de l'utilisation d'une eau reconstituée, il conviendra d'en indiquer la composition et de la caractériser avant son utilisation, au moins en termes de pH, de teneur en oxygène et de dureté (exprimée en mg de CaCO_3/l). La détection d'éventuels micropolluants dans l'eau avant son utilisation devrait fournir des informations utiles (voir, par exemple, Appendice 3).
21. Le pH de l'eau sus-jacente doit être compris dans l'intervalle de 6,0 à 9,0 (voir paragraphe 13). Si un dégagement d'ammoniac important est à prévoir, on considère qu'il est utile de maintenir le pH entre 6,0 et 8,0. Lors de l'analyse d'acides organiques faibles, par exemple, il est conseillé d'ajuster le pH en tamponnant l'eau utilisée dans l'essai, comme il est décrit, par exemple, dans (16). La dureté totale de l'eau utilisée dans l'essai doit être comprise entre 90 et 300 mg de CaCO_3 par litre pour l'eau naturelle. L'Appendice 3 résume d'autres critères caractérisant une eau de dilution acceptable conformément à la Ligne directrice N° 210 de l'OCDE (38).

Sédiment

22. Les sédiments naturels non contaminés provenant d'une source particulière ne sont pas toujours disponibles tout au long de l'année, et des organismes indigènes ainsi que la présence de micropolluants peuvent influencer sur l'essai, et par conséquent, il est préférable d'utiliser un sédiment formulé (également dénommé sédiment reconstitué, artificiel ou synthétique). L'utilisation d'un sédiment formulé limite la variabilité des conditions d'essais, ainsi que l'introduction d'une faune indigène. Le sédiment suivant a été formulé à partir du sédiment artificiel décrit dans (6), (39), et (40). Son utilisation est recommandée dans ce type d'essai [(6), (10), (30), (41), (42), (43)]:
- a) 4-5 % (poids sec) de tourbe à sphaignes; il est important d'utiliser la tourbe sous forme pulvérisée avec un degré de décomposition "moyen", finement broyée (dimension des particules $\leq 0,5$ mm), et séchée uniquement à l'air.
 - b) 20 ± 1 % (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %).
 - c) 75-76 % (poids sec) de sable quartzique (sable fin, dimension des grains: ≤ 2 mm, mais plus de 50 % des particules doivent mesurer de 50 à 200 μm).
 - d) Eau désionisée, 30-50 % de poids sec du sédiment, en plus des composants du sédiment sec.
 - e) Carbonate de calcium de qualité chimiquement pure (CaCO_3), ajouté pour ajuster le pH du mélange final du sédiment.
 - f) La teneur en carbone organique total (TCO) du mélange final doit être égale à 2 % ($\pm 0,5$ %) du poids sec de sédiment, ajustée à l'aide de quantité appropriée de tourbe et de sable, comme indiqué en (a) et (c).
 - g) Des aliments, par exemple, feuilles pulvérisées d'ortie (*Urtica* sp., conformément aux normes pharmaceutiques, pour consommation humaine), ou un mélange de feuilles pulvérisées d'*Urtica* sp. avec de l'alpha-cellulose (1: 1), à 0,4 - 0,5 % de poids sec de sédiment, en plus des composants secs du sédiment; pour d'autres détails, on se référera à l'Appendice 4.
23. Les sources de tourbe, d'argile kaolinique, d'aliments et de sable doivent être connues. Outre ceux du (g) ci-dessus, le chapitre C.27 de la présente annexe (6) énumère d'autres substances végétales susceptibles d'être utilisées comme sources d'aliments: feuilles déshydratées de mûrier (*Morus alba*), de trèfle blanc (*Trifolium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*), ou céréales.
24. La source d'aliments choisie doit être ajoutée avant ou pendant l'introduction de la substance chimique d'essai dans le sédiment. Elle doit permettre au moins une reproduction acceptable dans les échantillons témoins. L'analyse des micropolluants dans le sédiment artificiel ou ses constituants avant utilisation devrait fournir des

informations utiles. Un exemple de préparation du sédiment formulé est décrit dans l'Appendice 4. Il est également possible de mélanger des constituants secs, sous réserve de démontrer qu'après l'addition de l'eau sus-jacente, il n'y a pas séparation des constituants du sédiment (par exemple particules de tourbe flottante) et que la tourbe ou le sédiment est suffisamment conditionné (voir également paragraphe 25 et Appendice 4). Il faut au moins caractériser le sédiment artificiel par l'origine de ses constituants, la distribution des tailles de grains (pourcentage de sable, limon et d'argile), sa teneur en carbone organique total (TCO), sa teneur en eau, et son pH. La mesure du potentiel redox est optionnelle.

25. Le cas échéant, par exemple dans des objectifs d'analyse spécifique, il est possible d'utiliser des sédiments naturels provenant de sites non pollués comme sédiments d'essai et/ou de culture (3). Toutefois, dans ce cas, il conviendra de les caractériser au moins par leur origine (site de collecte), leur pH et la teneur en ammoniac de l'eau interstitielle, la teneur en carbone organique total (TCO) et la teneur en azote, la distribution de tailles de particules (pourcentage de sable, de limon et d'argile) et la proportion d'eau (7)), et ils devront être exempts de toute contamination et d'autres organismes susceptibles d'entrer en compétition avec les organismes de l'essai ou d'en faire des proies. La mesure du potentiel redox et de la capacité d'échange de cations est optionnelle. Il est également recommandé d'adapter le sédiment naturel pendant 7 jours aux paramètres appliqués dans l'essai consécutif avant d'introduire la substance chimique d'essai. A la fin de cette période de conditionnement, il faut retirer et jeter l'eau sus-jacente.
26. La qualité du sédiment utilisé doit permettre la survie et la reproduction des organismes témoins tout au long de la période d'exposition, sans manifestation d'apparence ou de comportement anormal quelconque. Les vers témoins doivent s'enfouir dans le sédiment et l'ingérer. La reproduction dans les témoins doit au moins se conformer aux critères de validité présentés dans le paragraphe 13. La présence ou l'absence de granules fécaux sur la surface du sédiment, preuves de l'ingestion de sédiment par les vers, doit être notée et peut faciliter l'interprétation des résultats de l'essai relativement aux voies d'exposition. D'autres informations sur l'ingestion du sédiment peuvent être collectées par les méthodes décrites dans (24), (25), (44), et (45), qui caractérisent l'ingestion de sédiments ou la sélection de particules dans les organismes.
27. Les protocoles de manipulation des sédiments naturels avant leur utilisation au laboratoire sont décrits dans (3), (7) et (12). La préparation et le stockage du sédiment artificiel dont l'utilisation est recommandée dans l'essai sur *Lumbriculus* sont décrits dans l'Appendice 4.

Application de la substance chimique d'essai

28. La substance chimique d'essai doit être introduite dans le sédiment. La faible solubilité dans l'eau de la plupart des substances chimiques d'essai impose leur dissolution dans un solvant organique approprié (par exemple acétone, n-hexane, cyclohexane) dans un volume aussi faible que possible, lors de la préparation de la solution stock. La solution stock doit être diluée avec le même solvant pour préparer les solutions d'essai. Le choix d'un agent solubilisant approprié s'appuiera sur quelques critères majeurs, tels que la toxicité et la volatilité du solvant et la solubilité de la substance chimique d'essai dans le solvant choisi. Il convient d'employer à chaque concentration le même volume de solution correspondante. Le sédiment doit être chargé avec un grand volume à chaque concentration afin de modérer autant que possible la variabilité entre les expériences à concentrations identiques de substance chimique d'essai. Les solutions d'essai sont ensuite mélangées avec du sable quartzique comme il est décrit au paragraphe 22 (par exemple 10 g de sable quartzique par récipient expérimental). Un volume de 0,20 - 0,25 ml par g de sable s'est révélé suffisant pour immerger complètement le sable quartzique. Ensuite, le solvant doit être évaporé à sec. Pour limiter les déperditions de substance d'essai par co-évaporation (par exemple, liée à la pression de vapeur de la substance), le sable enrobé doit être utilisé immédiatement après séchage. Le sable sec est mélangé avec la quantité adéquate de sédiment formulé à la concentration correspondante. Lors de la préparation du sédiment, la quantité de sable introduite par le mélange de substance chimique d'essai et de sable doit être prise en compte (le sédiment doit donc être préparé avec la plus petite quantité de sable possible). Ce protocole a pour principal avantage de n'introduire que très peu de solvant dans le sédiment (7). Il est également possible, par exemple dans le cas d'un sédiment naturel, d'ajouter la substance chimique d'essai en incorporant une portion séchée et finement broyée du sédiment par le procédé décrit ci-dessus pour le sable quartzique ou en agitant la substance d'essai dans le sédiment humide, puis en évaporant la totalité de l'agent solubilisant utilisé. Il conviendra de s'assurer que la substance chimique d'essai ajoutée au sédiment est totalement et uniformément distribuée dans tout le sédiment. Le cas échéant, l'analyse de fractions d'échantillons permettra de confirmer les concentrations cibles dans le sédiment et de déterminer le degré d'homogénéité. L'analyse de fractions des solutions expérimentales peut également être utile pour confirmer les concentrations cibles dans le sédiment. Comme un solvant est utilisé pour déposer la substance chimique d'essai sur le sable quartzique, il faut employer un témoin de solvant préparé avec la quantité de solvant utilisée dans les sédiments de l'essai. La méthode adoptée pour la charge, et les raisons expliquant le choix d'un protocole de charge spécifique différent de celui décrit ci-dessus devront être indiquées. La méthode de charge doit être adaptée aux propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, afin d'éviter, par exemple, les pertes dues à la volatilisation pendant la charge ou l'équilibrage. D'autres recommandations sur les protocoles de charge sont présentées dans Environnement Canada (1995) (46).

29. Après la préparation du sédiment chargé, sa distribution dans des récipients d'essai en plusieurs exemplaires, et l'addition de l'eau d'essai, il est souhaitable de laisser la substance chimique d'essai se partager entre le sédiment et la phase aqueuse (par exemple (3)(7)(9)), de préférence, dans les conditions de températures et d'aération utilisées dans l'essai. La durée nécessaire pour atteindre l'équilibre dépend du sédiment et des produits chimiques et se situe entre quelques heures et quelques jours, dans de rares cas, atteint plusieurs semaines (4-5 semaines) (par exemple, (27)(47)). Dans cet essai, l'équilibre complet n'est pas requis, mais une période d'équilibrage de 48 heures à 7 jours est recommandée. La dégradation de la substance chimique d'essai est ainsi limitée dans le temps. Selon l'objectif de l'étude, par exemple, s'il faut reproduire les conditions environnementales, le sédiment chargé peut être équilibré ou vieilli pendant une durée plus longue.
30. Au terme de cette période d'équilibrage, des échantillons sont prélevés au moins dans la couche d'eau sus-jacente et dans la masse du sédiment, au moins à la concentration la plus élevée et à une concentration plus basse, afin d'analyser la concentration de la substance chimique d'essai. Ces mesures analytiques de la substance chimique d'essai doivent permettre le calcul du bilan massique et une expression des résultats fondée sur les concentrations initiales déterminées. Généralement, le prélèvement d'échantillon perturbe ou détruit le système sédiment-eau, c'est pourquoi, il n'est guère possible d'utiliser les mêmes expériences pour le prélèvement de sédiment et de vers. Il faudra préparer d'autres récipients "analytiques" de dimensions appropriées, que l'on traitera de manière identique (y compris par la présence des organismes d'essai), mais qui ne seront pas utilisés pour les observations biologiques. Les dimensions des récipients choisis devront permettre de prélever des quantités d'échantillons exigées par la méthode analytique. La technique de prélèvement est détaillée dans le paragraphe 53.

CONDUITE DE L'ESSAI

Essai préliminaire

31. Faute d'informations disponibles sur la toxicité de la substance chimique d'essai pour *Lumbriculus variegatus*, il est parfois utile de mener une expérience préliminaire afin de déterminer l'intervalle de concentrations qu'il convient de tester dans l'essai proprement dit, et d'optimiser les conditions de cet essai final. A cet effet, on utilise une série de concentrations largement espacées de la substance chimique d'essai. Les vers sont exposés à chaque concentration de la substance chimique d'essai pendant une durée (par exemple, 28 jours comme dans le test final) permettant d'estimer les concentrations expérimentales appropriées; on ne répète pas les expériences. On s'efforcera d'observer et d'enregistrer pendant le test préliminaire le comportement des vers, par exemple, leur tendance à éviter le sédiment, susceptible d'être induit par la substance chimique d'essai et/ou le sédiment. Les concentrations testées dans l'essai préliminaire ne dépasseront pas 1 000 mg/kg de poids sec de sédiment.

Essai final

32. Au moins cinq concentrations doivent être utilisées et sélectionnées pour l'essai proprement dit, en se fondant, par exemple, sur l'essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur (paragraphe 31), comme il est décrit dans les paragraphes 35, 36, 37 et 38.
33. Un témoin (pour le nombre d'expériences identiques, voir les paragraphes 36, 37 et 38) contenant tous les constituants à l'exception de la substance chimique d'essai est traité parallèlement à la série de l'essai. Il conviendra de démontrer, à l'aide d'un témoin ne contenant que du solvant, que l'agent solubilisant, quel qu'il soit, utilisé pour l'application de la substance chimique d'essai, ne présente aucun effet significatif sur les organismes expérimentaux.

Modèle de l'essai

34. Le modèle de l'essai définit le nombre des concentrations expérimentales et les intervalles qui les séparent, le nombre de récipients à chaque concentration et le nombre de vers ajoutés par récipient. La marche à suivre pour estimer une CE_x , la CESO et procéder à un essai limite est décrite dans les paragraphes 35, 36, 37 et 38.
35. La concentration avec effet (par exemple, CE_{50} , CE_{25} , CE_{10}), et l'intervalle de concentrations dans lequel l'effet de la substance chimique d'essai a un impact, doivent être encadrés par les concentrations incluses dans l'essai. Il faut éviter les extrapolations à des valeurs très inférieures à la concentration la plus faible qui affecte les organismes de l'essai, ou à des valeurs supérieures à la concentration la plus élevée de l'analyse. Si néanmoins, à titre exceptionnel, ce type d'extrapolation est calculé, la raison devra en être détaillée dans le rapport.

36. Pour estimer une CE_x , au moins cinq concentrations et trois expériences identiques par concentration au minimum devront être analysées; on recommande six répétitions pour le témoin ou, le cas échéant, pour le témoin de solvant, afin d'affiner l'estimation de la variabilité entre témoins. En tout état de cause, il est judicieux de tester suffisamment de concentrations pour obtenir une bonne estimation du modèle. Le facteur séparant les concentrations ne doit pas excéder deux (sauf dans les cas où la pente de la courbe de réponse en fonction de la concentration est faible). Le nombre d'expériences identiques par traitement peut être réduit si le nombre de concentrations expérimentales dont les réponses sont comprises dans l'intervalle de 5– 95 % est élevé. L'augmentation du nombre d'expérience identiques ou la réduction de l'intervalle des concentrations expérimentales restreint généralement les intervalles de confiance de l'essai.
37. Si l'estimation des valeurs de CMEO ou de CSEO est recherchée, au moins cinq concentrations expérimentales, chacune testée par au moins quatre expériences identiques (six sont recommandées pour le témoin, ou, le cas échéant, le témoin de solvant afin d'affiner l'estimation de la variabilité des témoins) doivent être analysées, et le facteur séparant les concentrations n'excédera pas deux. L'Appendice 6 fournit des informations sur la puissance statistique déterminée au cours de la vérification de l'hypothèse dans l'essai circulaire de la méthode.
38. La conduite d'un essai limite peut être envisagée (sur une seule concentration et des témoins) dans le cas où aucun effet n'est à prévoir jusqu'à 1 000 mg/kg de poids sec de sédiment (par exemple, d'après un essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur), ou dans le cas où l'analyse d'une concentration unique permet de confirmer une valeur de CSEO d'intérêt. Dans ce dernier cas, une justification détaillée du choix de la concentration seuil doit être intégrée au rapport d'essai. L'intérêt de l'essai limite est d'analyser une concentration suffisamment élevée pour légitimer la décision d'exclure tout éventuel effet toxique de la substance, et la limite est fixée à une concentration impossible à atteindre quelle que soit la situation. La limite recommandée est de 1 000 mg/kg (poids sec). Habituellement, il est nécessaire de répéter l'expérience six fois tant pour les échantillons traités que pour les témoins. L'Appendice 6 fournit des informations sur la puissance statistique déterminée au cours de la vérification de l'hypothèse dans l'essai circulaire de la méthode.

Conditions d'exposition

Organismes de l'essai

39. L'essai est réalisé sur au moins 10 vers pour chaque expérience incluse dans la détermination des paramètres biologiques. Ce nombre correspond à environ 50-100 mg de biomasse fraîche. Avec une teneur en matières sèches estimée de 17,1 % (48) chaque récipient contiendra environ 9 à 17 mg de biomasse sèche. U.S. EPA (2000 (7)) recommande l'utilisation d'un taux de charge n'excédant pas 1: 50 (biomasse sèche: TCO). Dans le cas du sédiment formulé décrit au paragraphe 22, ce taux de charge correspond à environ 43 g de sédiment (poids sec) pour dix vers à une teneur en TCO de 2,0 % de sédiment sec. A plus de 10 vers par récipient, il convient d'ajuster la quantité de sédiment et d'eau sus-jacente en conséquence.
40. Tous les vers utilisés dans un essai doivent provenir de la même source, et présenter un état physiologique similaire (voir Appendice 5). On choisira des vers de taille similaire (voir paragraphe 39). Il est préférable de peser une fraction du lot ou du stock de vers avant l'essai afin d'en estimer le poids moyen.
41. Les vers utilisés dans un essai sont prélevés dans la culture (pour plus de précisions, se reporter à l'Appendice 5). De gros animaux (adultes), ne présentant aucun signe de fragmentation récente, sont transférés dans des boîtes en verre (par exemple, boîtes de Petri) contenant de l'eau pure. Ils sont ensuite synchronisés par le procédé décrit dans l'Appendice 5. Après régénération pendant une période allant de 10 à 14 jours, des vers intacts et complets de taille similaire, nageant ou rampant activement après un léger stimulus mécanique, sont choisis pour l'essai. Lorsque les conditions de l'essai diffèrent des conditions de culture (par exemple, en termes de température, d'éclairement et d'eau sus-jacente), une phase d'acclimatation, par exemple, de 24 h avec des paramètres de température, d'éclairement et d'eau sus-jacente identiques à ceux de l'essai devrait suffire à l'adaptation des vers aux conditions de l'essai. Les oligochètes adaptés sont ensuite répartis au hasard dans les récipients de l'essai.

Alimentation

42. Les aliments sont ajoutés au sédiment avant (ou pendant) l'application de la substance chimique d'essai, et les vers ne sont donc plus nourris pendant l'essai.

Lumière et température

43. La photopériode appliquée pendant la culture et au cours de l'essai est généralement de 16 heures (3), (7). Pour représenter fidèlement conditions naturelles à la surface du sédiment, l'intensité lumineuse est réglée à bas niveau (par exemple, 100-500 lx), et elle est mesurée au moins une fois pendant la période d'exposition. La température doit se situer à $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ pendant tout l'essai. À chaque date de mesure, la température ne doit pas différer de plus de $\pm 1\text{ °C}$ entre les récipients de l'essai. Les récipients doivent être placés dans l'incubateur de l'essai ou la zone d'essai selon un modèle randomisé, afin de limiter le biais de reproduction dû à l'emplacement du récipient.

Aération

44. L'eau sus-jacente des récipients expérimentaux est soumise à une aération légère (par exemple, 2 - 4 bulles par seconde) à l'aide d'une pipette Pasteur placée environ 2 cm au-dessus de la surface du sédiment, pour en limiter les perturbations. Il conviendra de s'assurer que la concentration d'oxygène dissous ne chute pas en dessous de 30 % de sa valeur dans l'air saturé (VAS). L'apport d'air doit être contrôlé, et, le cas échéant, ajusté au moins quotidiennement les jours ouvrés.

Mesures de la qualité de l'eau

45. Les paramètres suivants caractérisant la qualité de l'eau doivent être mesurés dans l'eau sus-jacente:

Température:	au moins dans un récipient expérimental à chaque concentration et dans l'un des récipients des témoins une fois par semaine et au début et à la fin de la période d'exposition; si possible, la température dans le milieu environnant (air ambiant ou bain d'eau) est également enregistrée, par exemple, à intervalles d'une heure;
Teneur en oxygène dissous:	au moins dans un récipient expérimental à chaque concentration et dans l'un des récipients des témoins une fois par semaine et au début et à la fin de la période d'exposition; exprimée en mg/l et % de VAS (valeur dans l'air saturé);
Apport d'air:	il doit être contrôlé au moins une fois par jour les jours ouvrés, et, le cas échéant, ajusté;
pH:	au moins dans un récipient expérimental à chaque concentration et dans l'un des récipients des témoins une fois par semaine et au début et à la fin de la période d'exposition;
Dureté totale de l'eau:	au moins dans l'un des témoins et dans un récipient expérimental à la concentration la plus élevée au début et à la fin de la période d'exposition; exprimée en mg/l de CaCO_3 ;
Teneur totale en ammoniac:	au moins dans l'un des récipients des témoins et dans un récipient expérimental à chaque concentration au début de la période d'exposition, et ensuite trois fois par semaine; exprimée en mg/l de NH_4^+ ou de NH_3 ou en azote ammoniacal total.

Si la mesure des paramètres caractérisant la qualité de l'eau exige le prélèvement d'une quantité significative d'eau dans les récipients, il peut être préférable de préparer des récipients séparés pour les mesures de qualité de l'eau afin d'éviter de modifier le rapport volumique eau à sédiment.

Observations biologiques

46. Pendant l'exposition, la comparaison des récipients expérimentaux aux témoins permettra d'évaluer visuellement toutes les différences comportementales manifestées par les vers (par exemple, évitement du sédiment, granules fécaux visibles sur la surface du sédiment). Ces observations seront notées.

47. A la fin de l'essai, chaque récipient expérimental est examiné (les récipients supplémentaires destinés aux analyses chimiques peuvent être exclus de l'examen). Tous les vers du récipient expérimental sont récupérés par une méthode appropriée. On veillera à n'en endommager aucun. L'une des méthodes envisageable consiste à tamiser les vers dans le sédiment. A cet effet, on peut utiliser un tamis en acier inoxydable de taille de mailles appropriée. L'eau sus-jacente est décantée au maximum avec précaution, et le sédiment et l'eau résiduelle sont agités pour obtenir une suspension épaisse qui peut être tamisée. Sur des mailles de 500 µm, la majeure partie des particules de sédiment traverse le tamis très vite; le tamisage doit en effet être rapide afin d'éviter que les vers ne rampent dans le tamis, ni ne le traversent. Sur des mailles de 250 µm, les vers ne pourront pas s'échapper ainsi, mais il conviendra de s'assurer de retenir sur le tamis le moins possible de particules de sédiment. La suspension tamisée de chaque récipient peut être soumise à un second passage afin de garantir la récupération de la totalité des vers. Une autre méthode consiste à réchauffer le sédiment en plaçant les récipients expérimentaux dans un bain-marie à 50-60 °C; les vers sortent alors du sédiment et peuvent être recueillis à sa surface à l'aide d'une pipette à large ouverture polie au feu. Une autre méthode encore consiste à obtenir une suspension épaisse de sédiment et à la verser dans un bac peu profond de dimensions appropriées. Les vers sont ensuite prélevés dans la mince couche de suspension à l'aide d'une aiguille d'acier ou de pinces de bijoutier (il est préférable d'utiliser cet outil comme fourche plutôt que comme pinces pour éviter de blesser les vers) et les animaux sont transférés dans de l'eau pure. Après avoir été séparés de la suspension de sédiment, les vers sont rincés dans du milieu d'essai et comptés.
48. Quelle que soit la méthode utilisée, le laboratoire doit démontrer que son personnel parvient à récupérer en moyenne au moins 90 % des organismes dans le sédiment entier, par exemple, en ajoutant un certain nombre d'organismes d'essai au sédiment témoin ou à des sédiments expérimentaux et en déterminant leur récupération au bout de 1 h (7).
49. Le nombre total d'individus vivants et morts par expérience est noté et évalué. Les vers sont considérés morts s'ils appartiennent à l'un des groupes suivants:

- a) aucune réaction n'est obtenue après un stimulus mécanique léger
- b) des signes de décomposition sont observés (en combinaison avec "a")
- c) il manque un certain nombre de vers

De surcroît, les vers vivants peuvent être affectés à l'une des trois catégories suivantes:

- a) gros vers complets (adultes) sans régions corporelles régénérées
- b) vers complets comportant des régions corporelles régénérées de couleur plus claire (par exemple, dotés d'une nouvelle partie postérieure, d'une nouvelle partie antérieure ou des deux)
- c) vers incomplets (c'est-à-dire vers récemment fragmentés dont certaines régions corporelles ne sont pas régénérées)

Ces observations complémentaires ne sont pas obligatoires, mais peuvent enrichir l'interprétation des résultats biologiques (par exemple, un nombre élevé de vers inclus dans la catégorie c peut indiquer un retard de reproduction ou de régénération induit par un traitement donné). De surcroît, si l'on observe entre les vers traités et témoins des différences d'apparence (par exemple lésion des phanères, sections du corps oedémateuses), il faut les noter.

50. Immédiatement après le comptage et l'évaluation, les vers vivants retrouvés dans chaque récipient expérimental sont transférés dans des plateaux de balance séchés, tarés et marqués (un par répétition), puis ils sont tués à l'aide d'une goutte d'éthanol par plateau. Les plateaux sont placés dans une étuve à 100 ± 5 °C pour un séchage d'une nuit, puis ils sont pesés après refroidissement dans un dessiccateur, et le poids sec des vers est déterminé (de préférence en grammes, au moins 4 chiffres après la virgule).
51. Outre le poids sec total, on peut déterminer le poids sec sans les cendres selon la description de (49) afin de prendre en compte les composants inorganiques issus du sédiment, ingérés et présents dans le tractus alimentaire des vers.
52. La biomasse déterminée est la biomasse totale par expérience identique, incluant les vers adultes et jeunes. Les vers morts n'entrent pas en ligne de compte dans cette détermination.

Vérification des concentrations de substance chimique d'essai

Prélèvement des échantillons

53. Il faut prélever des échantillons pour l'analyse chimique de la substance chimique d'essai au moins à la concentration la plus élevée et à une concentration inférieure, au moins à la fin de la phase d'équilibrage (avant l'addition des organismes de l'essai) et à la fin de l'essai. Il faut au moins analyser des échantillons prélevés dans la masse du sédiment et dans l'eau sus-jacente. Au moins deux échantillons doivent être prélevés par matrice et par traitement à chaque date de prélèvement. L'un des échantillons en double peut être stocké en réserve (puis analysé, par exemple, dans le cas où les résultats de l'analyse initiale sont en dehors de l'intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale). Si la substance chimique présente des propriétés spécifiques, par exemple, si sa dégradation rapide est à prévoir, le dispositif analytique doit être ajusté (par exemple, prélèvements plus fréquents, analyse d'un plus grand nombre de concentrations), en s'en remettant à l'avis d'un expert. Il est possible de prélever des échantillons à des dates intermédiaires (par exemple, sept jours après le début de l'exposition).
54. Il faut prélever les échantillons d'eau sus-jacente en décantant ou en siphonnant avec précaution l'eau de façon à perturber au minimum le sédiment. Le volume des échantillons doit être consigné.
55. Après retrait de l'eau sus-jacente, le sédiment doit être homogénéisé, puis transféré dans un récipient approprié. Le poids de l'échantillon de sédiment humide est noté.
56. Dans les cas où il est nécessaire d'analyser en sus la substance chimique d'essai dans l'eau interstitielle, les échantillons de sédiments homogénéisés et pesés sont centrifugés pour séparer cette eau. On peut par exemple introduire environ 200 ml de sédiment humide dans des béchers à centrifugation de 250 ml. Les échantillons sont ensuite centrifugés sans filtration afin d'isoler l'eau interstitielle, par exemple à $10\,000 \pm 600 \times g$ pendant 30 - 60 min à une température inférieure ou égale à la température utilisée dans l'essai. Après centrifugation, le surnageant est décanté ou prélevé à la pipette en prenant soin de n'introduire aucune particule de sédiment, et son volume est noté. Le poids du culot de sédiment résiduel est également enregistré. Cette mesure peut contribuer à l'estimation du bilan massique ou de la récupération de la substance chimique d'essai dans le système eau-sédiment lorsque le poids sec du sédiment est déterminé à chaque date de prélèvement. Dans certains cas, il est impossible d'analyser les concentrations dans l'eau interstitielle, car le volume de l'échantillon est trop faible.
57. Si l'analyse n'est pas immédiate, il faut stocker tous les échantillons en suivant un protocole adéquat, par exemple dans des conditions de stockage recommandées pour une dégradation minimale de la substance chimique d'essai spécifique (par exemple, les échantillons prélevés dans l'environnement sont habituellement stockés à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans l'obscurité). Il convient d'obtenir des informations sur les conditions convenant à la substance chimique d'essai donnée — par exemple, durée et température de stockage, protocole d'extraction, etc. — avant le début de l'étude.

Méthode analytique

58. L'ensemble du protocole reposant essentiellement sur l'exactitude, la précision et la sensibilité de la méthode analytique utilisée sur la substance chimique d'essai, il faut vérifier expérimentalement que la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique, ainsi que la récupération de la substance d'essai à partir de l'eau et des échantillons de sédiment, conviennent à la méthode particulière, au moins aux concentrations la plus élevée et la plus basse de l'essai. On vérifiera également que la substance chimique d'essai est indétectable dans les récipients témoins à des concentrations supérieures à la limite de quantification. S'il y a lieu, les concentrations nominales seront corrigées pour tenir compte des charges récupérées dans les témoins de contrôle de qualité (par exemple, si la récupération est en dehors de l'intervalle 80 - 120 % de la quantité introduite). Pendant toute la durée de l'essai, tous les échantillons sont manipulés de façon à réduire au minimum la contamination et les déperditions (par exemple, du fait de l'adsorption de la substance chimique d'essai sur le dispositif de prélèvement).
59. Il faut enregistrer et indiquer la récupération de la substance chimique d'essai, la limite de quantification et la limite de détection dans le sédiment et l'eau.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

60. Les principales variables de réponses de l'essai qu'il est impératif d'évaluer statistiquement sont la biomasse et le nombre total de vers par expérience. On peut également choisir d'évaluer la reproduction (augmentation des nombres de vers) et la croissance (augmentation de la biomasse sèche). Dans ce cas, il faut estimer le poids sec des vers au début de l'exposition, par exemple par mesure du poids sec d'une fraction d'échantillon représentative du lot des vers synchronisés utilisés dans l'essai.

61. Même si la mortalité n'est pas l'un des résultats proprement dits de cet essai, il convient de l'évaluer dans la mesure du possible. À cet effet, sont considérés comme morts les vers qui ne réagissent pas à un stimulus mécanique léger ou qui présentent des signes de décomposition, ou les vers manquants. Les mortalités doivent être à tout le moins notées et prises en compte lors de l'interprétation des résultats de l'essai.
62. Les concentrations avec effet doivent être exprimées en mg/kg de poids sec de sédiments. Si 80 à 120 % des concentrations nominales de la substance chimique d'essai sont récupérés dans le sédiment, ou dans le sédiment et l'eau sus-jacente au début de l'exposition, les concentrations avec effet (CE_x , CSEO, CMEO) peuvent être rapportées aux concentrations nominales. Si le taux de récupération s'écarte des concentrations nominales de plus de ± 20 %, les concentrations avec effet (CE_x , CSEO, CMEO) sont rapportées aux concentrations initialement mesurées au début de l'exposition, par exemple en tenant compte du bilan massique de la substance chimique d'essai dans le système expérimental (voir paragraphe 30). Dans ce cas, des informations supplémentaires peuvent être tirées de l'analyse des solutions stocks ou des solutions d'application afin de confirmer que les sédiments de l'essai ont été préparés correctement.

CE_x

63. Les valeurs CE_x relatives aux paramètres décrits au paragraphe 60 sont calculées par des méthodes statistiques adéquates (par exemple analyse par la méthode des probits, fonction logistique ou de Weibull, méthode abrégée de Spearman-Kärber, ou interpolation simple). Des informations sur l'évaluation statistique sont présentées dans (15) et (50). Une CE_x est calculée en incorporant une valeur correspondant à x % de la valeur du témoin dans l'équation. Le calcul de la CE_{50} ou de toute autre CE_x , implique la soumission des moyennes par traitement ($\bar{X}$) à une analyse de régression.

CSEO/CMEO

64. Dans le cas d'une analyse statistique visant à déterminer la CSEO ou la CMEO, il est nécessaire d'appliquer une analyse statistique par récipient (les récipients individuels sont considérés comme des répétitions). Il convient d'utiliser des méthodes statistiques adéquates. En général, les effets indésirables de la substance d'essai, relativement au témoin, sont étudiés en utilisant une vérification de l'hypothèse unilatérale (plus faible) à $p < 0,05$. Des exemples sont présentés dans les paragraphes suivants. On trouvera des renseignements sur le choix des méthodes statistiques appropriées dans (15) et (50).
65. La distribution normale des données peut être analysée, par exemple, par le test de validité de l'ajustement de Kolmogorov-Smirnov, le test du rapport intervalle à écart-type (test R/s) ou le test de Shapiro-Wilk (bilatéral, $p \leq 0,05$). Le test de Cochran, le test de Levene ou le test de Bartlett (bilatéral, $p \leq 0,05$) peuvent être utilisés pour analyser l'homogénéité de la variance. Lorsque les prérequis des protocoles de tests paramétriques (normalité, homogénéité de la variance) sont satisfaits, une analyse de la variance à un facteur (ANOVA), puis des tests multi-comparaisons peuvent être appliqués. Des comparaisons par paires (par exemple, test-t de Dunnett) ou des tests d'analyse de tendance descendante (par exemple test de William) peuvent permettre de calculer d'éventuelles différences significatives ($p \leq 0,05$) entre les témoins et les diverses concentrations de substance d'essai. Dans le cas contraire, des méthodes non paramétriques (test U de Bonferroni selon Holm ou test de tendance de Jonckheere-Terpstra) permettront le calcul de la CSEO et de la CMEO.

Essai limite

66. Lorsqu'un essai limite (comparaison du témoin et d'un seul traitement) a été effectué et que les prérequis des protocoles de test paramétrique (normalité, homogénéité) sont satisfaits, on peut évaluer les réponses métriques (nombre total de vers et biomasse en poids sec de vers) par le test de Student (test-t). Le test t avec variance inégale (test t de Welch) ou un test non paramétrique, tel que le test U de Mann-Whitney peut être utilisé lorsque ces conditions ne sont pas remplies. L'Appendice 6 fournit des informations sur la puissance statistique déterminée au cours de la vérification de l'hypothèse dans l'essai circulaire de la méthode.
67. La détermination des différences significatives entre les témoins (témoin et témoin de solvant) peut faire appel à l'analyse de plusieurs expériences identiques pour chaque témoin comme il est décrit pour l'essai limite. S'il n'est détecté aucune différence significative, toutes les expériences identiques témoins et témoins de solvant peuvent être réunies. Si ce n'est pas le cas, tous les traitements doivent être comparés avec le témoin de solvant.

Interprétation des résultats

68. Les résultats doivent être interprétés avec prudence lorsque l'essai s'écarte de la présente méthode d'essai, et lorsque les concentrations mesurées de l'essai approchent la limite de détection de la méthode analytique utilisée. Tout écart par rapport à cette méthode d'essai doit être noté.

Rapport d'essai

69. Le rapport d'essai comprend au moins les informations suivantes:

— *Substance chimique d'essai:*

- données permettant l'identification chimique (nom courant, nom chimique, formule structurale, numéro CAS, etc.), notamment pureté et méthode analytique de quantification de la substance chimique d'essai; source de la substance d'essai, identité et concentration de tous les solvants utilisés.
- toutes les informations disponibles sur la nature physique et les propriétés physico-chimiques recueillies antérieurement au début de l'essai (par exemple, solubilité dans l'eau, pression de vapeur, coefficient de partage dans le sol (ou dans le sédiment si possible), $\log K_{ow}$, stabilité dans l'eau, etc.);

— *Espèce expérimentale:*

- nom scientifique, source, toutes les conditions de prétraitement, d'acclimatation, de culture, etc.

— *Conditions expérimentales:*

- protocole d'essai utilisé (par exemple, statique, semi-statique ou à écoulement continu);
- modèle de l'essai (par exemple, nombre, matière et dimensions des récipients d'essai, volume d'eau par récipient, masse et volume de sédiment par récipient (pour les protocoles à écoulement continu ou semi-statique: vitesse de remplacement du volume d'eau), toute aération utilisée avant et pendant l'essai, nombre d'expériences identiques, nombre de vers par expérience au début de l'exposition, nombre de concentrations de l'essai, durée du conditionnement, périodes d'équilibrage et d'exposition, des prélèvements);
- profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente;
- méthode de prétraitement de la substance chimique d'essai et charge/application;
- concentrations nominales de l'essai, précisions sur le prélèvement des échantillons destinés à l'analyse chimique, et sur les méthodes analytiques de détermination des concentrations de la substance chimique d'essai;
- caractéristiques du sédiment, selon la description des paragraphes 24 - 25, et toute autre mesure; préparation du sédiment formulé;
- préparation de l'eau de l'essai (dans le cas où l'on utilise de l'eau reconstituée) et ses caractéristiques (concentration d'oxygène, pH, conductivité, dureté, et toute autre mesure réalisée) avant le début de l'essai;
- précisions sur l'alimentation, notamment le type d'aliments, leur préparation, leur quantité et le régime alimentaire;
- intensité lumineuse et photopériodes;
- méthodes utilisées pour la détermination de tous les paramètres biologiques (par exemple prélèvements d'échantillons, examen, pesée des organismes expérimentaux), et de tous les paramètres abiotiques (par exemple, paramètres de qualité de l'eau et du sédiment);
- volumes et/ou poids de tous les échantillons destinés à l'analyse chimique;
- information détaillée sur le traitement de tous les échantillons destinés à l'analyse chimique, notamment précisions sur la préparation, le stockage, les protocoles de charge, l'extraction et les protocoles analytiques (et leur précision) concernant la substance chimique d'essai, et récupérations de la substance chimique d'essai.

— *Résultats:*

- qualité de l'eau dans les récipients expérimentaux (pH, température, concentration d'oxygène dissous, dureté, concentration d'ammoniac et toute autre mesure réalisée);
- teneur en carbone organique total (COT), rapport poids sec à poids frais, pH du sédiment et toute autre mesure réalisée;
- nombre total, et s'il a été déterminé, nombre de vers complets et incomplets dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai;
- poids sec des vers dans chaque récipient à la fin de l'essai, et, le cas échéant, poids sec d'une fraction des vers au début de l'essai;
- tout comportement anormal observé par rapport aux témoins (par exemple, évitement du sédiment, présence ou absence de granules fécaux);
- toute mortalité observée;
- estimations des effets toxiques (par exemple, CE_x , CSEO et/ou CMEO), et méthodes statistiques utilisées pour leur détermination;
- concentrations nominales de l'essai, concentrations mesurées de l'essai et résultats de toutes les analyses effectuées pour déterminer la concentration de la substance chimique d'essai dans les récipients expérimentaux;
- tout écart par rapport aux critères de la validité.

— *Evaluation des résultats:*

- conformité des résultats aux critères de validité indiqués dans le paragraphe 13;
- discussion des résultats, notamment sur une influence éventuelle sur les résultats de l'essai de modifications apportées à la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) EC (2003). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I — IV. Office for Official Publications of the EC (European Commission), Luxembourg.
- (2) OCDE (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris.
- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment- Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. et Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (6) Chapitre C.27 de la présente annexe, "Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment dopé".
- (7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment- associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

- (8) Environnement Canada (1997). Essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*) dans les sédiments. Méthode d'essai biologique. Rapport SPE 1/RM/32. Decembre 1997.
- (9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).
- (10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.
- (11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.
- (12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.
- (13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (14) OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (15) Environnement Canada (2003). Document d'orientation sur les methodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité; première version, mars 2003; Rapport EPS 1/RM/
- (16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.
- (17) Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.
- (18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271-278.
- (19) Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.
- (20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 12(7):1261-1266.
- (21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57-63.
- (22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.
- (23) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.
- (24) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

- (25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg, M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 292-302.
- (27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty, J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 872-885.
- (29) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ¹⁴C-17 α -ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. *Chemosphere* 59, 271-280.
- (31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chemistry*, Vol. 20, pp. 2000-2007.
- (32) Oetken, M., K.-U. Ludwigowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.
- (33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- (34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 235/236: 407-414.
- (35) Drewes C.D. & Fournier C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Develop. Biol.* 138: 94-103.
- (36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22*.
- (37) Chapitre C.1 de la présente annexe, Toxicité aiguë vis-à-vis des poissons.
- (38) OCDE (1992c). Ligne directrice pour les essais de produits chimiques. No. 210: poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie OCDE, Paris.
- (39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. *Chemosphere* 35, 835-852.
- (40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety*, 39, 10-20.
- (41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on "Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (42) Suedel, B.C. et Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (43) Naylor, C. et C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere* 31: 3291-3303.
- (44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.

- (45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* 8, 111-124.
- (46) Environnement Canada (1995). Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiments de contrôle dopés avec un produit toxique de référence. Environmental Protection Series Rapport EPS 1/RM/30.
- (47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Technol.* 23, 588-595.
- (48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 223-228.
- (49) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.
- (50) OCDE 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OCDE, Paris, France.
- (51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Allemagne. pp. 107-119.

Références complémentaires sur les protocoles statistiques:

- Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20, 482-491.
- Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis* (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- Finney, D.J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay*. Charles Griffin & Company Ltd, London.
- Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; Correction: *Environ. Sci. Technol.* 12 (1998), 417.
- Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- Sokal, R.R. et F.J. Rohlf. (1981) *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- Miller, R.G., Jr. (1986). *Beyond ANOVA, basics of applied statistics*. John Wiley & Sons. New York.
- Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591-611.
- Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, 103-117.
- Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, 519-531.
-

Appendice 1

Définitions

Aux fins de la présente méthode d'essai, les définitions suivantes sont utilisées:

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Période de conditionnement: période employée pour stabiliser le composant microbien du sédiment et éliminer, par exemple, l'ammoniac issu des composants du sédiment; elle se déroule avant l'introduction dans le sédiment de la substance chimique d'essai. Habituellement, on élimine l'eau sus-jacente après conditionnement.

CE_x: concentration de substance chimique d'essai dans le sédiment qui provoque un effet de X % (par exemple 50 %) sur un paramètre biologique après une durée d'exposition donnée.

Période d'équilibrage: période utilisée pour que la substance chimique d'essai se répartisse entre la phase solide, l'eau interstitielle et l'eau sus-jacente; elle se déroule après l'introduction dans le sédiment de la substance chimique d'essai et avant l'addition des organismes expérimentaux.

Phase d'exposition: durée pendant laquelle les organismes expérimentaux sont exposés à la substance chimique d'essai.

Sédiment formulé ou sédiment reconstitué, artificiel ou synthétique: mélange de matériaux employés pour simuler les composants physiques d'un sédiment naturel.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO): la concentration la plus faible analysée d'une substance chimique d'essai à laquelle on a observé un effet toxique significatif de la substance (à $p \leq 0,05$) par rapport au témoin. Toutefois, toutes les concentrations de l'essai supérieures à la CMEO doivent présenter un effet égal ou supérieur à celui de la CMEO. Si ces deux conditions ne sont pas satisfaites, une explication exhaustive doit justifier le choix de la CMEO (et par conséquent de la CSEO).

Concentration sans effet observé (CSEO): la concentration de l'essai immédiatement inférieure à la CMEO qui, si on se réfère au témoin, ne présente aucun effet statistiquement significatif ($p \leq 0,05$), après une exposition pendant une période donnée.

Coefficient de partage octanol-eau (K_{oe} , parfois exprimé par P_{oe}): rapport de la solubilité d'une substance dans le n-octanol et dans l'eau à l'équilibre; correspond à la lipophilie d'une substance (Chapitre A.24 de la présente annexe). Le K_{oe} ou le logarithme de K_{oe} ($\log K_{oe}$) sert d'indicateur de la bioaccumulation d'une substance par des organismes aquatiques.

Coefficient de partage carbone organique-eau (K_{co}): rapport de la concentration d'une substance chimique dans/ sur la fraction de carbone organique d'un sédiment et de la concentration de substance dans l'eau à l'équilibre.

Eau sus-jacente: l'eau qui recouvre le sédiment dans le récipient expérimental.

Eau interstitielle: l'eau qui occupe les espaces entre les particules de sédiment ou de sol.

Sédiment chargé: sédiment auquel a été ajoutée la substance chimique d'essai.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Appendice 2

Composition de l'eau reconstituée recommandée

[Adapté du chapitre C.1 de la présente annexe (1)]

a) *Solution de chlorure de calcium*

Dissoudre 11,76 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau désionisée; ajuster à 1 l avec de l'eau désionisée

b) *Solution de sulfate de magnésium*

Dissoudre 4,93 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau désionisée; ajuster à 1 l avec de l'eau désionisée

c) *Solution de bicarbonate de sodium*

Dissoudre 2,59 g de NaHCO_3 dans de l'eau désionisée; ajuster à 1 l avec de l'eau désionisée

d) *Solution de chlorure de potassium*

Dissoudre 0,23 g de KCl dans de l'eau désionisée; ajuster à 1 l avec de l'eau désionisée

Tous les produits chimiques doivent être de qualité analytique.

La conductivité de l'eau distillée ou désionisée ne doit pas excéder $10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

On mélange de 25 ml de chaque solution de (a) à (d) et on ajuste le volume total à 1 l avec de l'eau désionisée. La somme des concentrations d'ions calcium et magnésium dans ces solutions est égale à 2,5 mmol/l.

La proportion d'ions Ca:Mg est égale à 4:1 et celle des ions Na:K 10:1. La capacité acide $K_{s4,3}$ de cette solution est égale à 0,8 mmol/l.

Aérer l'eau de dilution jusqu'à obtenir une saturation en oxygène, puis la stocker pendant environ 2 jours sans autre aération avant utilisation.

RÉFÉRENCE

- 1). Chapitre C.1 de la présente annexe, Toxicité aiguë vis-à-vis des poissons.

Appendice 3

Caractéristiques physiques et chimiques d'une eau de dilution admissible

Constituant	Concentrations
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 µg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux plus biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l
[Adapté de OCDE 1992 (1)]	

RÉFÉRENCE

- (1) OCDE (1992) Ligne directrice pour les essais de produits chimiques N° 210: poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie OCDE, Paris.

Appendice 4

Sédiment artificiel recommandé — prescriptions pour la préparation et le stockage**Constituants du sédiment**

Constituant	Caractéristiques	% de poids sec de sédiment
Tourbe	Tourbe à sphaignes, degré de décomposition: "moyen", séchée à l'air, aucun résidu végétal visible, finement broyée (taille de particule $\leq 0,5$ mm)	$5 \pm 0,5$
Sable quartzique	Dimension des particules: ≤ 2 mm, mais > 50 % des particules doivent mesurer entre 50 et 200 μm	75 - 76
Argile kaolinite	Taux de kaolinite ≥ 30 %	20 ± 1
Source d'aliment	par exemple, poudre d'Urtica (Folia urticae), feuilles d'Urtica dioica (ortie), finement broyées (taille des particules $\leq 0,5$ mm); conformes aux normes pharmaceutiques pour la consommation humaine; additionnées au sédiment sec	0,4 - 0,5 %
Carbone organique	Ajusté par addition de tourbe et de sable	$2 \pm 0,5$
Carbonate de calcium	CaCO_3 , pulvérisé, chimiquement pur, ajouté au sédiment sec	0,05 - 1
Eau désionisée	Conductivité ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$, ajoutée au sédiment sec	30 - 50

Note: si des concentrations élevées d'ammoniac sont à prévoir, par exemple, s'il est notoire que la substance chimique d'essai inhibe la nitrification, il peut être utile de remplacer 50 % de la poudre d'orties riche en azote par de la cellulose [par exemple poudre d' α -cellulose, chimiquement pure, taille de particules $\leq 0,5$ mm; (1) (2)].

Préparation

La tourbe est séchée à l'air et broyée en une fine poudre. Une suspension de la quantité requise de poudre de tourbe dans de l'eau désionisée est préparée à l'aide d'un dispositif d'homogénéisation à haute performance. Le pH de cette suspension est ajusté à $5,5 \pm 0,5$ avec du CaCO_3 . La suspension est conditionnée pendant au moins deux jours sous agitation douce, à 20 ± 2 °C, afin de stabiliser le pH et d'établir une flore microbienne stable. Le pH est à nouveau mesuré et doit alors être égal à $6,0 \pm 0,5$. Ensuite, la suspension de tourbe est mélangée avec les autres constituants (sable et argile kaolinique) et de l'eau désionisée afin d'obtenir un sédiment homogène dont la teneur en eau est comprise dans l'intervalle de 30 à 50 % de poids sec du sédiment. Le pH du mélange final est à nouveau mesuré et ajusté entre 6,5 et 7,5 avec du CaCO_3 , s'il y a lieu. Néanmoins, si l'on prévoit un dégagement d'ammoniac, il peut être utile de maintenir le pH du sédiment en dessous de 7,0 (par exemple, entre 6,0 et 6,5). On prélève des échantillons de sédiment afin d'en déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Si l'on prévoit un dégagement d'ammoniac, le sédiment formulé peut être conditionné pendant sept jours dans les conditions appliquées dans l'essai consécutif (par exemple, rapport sédiment-eau 1:4, profondeur de la couche de sédiment

identique à celle introduite dans les récipients expérimentaux) avant d'y introduire la substance chimique d'essai, c'est-à-dire qu'il doit être recouvert d'eau impérativement aérée. À la fin de la période de conditionnement, l'eau sus-jacente doit être retirée et jetée. On mélange ensuite le sable quartzique chargé avec le sédiment pour chaque dose de traitement, on répartit le sédiment dans les récipients expérimentaux pour expériences identiques, et on les recouvre de l'eau de l'essai. Les récipients sont ensuite incubés dans les conditions appliquées dans l'essai consécutif. Cet événement marque le début de la période d'équilibrage. L'eau sus-jacente doit être aérée.

La source d'aliments choisie doit être ajoutée avant ou pendant l'introduction de la substance chimique d'essai dans le sédiment. On peut la mélanger préalablement avec la suspension de tourbe (voir ci-dessus). Toutefois, une dégradation trop importante de la source d'aliments avant l'addition des organismes expérimentaux — par exemple, dans le cas d'une longue durée d'équilibrage — peut être évitée en réduisant autant que possible la période qui s'écoule entre l'addition des aliments et le début de l'exposition. Pour garantir la charge des aliments par le composé d'essai, il convient de mélanger la source d'aliment avec le sédiment au plus tard le jour de l'introduction de la substance chimique d'essai dans le sédiment.

Stockage

Les constituants secs du sédiment artificiel peuvent être stockés dans un endroit sec et frais ou à température ambiante. Le sédiment préparé chargé de la substance chimique d'essai est de préférence utilisé immédiatement dans l'essai. Les échantillons de sédiment chargés peuvent être stockés dans les conditions recommandées pour la substance d'essai particulière jusqu'à analyse.

RÉFÉRENCES

- (1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Allemagne. pp. 107-119.

Appendice 5

Méthodes de culture de *lumbriculus variegatus*

Lumbriculus variegatus (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochete vit dans les sédiments d'eau douce et est largement utilisé dans les essais écotoxicologiques. Il est facile à cultiver en conditions de laboratoire. Une description générale des méthodes de culture est donnée dans les paragraphes suivants.

Méthodes de culture

Les conditions de culture de *Lumbriculus variegatus* sont détaillées dans Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Un bref résumé de ces conditions est présenté ci-dessous. Le principal avantage de *L. variegatus* est sa reproduction rapide, qui permet une augmentation rapide de la biomasse dans les populations cultivées au laboratoire [par exemple (1), (3), (4), (5)].

Les vers peuvent être cultivés dans de grands aquariums (57 — 80 l) à 23 °C avec une photopériode de 16 h de lumière (100 — 1 000 lx) et 8 h d'obscurité en renouvelant quotidiennement l'eau naturelle (45 - 50 l par aquarium). Le substrat est préparé en découpant en bandes des serviettes en papier gris non blanchi qui peuvent ensuite être mélangées avec l'eau de culture pendant quelques secondes pour donner des petits morceaux de substrat de papier. Ce substrat peut ensuite être directement utilisé pour recouvrir le fond du réservoir de l'aquarium de culture de *Lumbriculus*, ou il peut être stocké congelé dans de l'eau désionisée pour une utilisation ultérieure. Chaque nouvel apport de substrat dans le réservoir dure généralement environ deux mois.

On démarre chaque culture de vers avec 500 — 1 000 vers, que l'on nourrit par une suspension de 10 ml contenant 6 g d'aliment de culture de départ pour truites 3 fois par semaine dans des conditions de renouvellement ou d'écoulement de l'eau. Si les cultures sont statiques ou semi-statiques, il faut réduire les vitesses d'alimentation pour prévenir la croissance bactérienne et fongique.

Dans ces conditions, le nombre d'individus dans la culture double habituellement en environ 10 à 14 jours.

Il est également possible de cultiver *Lumbriculus variegatus* dans un système constitué d'une couche de sable quartzique employé pour le sédiment artificiel (1 - 2 cm de profondeur) additionnée d'eau reconstituée. On peut utiliser comme récipient de culture des conteneurs en verre ou en acier inoxydable de 12 à 20 cm de haut. L'eau doit être légèrement aérée (par exemple, 2 bulles par seconde) par l'intermédiaire d'une pipette Pasteur placée environ 2 cm au-dessus de la surface du sédiment. Afin d'éviter toute accumulation, d'ammoniac par exemple, il convient d'échanger l'eau sus-jacente à l'aide d'un système à écoulement continu, ou bien au moins une fois par semaine manuellement. Les oligochètes peuvent être cultivés à température ambiante avec une photopériode de 16 heures de lumière (intensité 100 - 1 000 lx) et 8 heures d'obscurité. Dans le cas d'une culture semi-statique (renouvellement de l'eau une fois par semaine), les vers sont nourris de TetraMine deux fois par semaine (par exemple, 0,6 - 0,8 mg par cm² de surface de sédiment), aliment qui peut être fourni sous forme d'une suspension de 50 mg de TetraMine par ml d'eau désionisée.

Lumbriculus variegatus peut être prélevé dans des cultures, par exemple par transfert dans un nouveau bécber du substrat avec un filet à mailles fines ou transfert des organismes à l'aide d'une pipette en verre à large ouverture (environ 5 mm de diamètre) polie au feu. Lorsque du substrat est transféré en même temps dans ce bécber, le récipient contenant les vers et le substrat est placé une nuit dans des conditions d'écoulement continu, qui permettront l'élimination du substrat, tout en laissant les vers au fond du récipient. On peut ensuite les introduire dans des réservoirs de culture préparés extemporanément ou les traiter ensuite pour l'essai comme il est décrit dans (3) et (4) ou dans les paragraphes suivants.

Il convient de considérer avec attention le mode de reproduction de *L. variegatus* dans les essais sur sédiment lorsqu'on utilise cet animal (architomie ou morphallaxie, par exemple (6)). Ce mode de reproduction asexuée produit deux fragments, qui ne s'alimentent plus pendant un certain temps jusqu'à ce que les segments de tête et de queue se régénèrent (par exemple, (7) (8)). Par conséquent, l'exposition de *L. variegatus* par ingestion de sédiment contaminé n'est pas un processus continu.

Par conséquent, il convient de procéder à une synchronisation pour réduire au minimum la reproduction et la régénération incontrôlées, source de variation élevée dans les résultats de l'essai. Cette variation peut découler d'une moindre exposition à la substance chimique d'essai de certains individus qui se sont fragmentés et ne se sont pas alimentés pendant une certaine période de temps, alors que d'autres individus ne se sont pas fragmentés pendant l'essai (9), (10), (11). Dix à 14 jours avant le début de l'exposition, les vers doivent être artificiellement fragmentés (synchronisation). Il faut choisir pour la synchronisation des gros vers (adultes), qui, de préférence, ne présentent aucun signe de morphallaxie récente. Ces vers sont placés sur une lame de verre dans une goutte d'eau de culture, et la région corporelle médiane est disséquée au scalpel. On s'assurera que les extrémités

postérieures sont de tailles similaires. Les extrémités postérieures régénèrent ensuite de nouvelles têtes dans un récipient de culture contenant le substrat utilisé dans la culture et de l'eau reconstituée, jusqu'au début de l'exposition. La régénération de nouvelles têtes est signalée par l'enfouissement des vers synchronisés dans le substrat (la présence de têtes régénérées peut être confirmée par l'examen d'une fraction d'échantillon représentative au microscope binoculaire). On estime alors que les organismes expérimentaux sont tous dans un état physiologique similaire, c'est-à-dire que lorsqu'une reproduction par morphallaxie a lieu chez des vers synchronisés pendant l'essai, on estime que pratiquement tous les animaux sont également exposés au sédiment chargé. Les vers synchronisés doivent être alimentés une fois dès que les vers commencent à s'enfouir dans le substrat, ou 7 jours après la dissection. Le régime alimentaire doit être comparable à celui des cultures normales, mais il est préférable d'alimenter les vers synchronisés par la même source d'aliments que celle utilisée dans l'essai. Les vers doivent être maintenus à une température d'essai à 20 ± 2 °C. Après régénération, les vers complets intacts, qui nagent ou rampent activement après un léger stimulus mécanique, sont utilisés dans l'essai. Il convient de prévenir les lésions ou l'autotomie des vers, par exemple, en utilisant pour les manipuler des pipettes à bords polis au feu et ou des cure-dents en acier inoxydable.

Sources de cultures de départ de *Lumbriculus variegatus* [adresses aux États-Unis issues de (4)]

Europe

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Allemagne

Bayer Crop Science AG
Development — Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Allemagne

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finlande

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Allemagne

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

U.S.A.

Agence de protection de l'environnement des États-Unis
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Université d'état du Michigan
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

Agence de protection de l'environnement des États-Unis
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Université d'état de Wright
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 4543

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research
Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

RÉFÉRENCES

- (1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. et Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 269-279.
- (2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field- collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (5) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (6) Drewes C.D. & Fournier C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Develop. Biol.* 138: 94-103.
- (7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chemistry*, Vol. 20, pp. 2000-2007.
- (10) Oetken, M., K.-U. Ludwigowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG- AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.
- (11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.

Appendice 6

Synthèse des résultats de l'essai circulaire
Essai de toxicité du sédiment avec "Lumbriculus variegatus"

Tableau 1

Résultats des cycles individuels de l'essai circulaire: nombres moyens de vers dans les témoins et les témoins de solvant à la fin de l'essai; EC = écart type; EC = écart type; CV = coefficient de variation.

	nombre moyen de vers dans les témoins	EC	CV (%)	n	nombre moyen de vers dans les témoins de solvant	EC	CV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	39,0	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	36,0	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	38,5	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	30,8	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	26,3	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	30,7	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	28,8	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	27,7	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	21,3	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	35,0	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	33,5	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	15,0	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	43,7	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	21,7	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	31,3	4,79	15,32	4
Moyenne in- terlaboratoire	29,59		20,10		30,61		13,26	
EC	8,32		10,03		7,57		10,48	
n	15				15			
min	16,3				15,0			
max	42,0				43,7			
CV (%)	28,1				24,7			

Tableau 2

Résultats des cycles individuels de l'essai circulaire: poids sec moyen total des vers par expérience dans les témoins et les témoins de solvant à la fin de l'essai; EC = écart type; CV = coeff. de variation.

	poids sec total des vers par expérience (témoins)	EC	CV (%)	n	poids sec total des vers par expérience (témoins de solvant)	EC	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
Moyenne in- terlaboratoire	25,15		20,36		27,68		17,53	
EC	7,87		12,56		7,41		9,10	
n	15				15			
min	12,9				10,5			
max	41,3				41,4			
CV (%)	31,3				26,8			

Tableau 3

Toxicité du PCP: résumé des effets dans l'essai circulaire: moyennes interlaboratoire pour la CE50, la CSEO et la CME0; EC = écart type; CV = coefficient de variation. moyenne

paramètre biologique		Moyenne interlaboratoire (mg/kg)	min	max	Facteur interlaboratoire	EC	CV (%)	Moyenne géométr. (mg/kg)
nombre total de vers total	CE₅₀	23,0	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	CSEO	9,9	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	CME0	27,9	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	DDM (%)	22,5	7,1	39,1				
poids sec total des vers	CE₅₀	20,4	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	CSEO	9,3	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	CME0	25,7	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	DDM (%)	24,8	10,9	44,7				
mortalité/survie	CE₅₀	25,3	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	CSEO	16,5	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	CME0	39,1	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
reproduction (augmentation du nombre de vers par expérience)	CE₅₀	20,0	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	CSEO	7,9	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	CME0	22,5	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	DDM (%)	29,7	13,9	47,9				
croissance (augmentation de biomasse par expérience)	CE₅₀	15,3	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	CSEO	8,7	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	CME0	24,0	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	DDM (%)	32,2	13,6	65,2				

DDM: différence détectable minimale par rapport aux valeurs des témoins lors de la vérification de l'hypothèse; utilisée comme mesure de la puissance statistique

RÉFÉRENCE

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

**C.36 ESSAI DE REPRODUCTION D'UN ACARIEN PRÉDATEUR [HYPOASPIS (GEOLAEAPS)
ACULEIFER] DANS LE SOL**

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 226 (2008) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Cette méthode d'essai est conçue pour évaluer les effets de substances chimiques contenues dans le sol sur le taux de reproduction d'une espèce d'acarien du sol *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), et permet donc d'estimer l'inhibition de la vitesse de croissance spécifique d'une population (1,2). Le taux de reproduction désigne ici le nombre de juvéniles à la fin de la période d'essai. *H. aculeifer* ajoute un niveau trophique aux espèces déjà représentées dans des méthodes d'essai. Un essai de reproduction sans discrimination ni quantification des différentes étapes du cycle de la reproduction est jugé approprié aux desseins de cette méthode d'essai. Pour les substances chimiques dont le mode d'exposition n'implique pas le sol, d'autres approches devraient mieux convenir (3).
2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* est considéré comme dûment représentatif de la faune du sol, et des acariens prédateurs en particulier. Il est répandu dans le monde entier (5) et sa récolte et son élevage au laboratoire sont aisés. L'Appendice 7 propose un résumé de la biologie de *H. aculeifer*. Des informations de référence sur l'écologie des espèces d'acariens et sur leur utilisation dans les essais d'écotoxicité apparaissent dans (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Des adultes femelles sont exposées à une série de concentrations de la substance chimique d'essai mélangée au sol. Au début de l'essai, 10 femelles adultes sont placées dans chaque récipient expérimental. Les mâles ne sont pas inclus dans l'essai, car l'expérience montre que les femelles s'accouplent dès l'éclosion du stade deutonymphe ou peu après dès lors que des mâles sont présents. De surcroît, l'inclusion de mâles exigerait une discrimination laborieuse des stades de développement, avec pour effet de prolonger l'essai. Par conséquent, l'accouplement lui-même reste hors de l'essai. Les femelles sont introduites dans l'essai 28 à 35 jours après le début de la période de ponte dans le processus de synchronisation (voir Appendice 4), car on peut alors considérer que les femelles se sont déjà accouplées et ont dépassé le stade de la préoviposition. À 20 °C, l'essai s'achève le 14e jour après l'introduction des femelles (jour 0), durée qui permet aux premiers descendants dans les témoins d'atteindre le stade de la deutonymphe (voir Appendice 4). Le nombre de juvéniles par récipient expérimental ainsi que le nombre de femelles survivantes sont déterminés pour calculer la principale variable mesurée. Le taux de reproduction des mites exposées à la substance chimique d'essai est comparé à celui des témoins, afin de déterminer la CE_x (par exemple CE_{10} , CE_{50}) ou la concentration sans effet observé (CSEO) (voir Appendice 1 pour les définitions), selon le modèle expérimental choisi (voir paragraphe 29). Une description générale du calendrier de l'essai est proposée dans l'Appendice 8.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

4. Il est préférable de connaître l'hydrosolubilité, le $\log K_{oc}$, le coefficient de partage entre l'eau et le sol et la pression de vapeur de la substance chimique d'essai. Des informations complémentaires sur le devenir de la substance d'essai dans le sol, notamment sa vitesse de dégradation biotique et abiotique, sont souhaitables.
5. La présente méthode d'essai peut être utilisée pour des substances chimiques hydrosolubles ou insolubles dans l'eau; néanmoins, le mode d'application de la substance chimique d'essai variera en conséquence. Cette méthode d'essai ne s'applique pas aux substances volatiles, à savoir les substances dont la constante de Henry ou le coefficient de partage air/eau sont supérieurs à un, ou les substances dont la pression de vapeur dépasse 0,0133 Pa à 25 °C.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

6. Un résultat de l'essai sera considéré comme valide si les témoins non traités répondent aux critères suivants:
 - La mortalité moyenne des femelles adultes ne dépasse pas 20 % à la fin de l'essai;
 - Le nombre moyen de juvéniles par expérience (10 femelles adultes introduites) est égal à au moins 50 à la fin de l'essai;
 - Le coefficient de variation calculé pour le nombre d'acariens juvéniles par expérience n'excède pas 30 % à l'achèvement de l'essai final.

SUBSTANCE CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

7. Le calcul de la CE_x et/ou de la CSEO d'une substance chimique de référence garantit l'adéquation des conditions expérimentales du laboratoire et contrôle la régularité de la réaction des organismes d'expérience au cours du temps. Le diméthoate (CAS 60-51-5) est une substance chimique de référence reconnue dont l'effet sur la taille de la population est démontré (4). L'acide borique (CAS 10043-35-3) peut également servir de substance chimique de référence, mais il a été toutefois moins étudié. On peut choisir l'un des deux modèles expérimentaux suivants:
- On peut parallèlement tester la substance chimique de référence et déterminer la toxicité de chaque substance chimique d'essai à une concentration préalablement identifiée dans une étude dose-réponse pour provoquer une réduction > 50 % de la descendance. Dans ce cas, le nombre d'expériences identiques sera le même que celui des témoins (voir paragraphe 29).
 - On peut aussi tester la substance chimique de référence 1 à 2 fois par an dans un essai dose-réponse. Selon le modèle choisi, les nombres de concentrations et d'expériences identiques et le facteur d'espacement différent (voir paragraphe 29), mais il faut obtenir une réponse égale à 10 à 90 % de l'effet (facteur d'espacement de 1,8). La CE_{50} du diméthoate calculée d'après le nombre de juvéniles doit être comprise entre 3,0 et 7,0 s.e./kg de sol (ps). D'après les résultats obtenus à ce jour avec l'acide borique, la CE_{50} basée sur le nombre de juvéniles doit être comprise dans l'intervalle de 100 à 500 mg/kg de ps de sol.

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Récipients expérimentaux et matériel

8. Il convient d'utiliser des récipients expérimentaux en verre ou en un autre matériau chimiquement inerte de 3 à 5 cm de diamètre (hauteur de sol $\geq 1,5$ cm) munis d'un couvercle étroitement ajusté. Il est préférable d'employer des bouchons à vis et dans ce cas, il faut aérer les récipients deux fois par semaine. Il est également possible d'utiliser des couvercles qui permettent un échange gazeux direct entre le substrat et l'atmosphère (par exemple, une gaze). Le taux d'humidité doit rester suffisamment élevé pendant l'essai, et il est donc essentiel de vérifier le poids de chaque récipient expérimental durant l'essai et de rajouter de l'eau si nécessaire. Ce contrôle présente une importance particulière lorsque l'on ne dispose pas de bouchons à vis. Si les récipients expérimentaux sont opaques, le matériau du couvercle doit permettre le passage de la lumière (par exemple un couvercle transparent perforé), et empêcher néanmoins les acariens de s'échapper. La taille et le type du récipient expérimental dépendent de la méthode d'extraction (voir Appendice 5 pour plus de détails). Lorsque l'on procède à une extraction à la chaleur directement sur le récipient expérimental, il convient alors d'ajouter au fond un treillis aux mailles de dimensions appropriées (qui restera scellé jusqu'à l'extraction), et d'utiliser une épaisseur de sol suffisante pour l'établissement d'un gradient de température et d'humidité.
9. Cet essai requiert du matériel de laboratoire standard, en particulier les articles suivants:
- récipients, de préférence en verre avec des bouchons à vis;
 - armoire à séchage;
 - stéréomicroscope;
 - pinceaux pour le transfert des acariens;
 - pH-mètre et luxmètre;
 - balances suffisamment exactes;
 - instruments permettant de contrôler la température;
 - instruments permettant de contrôler l'humidité de l'air (facultatifs si les récipients expérimentaux sont fermés par des couvercles);
 - incubateur ou petite chambre à température contrôlée;
 - matériel pour l'extraction (voir Appendice 5) (13);
 - panneau lumineux suspendu avec réglage de la lumière;
 - bocal de récolte pour les acariens extraits.

Préparation du sol artificiel

10. Pour cet essai, on utilise un sol artificiel. Il comprend les composants suivants (toutes les valeurs sont proportionnelles à la masse sèche):
 - 5 % de tourbe à sphaigne, séchée à l'air et finement broyée (une dimension des particules de 2 ± 1 mm est acceptable);
 - 20 % d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %);
 - environ 74 % de sable industriel séché à l'air (selon la quantité de CaCO_3 nécessaire), essentiellement du sable fin contenant plus de 50 % de particules mesurant entre 50 et 200 microns. La quantité exacte de sable dépend de la quantité de CaCO_3 (voir ci-dessous), la proportion combinée des deux composants devant atteindre 75 %.
 - < 1,0 % de carbonate de calcium (CaCO_3 , pulvérisé, qualité analytique) afin d'obtenir un pH de $6,0 \pm 0,5$; la quantité de carbonate de calcium à ajouter dépend principalement de la qualité et de la nature de la tourbe (voir Note 1).

Note 1: La quantité de CaCO_3 requise dépendra des composants du substrat de sol et doit être déterminée par mesure du pH sur des échantillons prélevés dans le sol immédiatement avant l'essai (14)

Note 2: La proportion de tourbe dans le sol artificiel diffère de celle recommandée dans les autres méthodes d'essai sur les organismes du sol, dans lesquelles on utilise dans la plupart des cas 10 % de tourbe [par exemple (15)]. Toutefois, selon l'OEPP (16), un sol agricole type ne contient pas plus de 5 % de matières organiques et la réduction de la proportion de tourbe vise à représenter les capacités réduites de sorption par un sol naturel de la substance chimique d'essai sur le carbone organique.

Note 3: Si besoin est, par exemple à des fins d'essai spécifiques, des sols naturels provenant de sites non pollués peuvent également servir de substrat d'essai et/ou de culture. Toutefois, lorsque l'on utilise un sol naturel, il faut le caractériser au moins par son origine (site de récolte), son pH, sa texture (distribution de tailles de particules) et sa teneur en matières organiques. Le cas échéant, le type et le nom du sol seront mentionnés conformément à la classification des sols, et le sol doit être exempt de toute contamination. Dans le cas où la substance chimique d'essai est un métal ou un composé organométallique, il conviendra également de déterminer la capacité d'échange de cations (CEC) du sol naturel. On s'efforcera tout particulièrement de satisfaire les critères de validité, car les informations de référence sur les sols naturels sont habituellement rares.

11. Les constituants secs du sol sont soigneusement mélangés (par exemple, dans un grand mélangeur de laboratoire). Le pH est déterminé avec un mélange de sol et d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M ou de chlorure de calcium (CaCl_2) 0,01 M dans un rapport 1/5 [voir (14) et Appendice 3]. Si l'acidité du sol est supérieure à la limite requise (voir paragraphe 10), elle peut être ajustée par addition d'une quantité appropriée de CaCO_3 . Si le sol est trop alcalin, le pH peut être abaissé par l'addition d'un supplément du mélange comprenant les trois premiers composants décrits au paragraphe 10, à l'exclusion du CaCO_3 .
12. La capacité de rétention d'eau (CRE) maximale du sol artificiel est déterminée conformément aux protocoles décrits dans l'Appendice 2. Deux à sept jours avant le début de l'essai, le sol artificiel sec est préhumidifié par addition d'une quantité suffisante d'eau distillée ou désionisée pour atteindre environ la moitié de la teneur en eau finale, c'est-à-dire 40 à 60 % de la CRE maximale. Le taux d'humidité est ajusté à 40-60 % de la capacité de rétention d'eau maximale par addition de la solution de substance chimique d'essai et/ou addition d'eau distillée ou désionisée (voir paragraphes 16-18). Il est possible d'estimer approximativement le taux d'humidité du sol en pressant doucement une poignée de sol dans la main: si le taux d'humidité est correct, de petites gouttes d'eau apparaissent entre les doigts.
13. La teneur en humidité du sol est déterminée au début et à la fin de l'essai par séchage à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant, conformément à la norme ISO 11465 (17) et à un pH du sol conforme à l'Appendice 3 ou à la norme ISO 10390 (14). Ces mesures doivent être réalisées dans des échantillons supplémentaires sans acarien, sur le sol témoin et sur des sols contenant chaque concentration d'essai. Il ne faut pas ajuster le pH du sol lorsque l'on teste des substances acides ou basiques. Il convient de vérifier la teneur en humidité pendant tout l'essai par pesée périodique des récipients (voir paragraphes 20 et 24).

Sélection et préparation des animaux expérimentaux

14. L'espèce utilisée dans l'essai est *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Des acariens adultes femelles, prélevés dans une cohorte synchronisée, sont nécessaires au début de l'essai. Les acariens sont introduits environ 7 à 14 jours après le passage au stade adulte, 28 à 35 jours après le début de la ponte dans le processus de synchronisation (voir paragraphe 3 et Appendice 4). La source des acariens ou leur fournisseur et le maintien de la culture au laboratoire doivent être enregistrés. Lorsqu'une culture est maintenue au laboratoire, il est recommandé de confirmer l'identité des espèces au moins une fois par an. L'Appendice 6 comprend une fiche d'identification.

Préparation des concentrations expérimentales

15. La substance d'essai est mélangée dans le sol. Il convient de choisir les solvants organiques utilisés pour faciliter le traitement du sol par la substance d'essai sur des critères de faible toxicité pour les acariens, et un témoin de solvant approprié doit être inclus dans l'essai (voir paragraphe 29).

Substance d'essai hydrosoluble

16. Une solution de la substance chimique d'essai dans de l'eau désionisée est préparée en une quantité suffisante pour toutes les expériences identiques d'une concentration expérimentale. Il est recommandé d'utiliser la quantité d'eau nécessaire pour obtenir le taux d'humidité requis, à savoir 40 à 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau (voir paragraphe 12). Chaque solution de la substance d'essai est mélangée complètement avec un lot du sol préhumidifié, avant d'être introduite dans le récipient expérimental.

Substance chimique d'essai hydrosoluble

17. Les substances chimiques non solubles dans l'eau mais solubles dans des solvants organiques peuvent être dissoutes dans le plus petit volume possible d'un véhicule approprié (par exemple de l'acétone). Seuls des solvants volatils peuvent être utilisés. Dans le cas où ces véhicules sont utilisés, toutes les concentrations expérimentales et les témoins contiennent la même quantité minimale du véhicule. Le véhicule est pulvérisé sur ou mélangé à une petite quantité, 10 g par exemple, de sable quartzique fin. Il convient de corriger la quantité de sable contenu dans le substrat pour tenir compte de cette quantité. Ensuite, le véhicule est éliminé par évaporation sous une hotte durant au moins une heure. Ce mélange de sable quartzique et de la substance d'essai est ajouté au sol préhumidifié, auquel il est soigneusement mélangé après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est introduit dans les récipients expérimentaux. Il convient de noter que certains solvants peuvent être toxiques pour les acariens. Par conséquent, il est recommandé d'utiliser un témoin d'eau supplémentaire sans véhicule lorsque cette toxicité est inconnue. La démonstration fiable d'absence d'effet du solvant (aux concentrations appliquées) permet d'omettre le témoin d'eau.

Substance chimique d'essai peu soluble dans l'eau et les solvants organiques

18. Pour les substances chimiques peu solubles dans l'eau et les solvants organiques, on mélange l'équivalent de 2,5 g de sable quartzique finement broyé par récipient expérimental (par exemple, 10 g de sable quartzique fin pour quatre expériences identiques) à la quantité nécessaire de la substance d'essai pour obtenir la concentration expérimentale voulue. Il convient de corriger la quantité de sable contenu dans le substrat pour tenir compte de cette quantité. Ce mélange de sable quartzique et de la substance chimique d'essai est ajouté au sol préhumidifié, auquel il est soigneusement mélangé après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est réparti entre les récipients expérimentaux. On répète la procédure pour chaque concentration expérimentale et on prépare un témoin approprié.

MODE OPÉRATOIRE

Groupe traité et témoins

19. Il est recommandé d'utiliser dix adultes femelles dans 20 g de masse sèche de sol artificiel dans chaque récipient témoin et traité. Les organismes expérimentaux doivent être ajoutés dans les deux heures qui suivent la préparation du substrat d'essai final (c'est-à-dire après l'application de la substance d'essai). Dans certains cas particuliers (par exemple, lorsque le vieillissement est considéré comme un facteur déterminant), la durée écoulée entre la préparation du substrat d'essai final et l'addition des acariens peut être prolongée (pour des détails sur ce vieillissement, voir (18)). Il convient toutefois de fournir une justification scientifique de cette décision.

20. Une fois les acariens ajoutés au sol, ils sont nourris, et le poids initial de chaque récipient expérimental doit être mesuré pour servir de référence lors du contrôle du taux d'humidité du sol tout au long de l'essai, comme il est décrit au paragraphe 24. Les récipients expérimentaux sont ensuite couverts comme il est décrit au paragraphe 8 et placés dans la chambre expérimentale.
21. Des témoins appropriés à la méthode d'application de la substance chimique d'essai, présentée dans l'un des paragraphes 15 à 18, sont préparés. La préparation des témoins se conforme aux protocoles décrits, sans addition de la substance chimique d'essai. Ainsi, le cas échéant, des solvants organiques, du sable quartzique ou d'autres véhicules sont utilisés dans les témoins en concentrations/quantités équivalentes à celles des traitements. Lorsqu'un solvant ou un autre véhicule est employé pour ajouter la substance chimique d'essai, il faut également préparer un témoin supplémentaire sans véhicule ni substance d'essai et le tester chaque fois que la toxicité du solvant est inconnue (voir paragraphe 17).

Conditions expérimentales

22. La température expérimentale doit être de 20 ± 2 °C. Elle doit être enregistrée au moins quotidiennement et ajustée, s'il y a lieu. L'essai est mené dans des conditions de cycles de lumière et d'obscurité contrôlés (de préférence 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité) avec un éclairage de 400 à 800 lux dans la zone des récipients expérimentaux. À des fins de comparaisons, ces conditions sont identiques à celles appliquées dans d'autres essais écotoxicologiques dans le sol [par exemple, (15)].
23. Les échanges gazeux doivent être assurés par aération des récipients expérimentaux au moins deux fois par semaine lorsque l'on utilise des bouchons à vis. Dans le cas d'une ouverture couverte de gaze, il convient de veiller particulièrement au maintien du taux d'humidité du sol (voir paragraphes 8 et 24).
24. La teneur en eau du substrat de sol dans les récipients expérimentaux est maintenue pendant toute la durée de l'essai en pesant les récipients expérimentaux, et s'il y a lieu, en y rajoutant périodiquement de l'eau (par exemple une fois par semaine). Les pertes doivent être compensées selon les besoins par de l'eau désionisée. Le taux d'humidité pendant l'essai ne doit pas s'écarter de plus de 10 % de la valeur initiale.

Alimentation

25. On a montré que les acariens du fromage [*Tyrophagus putrescentiae* (Schränk, 1781)] constituaient une source d'aliment appropriée. De petits collembolés (par exemple *Folsomia candida* juvénile Willem, 1902 ou *Onychiurus fimatus* (19, 20), des enchytrées (par exemple *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) ou des nématodes (par exemple *Turbatrix silusiae* de Man, 1913) peuvent également convenir (21). Il est recommandé de contrôler les aliments avant de les utiliser dans un essai. Le type et la quantité d'aliments doivent assurer l'obtention d'un nombre de juvéniles suffisant pour remplir les critères de validité (paragraphe 6). Lors du choix des proies, il convient de considérer le mode d'action de la substance d'essai (par exemple, un acaricide peut se révéler toxique aussi pour les acariens qui servent d'aliments, voir paragraphe 26).
26. Les aliments doivent être fournis *ad libitum* [mais en petite quantité à chaque fois (pointe de spatule)]. A cette fin, on peut également utiliser un aspirateur à succion douce comme il est proposé dans l'essai sur les collembolés, ou un pinceau fin. Il suffira généralement de distribuer les aliments au début de l'essai et deux à trois fois par semaine. Si la substance d'essai se révèle toxique pour la proie, il faudra envisager d'augmenter la fréquence d'alimentation et/ou d'employer une autre source d'aliments.

Sélection des concentrations expérimentales

27. Des informations préalables sur la toxicité de la substance chimique d'essai, issues par exemple d'études préliminaires de sélection des concentrations, devraient faciliter la sélection des concentrations expérimentales appropriées. Si besoin est, une étude préliminaire est menée, avec cinq concentrations de la substance chimique d'essai dans la gamme de 0,1 - 1 000 mg/kg de sol sec, avec au moins une expérience par traitement et un témoin. L'étude préliminaire dure 14 jours, à l'issue desquels la mortalité des acariens adultes et le nombre de juvéniles sont déterminés. Il est préférable de choisir dans l'essai final une gamme de concentrations qui inclut des concentrations affectant les nombres de juvéniles mais non la survie de la génération maternelle. Cette démarche est toutefois exclue pour les substances chimiques qui provoquent des effets létaux et sub-létaux à des concentrations pratiquement similaires. La concentration efficace (par exemple CE_{50} , CE_{25} , CE_{10}) et la gamme de concentrations pour laquelle l'effet de la substance d'essai présente un intérêt doivent être contenues dans l'intervalle des concentrations de l'essai. L'extrapolation à des valeurs très inférieures à la concentration la plus basse qui affecte les organismes expérimentaux ou supérieures à la concentration la plus élevée de l'essai doit rester exceptionnelle, et justifiée en détail dans le rapport.

Modèle expérimental

Essais dose-réponse

28. Trois modèles d'essai, fondés sur les recommandations issues d'un autre essai tournant (essai de reproduction chez l'enchytrée (22)) sont proposés. L'adéquation générale de ces trois modèles a été confirmée par les résultats de la validation sur *H. aculeifer*.
29. Lors de l'établissement de la gamme de concentrations, il convient de tenir compte des points suivants:
 - Pour déterminer la CE_x (par exemple CE_{10} , CE_{50}), il faut tester douze concentrations. Il est recommandé d'inclure au moins deux expériences identiques à chaque concentration d'essai et six témoins. Le facteur d'espacement peut varier, mais doit être inférieur ou égal à 1,8 dans la gamme efficace anticipée et supérieur à 1,8 aux concentrations plus élevées et plus faibles.
 - Pour déterminer la CSEO, il faut tester au moins cinq concentrations formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques par concentration expérimentale et huit témoins. Les concentrations doivent être espacées d'un facteur d'au plus 2,0.
 - Une approche combinée permet de déterminer à la fois la CSEO et la CE_x . Il faut alors utiliser huit concentrations expérimentales formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques par traitement et huit témoins. Les concentrations doivent être espacées d'un facteur d'au plus 1,8.

Essai limite

30. Si la concentration la plus élevée (par exemple 1 000 mg/kg) dans l'essai préliminaire de sélection des concentrations n'engendre aucun effet, l'essai de reproduction final peut être mené sous forme d'un essai limite, à la concentration expérimentale de 1 000 mg/kg ps de sol. Un essai limite permet de démontrer que la CSEO ou la CE_{10} pour la reproduction est supérieure à la concentration limite, en employant un nombre minimal d'acariens dans l'essai. Il faut alors utiliser huit expériences identiques pour le sol traité et pour le témoin.

Durée de l'essai et mesures

31. Toutes les différences observées de comportement et de morphologie des acariens entre les récipients témoins et les récipients traités doivent être notées.
32. Le 14^e jour, les acariens survivants sont séparés du sol par extraction à la chaleur ou à la lumière ou par une autre méthode appropriée (voir Appendice 5). Les juvéniles (c'est-à-dire larves, protonymphes et deutonymphes) et les adultes sont comptés séparément. Tous les acariens adultes qui ne sont pas récupérés à ce stade doivent être comptabilisés comme morts, car on suppose qu'ils sont décédés et se sont décomposés avant l'évaluation. Il faut valider l'efficacité d'extraction une ou deux fois par an sur des témoins contenant des nombres connus d'adultes et de juvéniles. L'efficacité doit être supérieure à 90 % en moyenne combinée pour tous les stades de développement (voir Appendice 5). Les nombres des adultes et des juvéniles ne seront pas ajustés en fonction de l'efficacité.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

33. Les paragraphes 36 à 41 contiennent des informations sur les méthodes statistiques susceptibles d'être utilisées pour analyser les résultats de l'essai. Il faut également consulter le Document 54 de l'OCDE intitulé "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application".
34. Le résultat principal de l'essai est le taux de reproduction, c'est-à-dire le nombre de juvéniles produits par récipient expérimental (dans lequel 10 femelles adultes ont été introduites). L'analyse statistique requiert le calcul de la moyenne arithmétique ($\bar{X}$) et de la variance (s^2) du taux de reproduction par traitement et par témoin. $\bar{X}$ et s^2 sont employés dans des analyses de variance telles que le test t de Student, le test de Dunnett ou le test de William, et pour calculer des intervalles de confiance à 95 %.

Note: Ce résultat principal équivaut à la mesure de fécondité représentée par le nombre de juvéniles vivants produits pendant l'essai divisé par le nombre de parents femelles introduits au début de l'essai.

35. Le nombre de femelles survivantes dans les témoins non traités est un critère de validité essentiel qui doit être détaillé. Comme dans l'essai préliminaire de sélection des concentrations, tous les autres signes de nocivité doivent également être consignés dans le rapport final.

CE_x

36. On calcule les valeurs de CE_x et leurs limites de confiance à 95 % supérieures et inférieures correspondant au paramètre décrit dans le paragraphe 34 en utilisant des méthodes statistiques adéquates (par exemple, analyse probit, fonction logistique ou de Weibull, méthode simplifiée de Spearman-Kärber, ou simple interpolation). Une CE_x est obtenue en intégrant une valeur correspondant à x % de la moyenne du témoin dans l'équation retenue. Pour calculer la CE₅₀ ou tout autre CE_x, il faut soumettre les moyennes par traitement (X) à une analyse de régression.

CSEO/CMEO

37. Lorsqu'une analyse statistique est appliquée pour déterminer la CSEO/CMEO, il faut disposer de statistiques par récipient (chaque récipient individuel est considéré comme une expérience). Il convient alors d'utiliser des méthodes statistiques adéquates (conformément au Document 54 de l'OCDE intitulé "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application"). En général, les effets indésirables de la substance d'essai par rapport au témoin sont examinés en utilisant une hypothèse unilatérale (inférieure) avec une analyse à $p \leq 0,05$. Les paragraphes suivants en comprennent des exemples.
38. La distribution normale des données peut être analysée, par exemple, par le test d'ajustement de Kolmogorov-Smirnov, le test du rapport rang à écart-type (test R/s) ou le test de Shapiro-Wilk (bilatéral, $p \leq 0,05$). On peut utiliser le test de Cochran, le test de Levene ou le test de Bartlett (bilatéral, $p \leq 0,05$) pour tester l'homogénéité de la variance. Lorsque les pré-requis des procédures de tests paramétriques sont satisfaits (normalité, homogénéité de la variance), on peut appliquer une analyse de variance une voie, puis des tests multicomparatifs. Les tests de comparaison multiples (par exemple, tests t de Dunnett) ou les tests de tendance décroissante (par exemple, test de Williams dans le cas d'une relation réponse à la dose monotone) peuvent être utilisés pour calculer, le cas échéant, des différences significatives ($p \leq 0,05$) entre les témoins et les diverses concentrations de la substance d'essai (on choisira le test recommandé conformément au Document 54 de l'OCDE intitulé "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application"). On peut toutefois utiliser des méthodes non paramétriques (test U de Bonferroni conformément à Holm ou test de tendance de Jonckheere-Terpstra) pour déterminer la CSEO et la CMEO.

Essai limite

39. Si un essai limite a été mis en œuvre (comparaison du témoin et d'un seul traitement) et que les conditions requises pour les procédures de tests paramétriques (normalité, homogénéité) sont remplies, on peut évaluer les réponses métriques par le test de Student (test t). Le test t de variance inégale (test t de Welch) ou bien un test t non paramétrique tel que le test U de Mann-Whitney peuvent être employés lorsque ces conditions ne sont pas satisfaites.
40. Si l'on cherche à déterminer des différences significatives entre les témoins (témoin et témoin de solvant), les répliques de chaque témoin peuvent être testées comme il est décrit pour l'essai limite. Lorsque les essais ne détectent aucune différence significative, il est possible de rassembler toutes les expériences identiques témoins et témoins de solvant. Dans le cas contraire, il faut comparer tous les traitements avec le témoin de solvant.

Rapport d'essai

41. Le rapport d'essai doit comprendre au moins les informations suivantes:

— *Substance chimique d'essai*

- identité de la substance chimique d'essai, lot de fabrication, lot de conditionnement et numéros CAS, pureté;
- propriétés physico-chimiques de la substance chimique d'essai (par exemple log K_{ow}, hydrosolubilité, pression de vapeur, constante de Henry (H) et de préférence, information sur le devenir de la substance chimique d'essai dans le sol).

— *Organismes expérimentaux*

- identification et fournisseur des organismes expérimentaux, description des conditions d'élevage;
- gamme d'âges des organismes expérimentaux.

— Conditions expérimentales

- description du modèle expérimental et du mode opératoire;
- détails sur la préparation du sol d'essai; description détaillée lorsque l'on utilise un sol naturel (origine, histoire, distribution de tailles de particules, pH, teneur en matières organiques, et, le cas échéant, classification du sol);
- capacité maximale de rétention d'eau du sol;
- description de la méthode d'application de la substance chimique d'essai dans le sol;
- conception expérimentale et mode opératoire;
- dimension des récipients expérimentaux et masse sèche de sol d'essai par récipient;
- Conditions expérimentales intensité lumineuse, durée des cycles de lumière et d'obscurité, température;
- description du régime d'administration de la nourriture, nature et quantité de nourriture fournie au cours de l'essai, dates d'alimentation;
- pH et teneur en eau du sol au début et pendant l'essai;
- description détaillée de la méthode d'extraction et de l'efficacité d'extraction.

— Résultats de l'essai

- nombre de juvéniles déterminé dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai;
- nombre de femelles adultes et mortalité des adultes (%) dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai;
- description des symptômes évidents ou des changements nets de comportement;
- résultats obtenus avec la substance chimique de référence de l'essai;
- résumé des analyses statistiques (CE_x et/ou CSEO) y compris les limites de confiance à 95 % et la description de la méthode de calcul;
- courbe de la relation concentration-réponse;
- écarts par rapport aux protocoles décrits dans la présente méthode d'essai et faits inhabituels, quels qu'ils soient, survenus au cours de l'essai

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). *Gayana Zool.* 57, 21-46.
- (2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. *Pacific Insects* 24, 259-274.
- (3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. *JSS — Journal of Soils and Sediments* 3, 73-77.
- (4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition In: Dahl, F. (Hrsg.): *Die Tierwelt Deutschlands* 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.
- (5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): *Modern Acarology*. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492
- (6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). *Proc. 2nd Symp. EURAAC*: p 241-249.
- (7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. *Proc. IXth Internat. Congr. Acarol.* 1994, Columbus, Ohio: p 621-628.
- (8) Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: *Handbook of soil invertebrate toxicity tests*. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.

- (9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests — Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.
- (10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.
- (11) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.
- (12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.
- (13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.
- (14) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1994). Qualité du sol – Détermination du pH, No. 10390. ISO, Genève.
- (15) Chapitre C.8 de la présente annexe — Toxicité pour les vers de terre.
- (16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.
- (17) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1993). Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau – Méthode gravimétrique, No. 11465. ISO, Genève.
- (18) Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.
- (19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit *Onychiurus fimatus* Gisin (Collenbola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.
- (20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.
- (21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.
- (22) Chapitre C.32 de la présente annexe — Essai de reproduction chez l'enchytrée.
- (23) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1994). Qualité du sol – Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*). Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction, No. 11268-2. ISO, Genève.
- (24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.
- (25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.
- (26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with “good genes” in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.
- (27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.
- (28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

- (29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). *Zoologica Poloniae* 24, 11-59.
 - (30) Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). *Acarologia* 6, 647-658.
 - (31) OCDE (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE — Série sur les essais et évaluations n°54. ENV/JM/MONO(2006)18
-

*Appendice 1***Définitions**

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai (dans cet essai, toutes les concentrations efficaces sont exprimées en masse de la substance chimique d'essai rapportée à la masse sèche du sol d'essai):

Substance chimique: une substance ou un mélange

CSEO (concentration sans effet observé): désigne la concentration de la substance chimique d'essai à laquelle aucun effet n'est observé. Dans cet essai, la concentration correspondant à la CSEO n'a pas d'effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

CMEO (concentration minimale avec effet observé): la plus faible concentration de la substance chimique d'essai qui exerce un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

CE_x (concentration efficace à x %): concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'expérience durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, une CE₅₀ est une concentration estimée produire un effet sur un paramètre évalué de l'essai dans 50 % d'une population exposée durant une période d'exposition déterminée.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Appendice 2

Détermination de la capacité maximale de rétention d'eau du sol

La méthode suivante de détermination de la capacité maximale de rétention d'eau du sol a fait ses preuves. Elle est décrite à l'annexe C de la norme ISO DIS 11268-2 (Qualité du sol – Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*)). Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction (23).

Prélever une quantité déterminée (5 g, par exemple) du sol expérimental servant de substrat à l'aide d'un instrument approprié (tube de tarière, etc.). Couvrir le fond du tube d'un morceau de papier filtre imbibé d'eau, puis placer le tube sur un support dans un bain d'eau. Le tube doit être progressivement immergé jusqu'à ce que le niveau d'eau passe au-dessus du sol. Laisser le tube dans l'eau durant environ trois heures. Comme l'eau absorbée par les capillaires du sol ne peut pas être retenue en totalité, il faut la laisser s'évacuer de l'échantillon de sol durant deux heures en plaçant le tube sur un lit de sable quartzique finement broyé très humide contenu dans un récipient fermé (pour qu'il ne sèche pas). Il faut ensuite peser l'échantillon et le sécher à 105 °C jusqu'à ce qu'il atteigne une masse constante. La capacité de rétention d'eau (CRE) est ensuite calculée comme suit:

$$\text{CRE (en \% de masse sèche)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

où:

S = masse du substrat saturé en eau + masse du tube + masse du papier filtre

T = tare (masse du tube + masse du papier filtre)

D = masse sèche du substrat

*Appendice 3***Détermination du pH du sol**

La méthode de détermination du pH d'un sol, décrite ci-dessous s'appuie sur la norme ISO 10390: Qualité du sol — Détermination du pH (16).

On laisse sécher une quantité définie de sol à température ambiante durant au moins 12 heures. On prépare une suspension du sol (contenant au moins 5 g de sol) dans cinq fois son volume d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M de qualité analytique ou d'une solution de chlorure de calcium (CaCl₂) 0,01 M de qualité analytique. On agite vigoureusement la suspension durant cinq minutes et on la laisse sédimenter durant au moins deux heures, mais pas plus de 24 heures. On mesure ensuite le pH de la phase liquide à l'aide d'un pH-mètre, étalonné avant chaque mesure à l'aide d'une série appropriée de solutions tampons (pH 4,0 et 7,0, par exemple).

Appendice 4

Élevage de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, d'acariens des aliments et synchronisation des cultures**Élevage de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:**

Les cultures peuvent être maintenues dans des récipients de plastique ou des flacons de verre remplis d'un mélange de plâtre de Paris et de poudre de charbon (9/1). Le plâtre doit rester humide grâce à l'addition, si besoin est, de quelques gouttes d'eau distillée ou désionisée. Les températures d'élevage optimales sont comprises dans l'intervalle de 20 ± 20 °C, le régime de lumière et d'obscurité n'est pas déterminant pour cette espèce. Les proies peuvent être des acariens *Tyrophagus putrescentiae* ou *Caloglyphus* (les acariens des aliments doivent être manipulés avec précaution car ils peuvent provoquer des allergies chez l'homme), mais les nématodes, les enchytrées et les collemboles sont également des proies adéquates. Leur provenance doit être consignée. Il est possible d'initier le développement de la population à partir d'une seule femelle, car les mâles se développent dans les œufs non fécondés. Les générations se chevauchent dans une large mesure. Une femelle peut vivre au moins 100 jours et pondre environ 100 œufs au cours de sa vie. Le taux de ponte maximal est atteint entre 10 et 40 jours (à l'âge adulte) et il s'élève à $2,2$ œufs femelle⁻¹ jour⁻¹. Le développement de l'œuf jusqu'au stade adulte de la femelle dure environ 20 jours à 20 °C. Il faut maintenir et traiter plusieurs cultures à l'avance.

Élevage de *Tyrophagus putrescentiae*:

Les acariens sont élevés dans un récipient en verre rempli de poudre de levure de bière fine, et placé dans un seau en plastique rempli d'une solution de KNO₃, qui empêche la fuite des animaux. Les acariens des aliments sont placés au dessus de cette poudre. Ensuite, ils sont soigneusement mélangés à la poudre (à remplacer deux fois par semaine) à l'aide d'une spatule.

Synchronisation de la culture:

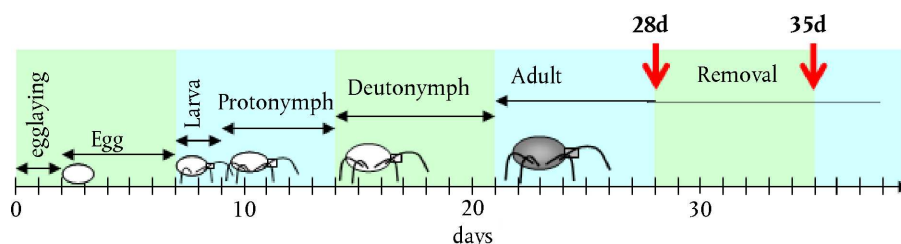
Les spécimens utilisés dans l'essai doivent avoir à peu près le même âge (environ 7 jours après le passage au stade adulte). À la température d'élevage de 20 °C la synchronisation est réalisée de la manière suivante:

Les femelles sont transférées dans un récipient d'élevage propre et reçoivent une quantité suffisante de nourriture

- On les laisse pondre pendant deux ou trois jours, puis elles sont récoltées
- Les femelles adultes sont prélevées pour l'essai entre le 28^{ème} et le 35^{ème} jour après le placement des femelles adultes dans des récipients d'élevage propres.

Il est facile de distinguer les femelles adultes des mâles et des animaux aux autres stades de développement par leur dimension plus grande, leur forme boursouflée et leur bouclier dorsal brun car les mâles sont plus minces et plats, et les stades immatures sont blancs à crèmes. Le développement des acariens est à peu près conforme au modèle décrit ci-dessous à 20 °C (Figure): œuf 5 j, larve 2 j, protonymphe 5 j, deutonymphe 7 j, période de préoviposition de la femelle 2 j. Ensuite, les acariens sont adultes.

Figure

Développement de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* à 20 °C. (prélèvement = femelles utilisées pour l'essai)

Les animaux adultes sont prélevés dans la culture synchronisée et introduits dans les récipients expérimentaux entre le 28^e et le 35^e jour après le début de la ponte des parents femelles (c'est-à-dire 7-14 jours après le passage à l'âge adulte). On s'assure ainsi que les animaux de l'essai sont au-delà de la période de préoviposition et se sont accouplés avec des mâles qui sont également présents dans le récipient de culture. Des observations réalisées sur des cultures de laboratoire suggèrent que, lorsque des mâles sont présents, les femelles s'accouplent dès le passage à l'âge adulte ou peu après (Ruf, Vaninnen, obs. pers.). La période de sept jours est retenue car elle s'intègre facilement à la routine du laboratoire et atténue la variabilité développementale individuelle entre les acariens. L'oviposition doit être initiée avec un nombre de femelles au moins égal à celui qui sera finalement nécessaire pour l'essai (par exemple, s'il faut 400 femelles dans l'essai, il faudra laisser pondre au moins 400 femelles pendant deux à trois jours. Le nombre d'œufs au point de départ de la population synchronisée doit être d'au moins 1 200 [proportion relative des sexes environ 0,5, mortalité environ 0,2]). Afin d'éviter le cannibalisme, il est préférable que chaque récipient renferme au plus 20 à 30 femelles en période de ponte.

Appendice 5

Méthodes d'extraction

L'extraction à la chaleur est une méthode qui convient à la séparation de microarthropodes à partir d'un sol ou d'un substrat (voir figure ci-dessous). La méthode tire parti de l'activité des organismes, et ainsi, seuls les spécimens mobiles sont susceptibles d'être enregistrés. Le principe de l'extraction à la chaleur consiste à dégrader progressivement les conditions dans l'échantillon pour inciter les organismes à quitter le substrat et les faire tomber dans un liquide de fixation (par exemple éthanol). Les paramètres déterminants sont la durée de l'extraction et l'évolution des conditions appliquées, qui varient de bonnes à modérément bonnes puis deviennent mauvaises pour les organismes. Dans des essais écotoxicologiques, la durée de l'extraction doit être aussi brève que possible, car toute croissance de la population au cours de l'extraction falsifie les résultats. Par ailleurs, les conditions de températures et d'humidité dans l'échantillon doivent toujours garder des valeurs compatibles avec le déplacement des acariens. Le chauffage d'un échantillon de sol provoque la dessiccation du substrat. Si celle-ci est trop rapide, certains acariens se dessècheront en même temps et ne parviendront pas à s'enfuir.

Par conséquent, le protocole suivant est proposé (24) (25):

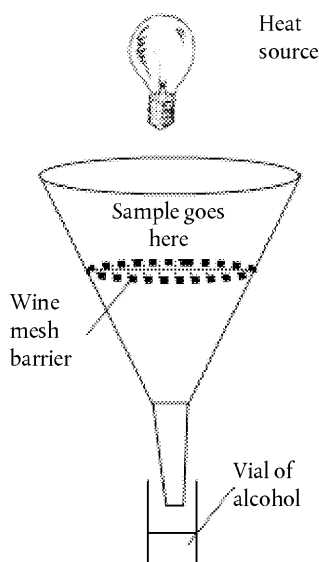
Appareil: Entonnoir de Tullgren ou équipement comparable, pour appliquer, par exemple la méthode de McFadyen (chauffage par-dessus, l'échantillon est placé sur un entonnoir)

Régime de chauffage: 25 °C pendant 12 h, 35 °C pendant 12 h, 45 °C pendant 24 heures (48 h au total). La température doit être mesurée dans le substrat.

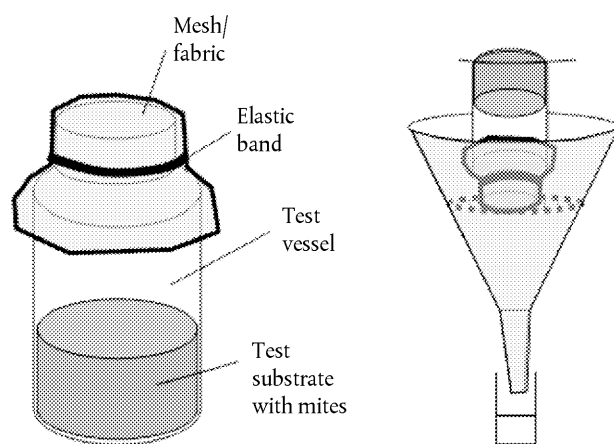
Liquide de fixation: éthanol 70 %

Description détaillée: Utiliser le flacon de verre qui a servi pour l'essai. Retirer le couvercle et couvrir l'ouverture d'un morceau de treillis ou d'étoffe. L'étoffe doit avoir une dimension de maille de 1,0 à 1,5 mm. Fixer l'étoffe avec un élastique. Renverser soigneusement le flacon et le placer dans l'appareil d'extraction. L'étoffe empêche le substrat de couler dans le liquide de fixation, mais laisse les acariens sortir de l'échantillon. Démarrer le chauffage en appliquant le régime ci-dessus après avoir inséré tous les flacons. Terminer l'extraction au bout de 48 heures. Retirer les flacons de fixation et compter les acariens à l'aide d'un microscope à dissection.

Il faut démontrer l'efficacité d'extraction de la méthode choisie une ou deux fois par an en utilisant des récipients contenant un nombre connu d'acariens juvéniles et adultes élevés dans un substrat d'essai non traité. L'efficacité doit atteindre ≥ 90 % en moyenne combinée pour tous les stades de développement.

Dispositif d'extraction de type Tullgren

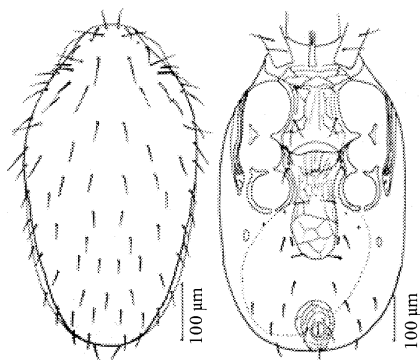
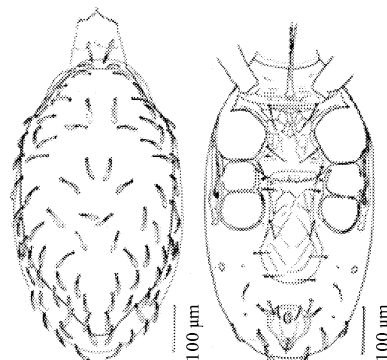
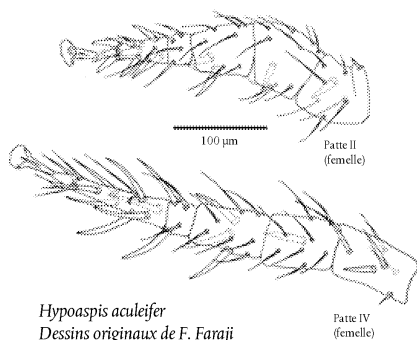
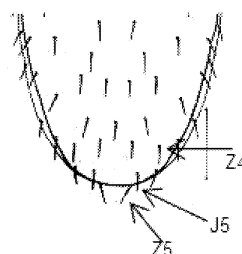
Comment préparer le flacon expérimental à la fin de l'essai et avant l'extraction



Appendice 6

Identification de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Sous-classe/ordre/sous-ordre:	Famille:	Genre/sous-genre/espèce:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	<i>Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer</i>
Auteur et Date:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 janvier 2007	
Article utilisé:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2^e édition révisée: 1-523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400pp. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.	
Caractéristiques de détermination:	Tectum avec un bord denticulaire arrondi; sillons hypostomaux comprenant plus de 6 denticules; poils dorsaux caudaux Z4 assez courts; poils dorsaux sétiformes; bouclier génital normal peu développé et n'atteignant pas le bouclier anal; moitié postérieure du bouclier dorsal sans poils non appariés; pattes II et IV avec quelques macropoils épais; poil dorsal Z5 environ deux fois plus long que J5; doigt fixe de chélicère avec 12-14 dents et doigt mobile avec 2 dents; Idiosome 520-680 µm de longueur. <i>Hypoaspis miles</i> est également utilisé comme témoin biologique et peut être confondu avec <i>H. aculeifer</i>. La principale différence est la suivante: <i>H. miles</i> appartient au sous-genre <i>Cosmolaelaps</i> et ses poils dorsaux sont en forme de lame tandis que <i>H. aculeifer</i> appartient au sous-genre <i>Geolaelaps</i> avec des poils dorsaux sétiformes.	

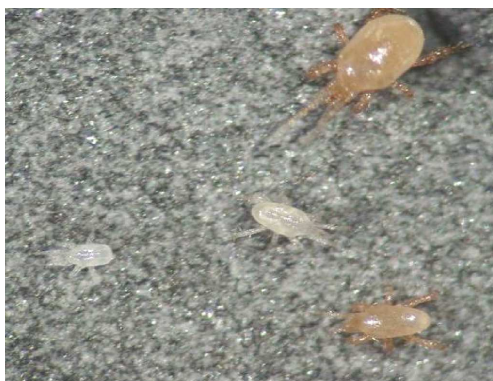
*Hypoaspis aculeifer* d'après Hughes, 1976*Hypoaspis miles* d'après Hughes, 1976*Hypoaspis aculeifer*
Dessins originaux de F. Faraji*Hypoaspis aculeifer*,
bouclier dorsal avec poils caractéristiques

Appendice 7

Informations générales sur la biologie de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Hypoaspis aculeifer appartient à la famille des Lealapidæ, ordre des Acari (acariens), classe des Arachnida, tribu des Arthropoda. Ils vivent dans des sols de tous types et se nourrissent d'autres acariens, de nématodes, d'enchytrées et de collemboles (26). En cas de pénurie alimentaire, ils deviennent cannibales (27). Les acariens prédateurs sont segmentés en idiosome et gnathosome. La différenciation entre l'idiosome dans le prosome (tête) et l'opisthosome (abdomen) n'est pas nette. Le gnathosome (bouclier de la tête contient les pièces pour l'alimentation telles que les pattes et les chélicères. Les chélicères sont divisés en trois branches et munis de dents de différentes formes. Les mâles utilisent leurs chélicères pour l'ingestion, mais également pour transférer les spermatophores aux femelles. Un bouclier dorsal couvre presque complètement l'idiosome. Une grande partie de l'idiosome de la femelle est occupée par les organes reproducteurs, distincts en particulier peu avant la ponte des œufs. Sur la face ventrale, se trouvent deux boucliers, le bouclier sternal et le bouclier génital. Toutes les pattes sont pourvues de soie et d'épines. Les soies servent à l'ancrage lors du déplacement dans le sol ou sur le sol. La première paire de pattes fait essentiellement fonction d'antennes. La seconde paire de pattes sert non seulement au déplacement, mais également à l'immobilisation de la proie. Les épines de la quatrième paire de pattes servent de protection ainsi que de "moteurs de déplacement" (28). Les mâles mesurent de 0,55 à 0,65 mm de long et pèsent de 10 à 15 µg. Les femelles mesurent de 0,8 à 0,9 mm de long et pèsent de 50 à 60 µg (8) (28) (Fig 1).

Fig 1

Femelle, mâle, protonympe et larve de *H. aculeifer*.

À 23 °C, les acariens atteignent la maturité sexuelle au bout de 16 jours (femelles) et de 18 jours (mâles), respectivement (6). Les spermatozoïdes sont transportés dans les femelles par le solénostome depuis lequel ils sont transférés dans l'ovaire. Dans l'ovaire, les spermatozoïdes subissent une maturation et sont stockés. La fécondation n'a lieu qu'après la maturation des spermatozoïdes dans l'ovaire. Les ovules fécondés ou non fécondés sont déposés par les femelles en amas ou séparément, de préférence dans des fissures ou des trous. Les femelles qui ont copulé peuvent porter des juvéniles des deux sexes, tandis qu'en l'absence de copulation, les œufs ne produisent que des juvéniles mâles. Au cours du développement jusqu'à l'âge adulte, les acariens traversent quatre phases (œuf-larve, larve-protonympe, protonympe-deutonympe, deutonympe-adulte).

L'œuf est blanc laiteux, hyalin, elliptique et mesure environ 0,37 mm de long. Il est doté d'un manteau solide. Selon (8), la taille des larves est comprise entre 0,42 et 0,45 mm. Elles n'ont que trois paires de pattes. Des palpes et des chélicères se développent dans la région de la tête. Les chélicères, munis de quelques petits denticules, sont utilisés pour l'éclosion. Après la première mue, un à deux jours après l'éclosion, les protonymphes se développent. Elles sont également blanches, d'une dimension de 0,45 à 0,62 mm (8) et elles possèdent quatre paires de pattes. Les chélicères sont entièrement pourvus de dents. C'est à partir de ce stade que les acariens commencent à rechercher leur nourriture. Dans ce but, la cuticule de la proie est percée par les chélicères et une sécrétion qui permet la digestion extra-intestinale est émise dans la proie. La pâte alimentaire peut ensuite être aspirée par l'acarien. Les chélicères peuvent être également utilisés pour fendre des boulettes d'aliments et en extraire des particules plus grosses (28). Les deutonymphes se développent après une nouvelle mue. Elles mesurent de 0,60 à 0,80 mm (8) et sont de couleur jaune à brun clair. À partir de ce stade, on peut séparer les femelles des mâles. Les acariens atteignent l'âge adulte après une nouvelle ecdysis, pendant laquelle les animaux restent inactifs et le bouclier brun se développe (après environ 14 jours) (28) (29) (30). Leur durée de vie se situe entre 48 et 100 jours à 25 °C (27).

Appendice 8

Résumé et calendrier des principales étapes de l'essai sur Hypoaspis

Temps (jours) début de l'essai = jour 0	Activité/tâche
Jour – 35 à – 28:	Transfert des femelles de la culture mère dans des récipients propres pour initier la synchronisation 2 jours plus tard: prélèvement des femelles Deux ou trois fois par semaine: apport d'aliments en quantité suffisante
Jour – 5 (+/– 2)	Préparation du sol artificiel
Jour – 4 (+/– 2)	Détermination de la capacité de rétention d'eau du sol artificiel Séchage une nuit Jour suivant: pesée des échantillons et calcul de la capacité de rétention d'eau
Jour – 4 (+/– 2)	Pré-humidification du sol artificiel pour obtenir une capacité de rétention d'eau de 20 à 30 %
Jour 0	Début de l'essai: addition de la substance chimique d'essai au sol artificiel Introduction de 10 femelles dans chaque réplica Pesée de chaque réplica Préparation de témoins abiotiques pour la mesure du taux d'humidité et du pH, 2 expériences identiques par traitement Séchage des témoins d'humidité une nuit Jour suivant: pesée des témoins d'humidité Jour suivant: mesure du pH des témoins abiotiques séchés
Jour 3, 6, 9, 12 (environ)	Apport d'une quantité suffisante de proies dans chaque expérience Pesée de chaque expérience et rajout éventuel de la quantité d'eau évaporée
Jour 14	Fin de l'essai, extraction à partir de tous les réplicas et témoins d'efficacité de l'extraction Séchage des témoins de teneur en eau une nuit Jour suivant: pesée des témoins de teneur en eau Jour suivant: mesure du pH des témoins séchés
Jour 16	Fin de l'extraction
Jour 16+	Comptage du nombre d'adultes et de juvéniles dans le matériau extrait Report des résultats sur des tableaux matrices Report du protocole d'essai dans le formulaire des protocoles d'essai

C.37. ESSAI DE 21 JOURS SUR LES POISSONS: ESSAI DE DÉPISTAGE À COURT TERME DE L'ACTIVITÉ ŒSTROGÉNIQUE ET ANDROGÉNIQUE, ET DE L'INHIBITION DE L'AROMATASE**INTRODUCTION**

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 230 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Le développement et la validation d'un essai sur les poissons, capable de détecter des substances chimiques agissant sur le système endocrinien, sont devenus nécessaires du fait des inquiétudes suscitées par la présence dans l'environnement de produits chimiques à des concentrations susceptibles d'avoir des effets néfastes sur l'homme et la faune sauvage. En 1998, l'OCDE a lancé une activité à caractère hautement prioritaire visant à réviser les lignes directrices existantes et à élaborer de nouvelles lignes directrices concernant le dépistage et l'essai d'éventuels perturbateurs endocriniens. L'un des volets de cette activité consistait à élaborer une ligne directrice pour le dépistage des substances actives sur le système endocrinien des poissons. L'essai de 21 jours pour le dépistage des perturbateurs endocriniens des poissons a fait l'objet d'un programme de validation très complet comprenant des études inter-laboratoires portant sur une série de substances et visant à démontrer la pertinence et la fiabilité de l'essai pour la détection des agonistes/antagonistes des œstrogènes, des androgènes et de l'enzyme aromatase (1, 2, 3, 4, 5) chez trois espèces de poissons (le tête-de-boule (*Pimephales promelas*), le medaka japonais (*Oryzias latipes*) et le poisson-zèbre (*Danio rerio*)); la détection de l'activité androgénique est possible chez le tête-de-boule et le medaka, mais pas chez le poisson zèbre. La présente méthode d'essai ne permet pas la détection des antagonistes des androgènes. Les travaux de validation ont été revus par un comité composé d'experts désignés par les coordinateurs nationaux du programme sur les lignes directrices pour les essais (6). Cet essai n'est pas conçu pour identifier les mécanismes spécifiques du dérèglement hormonal dans la mesure où les animaux d'essai possèdent un axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG) sain et sont en mesure de réagir aux substances ayant des effets sur l'axe HHG à différents niveaux. L'essai à court terme de reproduction des poissons (ligne directrice 229 de l'OCDE) prend en compte la mesure de la fécondité, et le cas échéant l'histopathologie gonadique pour le tête-de-boule, ainsi que les observations mesurées dans la présente méthode d'essai. La ligne directrice 229 de l'OCDE permet un dépistage des substances chimiques qui affectent la reproduction par différents mécanismes, y compris des mécanismes endocriniens. Ces aspects doivent être pris en considération pour choisir la méthode d'essai qui répond le mieux aux besoins.
2. La présente méthode d'essai décrit un essai de dépistage *in vivo* sur des groupes de poissons (composés de mâles sexuellement matures et de femelles reproductrices) exposés à une substance pendant une durée limitée de leur cycle biologique (21 jours). À l'issue de cette période d'exposition de 21 jours, en fonction de l'espèce testée un ou deux biomarqueur(s) sont mesurés chez les mâles et les femelles pour servir d'indicateurs des effets de la substance chimique d'essai sur l'activité œstrogénique, androgénique ou sur l'inhibition de l'aromatase. Ces biomarqueurs sont la vitellogénine (VTG) et les caractères sexuels secondaires. La vitellogénine est dosée chez le tête-de-boule, le medaka japonais et le poisson-zèbre tandis que les caractères sexuels secondaires sont mesurés chez le tête-de-boule et le medaka japonais uniquement.
3. Ce bio-essai sert d'essai de dépistage *in vivo* pour certains modes d'action liés au système endocrinien, et son application est envisagée dans le contexte du "Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation de perturbateurs endocriniens".

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

4. La vitellogénine (VTG) est normalement produite par le foie des femelles vertébrées ovipares en réponse à la circulation d'œstrogènes endogènes. Il s'agit d'un précurseur des protéines du vitellus, produit par le foie puis acheminé par le sang vers les ovaires, où il est capté et modifié par les ovocytes en croissance. La vitellogénine est quasiment indétectable dans le plasma des poissons mâles et femelles immatures, et ce en raison d'une présence insuffisante d'œstrogènes circulants; néanmoins, le foie peut synthétiser et sécréter la vitellogénine en réponse à une stimulation œstrogénique exogène.
5. Le dosage de la vitellogénine sert à détecter les substances ayant une action (anti-)œstrogénique. Cette détection peut se faire par la mesure de l'induction de vitellogénine chez les poissons mâles; elle a fait l'objet de nombreuses publications scientifiques dans des revues à comité de lecture [(7), par exemple]. L'induction de vitellogénine a également été démontrée suite à une exposition à des androgènes aromatisables (8, 9). La diminution du taux d'œstrogènes circulants chez les femelles sous l'effet, par exemple, de l'inhibition de l'aromatase, l'enzyme permettant de convertir l'androgène endogène en œstrogène naturel (17 β -œstradiol), engendre une diminution du niveau de vitellogénine utilisée pour détecter les inhibiteurs d'aromatase (10, 11). La pertinence biologique de la réponse donnée par la vitellogénine suite à l'inhibition des œstrogènes/de l'aromatase est établie et a été abondamment étudiée. Néanmoins la production de VTG chez les femelles peut également être affectée par une toxicité générale et des modes d'action toxiques non-endocriniens (hépatotoxicité, par exemple).

6. Plusieurs méthodes de mesure ont été développées avec succès et normalisées en vue d'essais de routine. Ainsi, le test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) est un principe de reconnaissance immunologique couplé à une réaction enzymatique permettant de doser la vitellogénine à partir de prélèvements sanguins ou hépatiques effectués sur des poissons (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Les échantillons sont prélevés sur trois espèces: le tête-de-boule (sang), le poisson-zèbre (sang ou homogénat tête/queue) et le medaka (foie). Chez le medaka, il existe une bonne corrélation entre la concentration sanguine et la concentration hépatique de VTG (19). Les procédures recommandées pour les prélèvements effectués à des fins de dosage de la vitellogénine sont décrites à l'Appendice 6. Des kits de dosage de la vitellogénine sont largement disponibles; ils sont fondés sur une méthode ELISA validée et spécifique de l'espèce testée.
7. Les caractères sexuels secondaires des poissons mâles de certaines espèces sont visibles à l'œil nu, quantifiables et réactifs aux taux d'androgènes endogènes circulants; c'est le cas pour le tête-de-boule et le medaka mais pas pour le poisson-zèbre, qui ne possède pas de caractères sexuels secondaires quantifiables. Les femelles conservent la capacité de développer des caractères sexuels secondaires masculins en cas d'exposition à des substances androgènes présentes dans l'eau. Un certain nombre d'études scientifiques traitent de ce type de réponse chez le tête-de-boule (20) et le medaka (21). La dégénérescence des caractères sexuels secondaires chez les mâles est interprétée avec prudence en raison de leur faible puissance statistique. Par ailleurs, toute interprétation en la matière est fondée sur un jugement expert et sur l'analyse du poids de la preuve. L'utilisation du poisson-zèbre pour cet essai a ses limites compte tenu de l'absence, chez cette espèce, de caractères sexuels secondaires quantifiables, réactifs aux substances chimiques agissant sur les androgènes.
8. Chez le tête-de-boule, le nombre de tubercules nuptiaux situés sur le museau des femelles constitue le principal indicateur d'exposition à des androgènes exogènes. Chez le medaka femelle, le nombre de tubercules papillaires constitue le principal indicateur d'exposition à des substances androgènes exogènes. Les recommandations sur les procédures à suivre pour évaluer les caractères sexuels secondaires du tête-de-boule et du medaka figurent respectivement à l'Appendice 5A et à l'Appendice 5B.
9. Les définitions utilisées dans la présente méthode d'essai figurent à l'Appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

10. Lors de l'essai, des poissons mâles et femelles en état de se reproduire sont placés ensemble dans des cuves où ils sont exposés à des substances chimiques. Leur état d'adultes reproducteurs permet une différenciation claire entre les deux sexes, et donc une analyse de chaque biomarqueur en fonction du sexe; il garantit également leur sensibilité aux substances exogènes. A la fin de l'essai, le sexe est confirmé par un examen macroscopique des gonades après incision de l'abdomen avec des ciseaux. Un tableau récapitulatif des conditions expérimentales pertinentes figure à l'Appendice 2. Pour cet essai on sélectionne normalement des poissons en état de frayer; les animaux sénescents sont écartés. La section relative à la sélection des poissons donne des indications sur l'âge des poissons et sur leur état reproducteur. Trois concentrations d'essai ainsi qu'une cuve témoin contenant de l'eau sont utilisées. Un autre témoin contenant un solvant peut être utilisé si nécessaire. Deux cuves ou répliquats par traitement sont utilisées (chaque cuve contenant 5 mâles et 5 femelles) pour le medaka et le poisson-zèbre; quatre cuves ou répliquats par traitement sont utilisées (chaque cuve comprenant 2 mâles et 4 femelles) pour le tête-de-boule. Ce principe permet de tenir compte du comportement territorial des têtes-de-boule mâles tout en maintenant la puissance de l'essai à un niveau suffisant. La durée d'exposition est de 21 jours; le prélèvement des poissons est effectué le 21^e jour.
11. Le 21^e jour, tous les poissons sont euthanasiés. Les caractères sexuels secondaires du tête-de-boule et du medaka sont évalués (cf. Appendice 5A et Appendice 5B); des prélèvements sanguins sont effectués pour le dosage de la vitellogénine chez le poisson-zèbre et le tête-de-boule, mais un homogénat tête/queue peut aussi être utilisé pour le dosage de la vitellogénine chez le poisson-zèbre (Appendice 6); des prélèvements hépatiques sont effectués pour le dosage de la VTG chez le medaka (Appendice 6).

CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

12. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables, les conditions sont les suivantes:
 - La mortalité dans les cuves témoins (eau ou solvant) ne dépasse pas 10 % à la fin de la période d'exposition;
 - la concentration d'oxygène dissous est maintenue à 60 % au moins de la valeur de la saturation en air (VSA) durant toute la période d'exposition;

- à aucun moment, durant toute la période d'exposition, la température de l'eau ne diffère de plus de $\pm 1,5^\circ \text{C}$ entre les cuves, et elle demeure à l'intérieur d'un intervalle de 2°C compris dans la plage de température indiquée pour l'espèce étudiée (Appendice 2);
- les données disponibles démontrent que la concentration de la substance chimique d'essai en solution a été correctement maintenue dans un intervalle de $\pm 20\%$ autour des valeurs moyennes mesurées.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

13. On utilise du matériel courant de laboratoire et en particulier:
 - a) un pH-mètre et un appareil à mesurer l'oxygène;
 - b) un instrument pour mesurer la dureté et l'alcalinité de l'eau;
 - c) un dispositif adéquat de régulation de la température avec, de préférence, une surveillance en continu;
 - d) des cuves en matériau chimiquement inerte et d'une capacité adaptée à la charge et à la densité de peuplement recommandées (Appendice 2);
 - e) un substrat de frai pour les têtes-de-boule et les poissons-zèbres (voir Appendice 4);
 - f) une balance suffisamment précise (précision de $\pm 0,5\text{mg}$).

Eau

14. On utilise une eau dans laquelle l'espèce testée présente des taux adéquats de croissance et de survie à long terme. Sa qualité demeure constante pendant la durée de l'essai. Le pH de l'eau est compris entre 6,5 et 8,5 sans varier de plus de $\pm 0,5$ unité de pH au cours d'un même essai. Pour s'assurer que l'eau de dilution ne modifiera pas le résultat de l'essai (notamment par complexation de la substance chimique d'essai), on prélèvera des échantillons à différents intervalles pour analyse. Le dosage des métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, etc.), des principaux anions et cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , etc.), des pesticides (total des pesticides organophosphorés et organochlorés, etc.), du carbone organique total et des solides en suspension est effectué tous les trois mois, par exemple, pour une eau de dilution dont on sait que sa qualité est relativement constante. Si la qualité de l'eau s'est révélée constante durant au moins un an, on peut espacer les mesures (tous les six mois, par exemple). Certaines caractéristiques chimiques pour une eau de dilution acceptable sont énumérées à l'Appendice 3.

Solutions d'essai

15. Des solutions d'essai sont ajustées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. La solution mère est, de préférence, préparée par simple mélange ou agitation de la substance chimique d'essai dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (secouement ou ultrasons, par exemple). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) peuvent être utilisées pour réaliser une solution mère de concentration adéquate. L'emploi d'un véhicule solvant n'est pas recommandé mais peut s'avérer nécessaire. Dans ce cas, il faut tester en parallèle une cuve témoin contenant la même concentration de solvant que les cuves contenant la substance. Pour les substances difficiles à tester, un solvant peut être la meilleure solution technique et le Document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges "difficiles" devrait être consulté (22). Le choix du solvant est déterminé par les propriétés chimiques de la substance. Le Document d'orientation de l'OCDE recommande de ne pas dépasser une concentration maximale de $100\text{ }\mu\text{l/l}$. Toutefois une étude récente (23) a montré que l'utilisation de solvants lors des essais de substances ayant des effets sur le système endocrinien pouvait poser d'autres problèmes. Si l'utilisation d'un solvant s'avère nécessaire, il est donc recommandé de réduire sa concentration à un minimum dans toute la mesure des possibilités techniques (qui dépendent des propriétés physicochimiques de la substance chimique d'essai).
16. On utilise un système à écoulement continu. On utilise un essai dynamique requérant un système qui délivre et dilue en continu une solution mère de la substance chimique d'essai (pompe doseuse, dilueur proportionnel, système de saturation, par exemple) pour appliquer une série de concentrations dans les enceintes d'essai. Le débit des solutions mères et de l'eau de dilution est vérifié périodiquement, de préférence tous les jours, pendant la durée de l'essai et ne varie pas de plus de 10% durant l'essai. Il faut veiller à éviter l'utilisation de tubes en plastique de mauvaise qualité ou autres matériaux pouvant contenir des substances chimiques biologiquement actives. Pour la sélection du matériel pour l'essai dynamique, l'adsorption possible de la substance chimique d'essai sur le matériel est prise en compte.

Maintenance des poissons

17. Les poissons d'essai sont sélectionnés parmi une population de laboratoire, issue de préférence d'une même lignée, qui a été acclimatée pendant au moins deux semaines avant l'essai dans des conditions de qualité de l'eau et d'éclairage similaires à celles de l'essai. Il importe que le taux de charge et la densité de peuplement (voir les définitions à l'Appendice 1) soient adaptés à l'espèce testée (voir Appendice 2).
18. Après une période d'acclimatation de 48 heures, on note les mortalités et on applique les critères suivants:
 - mortalité supérieure à 10 % de la population en sept jours: le lot entier est rejeté;
 - mortalité comprise entre 5 et 10 % de la population: la période d'acclimatation est prolongée de sept jours; si la mortalité dépasse 5 % durant la deuxième période de 7 jours, le lot entier est rejeté;
 - mortalité inférieure à 5 % de la population en sept jours: le lot est accepté.
19. Les poissons ne reçoivent pas de traitement pour maladie durant les périodes d'acclimatation, de pré-exposition et d'exposition.

Pré-exposition et sélection des poissons

20. Pendant la période de pré-exposition (recommandée d'une semaine), les poissons sont placés dans des cuves similaires à celles de l'essai. Il est préférable de nourrir les poissons *ad libitum* durant toute la période d'acclimatation et d'exposition. La période d'exposition débute avec des adultes sexuellement dimorphes issus d'une population de laboratoire d'animaux sexuellement matures (présentant, par exemple, des caractères sexuels secondaires visibles à l'œil nu en ce qui concerne le tête-de-boule et le medaka), se reproduisant activement. À titre d'orientation générale (ne devant pas être prise en considération indépendamment de l'observation de l'état reproducteur du lot entier), le poisson tête-de-boule est âgé d'environ 20 ($\pm$ 2) semaines, s'il a bénéficié d'une température de 25 $\pm$ 2 °C pendant son élevage; le medaka japonais est âgé d'environ 16 ($\pm$ 2) semaines, s'il a bénéficié d'une température de 25 $\pm$ 2 °C pendant son élevage; et le poisson-zèbre est âgé d'environ 16 ($\pm$ 2) semaines, s'il a bénéficié d'une température de 26 $\pm$ 2 °C pendant son élevage.

CONCEPTION DE L'ESSAI

21. Trois concentrations de la substance chimique d'essai ainsi qu'une cuve témoin (contenant de l'eau) sont utilisées. Un autre témoin contenant un solvant peut être utilisé si nécessaire. Les données peuvent faire l'objet d'analyses statistiques permettant de déceler les différences significatives entre les réponses correspondant à chaque niveau de concentration et au témoin. Plutôt que de servir à l'évaluation des risques, ces analyses sont utiles pour déterminer si la substance chimique doit faire l'objet de tests afin d'évaluer ses éventuels effets néfastes à plus long terme (survie, développement, croissance et reproduction) (24).
22. Pour les espèces medaka et poisson-zèbre, des échantillons sont prélevés le 21^{ème} jour dans les groupes traités à chaque niveau de concentration (chacun des deux répliquats comprenant 5 mâles et 5 femelles) et dans chaque groupe témoin en vue du dosage de la vitellogénine et de l'évaluation des caractères sexuels secondaires, le cas échéant. Pour les têtes-de-boule, des échantillons sont prélevés le 21^{ème} jour dans les groupes traités à chaque niveau de concentration (chacun des quatre répliquats comprenant 2 mâles et 4 femelles) et dans chaque groupe témoin en vue du dosage de la vitellogénine et de l'évaluation des caractères sexuels secondaires.

Sélection des concentrations d'essai

23. Pour les besoins de l'essai, la concentration la plus forte est déterminée en fonction de la concentration maximale tolérée (CMT) obtenue à partir d'un essai préliminaire de détermination des concentrations d'essai ou à partir d'autres données de toxicité, est fixée à 10 mg/l, ou est déterminée en fonction de la solubilité maximale dans l'eau, selon la valeur qui est la plus basse. La CMT est définie comme la concentration d'essai maximale de la substance engendrant un taux de mortalité inférieur à 10 %. L'utilisation de cette approche suppose l'existence de données empiriques sur la toxicité aiguë ou d'autres données de toxicité à partir desquelles la CMT pourra être estimée. L'estimation de la CMT peut être inexacte et requiert généralement un jugement expert.
24. Trois concentrations d'essai, espacées par un facteur constant ne dépassant pas 10, et une cuve témoin contenant l'eau de dilution (plus, si nécessaire, une cuve contenant un solvant) sont nécessaires. Les facteurs d'espacement sont situés entre 3,2 et 10.

MODE OPÉRATOIRE

Sélection et pesée des poissons d'essai

25. Il importe de veiller à ce que le poids des poissons varie le moins possible au début de l'essai. L'Appendice 2 indique les gammes de poids qui conviennent aux différentes espèces recommandées pour cet essai. Si possible, au début de l'essai, la gamme des poids de l'ensemble des poissons mâles et femelles du lot utilisé ne sort pas d'un intervalle de ± 20 % autour de la moyenne arithmétique de chaque sexe. On recommande de peser un sous-échantillon de poissons avant l'essai afin d'estimer le poids moyen.

Conditions d'exposition*Durée*

26. La durée de l'essai est de 21 jours, après une période de pré-exposition. La durée de préexposition recommandée est d'une semaine.

Alimentation

27. Les poissons reçoivent *ad libitum* une nourriture appropriée (Appendice 2) en quantité suffisante pour maintenir leur condition physique. Il faut veiller à prévenir la prolifération de micro-organismes et la turbidité de l'eau. A titre d'indication générale, la ration quotidienne peut être divisée en deux ou trois parts égales administrées à trois heures d'intervalle au moins. Une seule ration plus conséquente est acceptable, notamment le week-end. Les poissons sont privés de nourriture pendant les 12 heures qui précèdent les prélèvements/l'autopsie.
28. Le dosage des contaminants [pesticides organochlorés, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), biphényles poly chlorés (PCB)] est effectué dans la nourriture. La nourriture présentant une forte concentration de phytestrogènes qui compromettraient la réponse de l'essai à un agoniste œstrogénique connu (17 β œstradiol, par exemple) est évitée.
29. Les aliments non consommés et les matières fécales sont retirés des cuves au moins deux fois par semaine, par un nettoyage soigneux du fond de chaque cuve à l'aide d'un siphon, par exemple.

Lumière et température

30. La photopériode et la température de l'eau sont adaptées à l'espèce testée (voir Appendice 2).

Fréquence des dosages analytiques et des mesures

31. Avant le début de la période d'exposition, le bon fonctionnement du système de distribution de la substance est vérifié. Toutes les méthodes analytiques nécessaires sont établies, y compris des connaissances suffisantes sur la stabilité de la substance dans le système d'essai. Pendant l'essai, les concentrations de la substance chimique d'essai sont déterminées à intervalles réguliers, en vérifiant de préférence chaque jour, mais à défaut au moins deux fois par semaine, le débit du diluant et celui de la solution mère de substance toxique. Ces débits ne varient pas de plus de 10 % pendant toute la durée de l'essai. Il est recommandé de mesurer les concentrations de la substance d'essai dans chaque cuve au début de l'essai puis chaque semaine.
32. Il est recommandé de fonder les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si la concentration de la substance chimique d'essai en solution a été correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale, les résultats peuvent être calculés à partir des valeurs nominales ou mesurées.
33. Les échantillons peuvent avoir besoin d'être filtrés (avec des pores de 0,45 μ m, par exemple) ou centrifugés. Si elle est nécessaire, la centrifugation est la procédure recommandée. Cependant, si le matériel d'essai ne s'adsorbe pas sur le filtre, la filtration est également acceptable.

34. Pendant l'essai, l'oxygène dissous, la température et le pH sont mesurés dans toutes les cuves au moins une fois par semaine. La dureté totale et l'alcalinité sont mesurées au moins une fois par semaine dans les cuves témoins et dans une cuve contenant la concentration la plus forte. Il est préférable de surveiller la température en continu dans au moins une cuve d'essai.

Observations

35. Un certain nombre de réponses biologiques générales (survie, par exemple) et ciblées par l'essai (niveaux de vitellogénine, par exemple) sont évaluées au cours ou à la fin de l'essai. La mesure et l'évaluation de ces biomarqueurs ainsi que leur utilité sont décrits dans la suite de cette Ligne directrice.

Survie

36. Il convient d'examiner les poissons quotidiennement durant l'essai. Les décès sont notés et les poissons morts retirés de la cuve dès que possible. Les poissons morts ne sont pas remplacés dans les cuves témoins ou les cuves contenant la substance. Le sexe des poissons morts durant l'essai est déterminé par observation macroscopique des gonades.

Comportement et apparence

37. Tout comportement anormal (par rapport aux témoins) est noté, car il peut être un signe de toxicité générale (hyperventilation, nage non coordonnée, perte d'équilibre, immobilité ou alimentation atypiques). Il convient en outre de relever les éventuelles anomalies externes (hémorragie, décoloration, par exemple). La prudence s'impose lors de l'interprétation de ces signes de toxicité dans la mesure où ceux-ci peuvent révéler des concentrations auxquelles les biomarqueurs d'effets potentiels sur le système endocrinien ne sont pas fiables. Ces observations sur le comportement peuvent aussi fournir des informations qualitatives utiles pour les futures exigences potentielles en matière d'essais sur les poissons. On a ainsi pu observer une agressivité territoriale chez les têtes-de-boule mâles normaux ou chez les têtes-de-boule femelles masculinisées en cas d'exposition à des androgènes. Le comportement caractéristique d'accouplement et de reproduction du poisson-zèbre après les premières lueurs de l'aube est réduit ou entravé par l'exposition aux œstrogènes ou aux anti-androgènes.
38. La manipulation des poissons pouvant engendrer une modification rapide de certaines caractéristiques physiques (notamment la couleur), il importe de procéder aux observations qualitatives avant le retrait des poissons du système expérimental. Les expériences menées jusqu'à présent sur le tête-de-boule donnent à penser que certains perturbateurs endocriniens peuvent d'emblée avoir des effets sur les caractéristiques physiques suivantes: couleur (claire ou sombre), motifs de coloration (présence de bandes verticales) et forme du corps (région de la tête et région pectorale). Les observations relatives aux caractéristiques physiques des poissons sont donc notées au cours et à la fin de l'essai.

Euthanasie des poissons

39. Le 21^e jour, c'est-à-dire à la fin de la période d'exposition, les poissons sont euthanasiés à l'aide de quantités de tricaine appropriées [solution de 100-500 mg/l de méthanesulfonate de tricaine (MS 222) (CAS 886-86-2) tamponnée avec 300 mg/l de NaHCO₃ (bicarbonate de sodium, CAS 144-55-8)] destinées à réduire l'irritation de la muqueuse; des prélèvements de sang et de tissus sont ensuite effectués pour le dosage de la vitellogénine (voir la section sur la vitellogénine).

Observation des caractères sexuels secondaires

40. Certains perturbateurs endocriniens peuvent avoir des effets sur des caractères sexuels secondaires spécialisés (nombre de tubercules nuptiaux chez le tête-de-boule mâle et de tubercules papillaires chez le medaka mâle). Certaines substances peuvent notamment engendrer l'apparition anormale de caractères sexuels secondaires chez les animaux du sexe opposé. Ainsi les agonistes des récepteurs d'androgènes tels que le trenbolone, la méthyltestostérone et la dihydrotestostérone peuvent provoquer l'apparition de tubercules nuptiaux proéminents chez le tête-de-boule femelle et celle de tubercules papillaires chez le medaka femelle (20, 11, 21). On a pu noter également que les agonistes des récepteurs d'œstrogènes peuvent réduire le nombre de tubercules nuptiaux et la taille de l'amas graisseux situé sur la tête des adultes mâles de tête-de-boule (25, 26). Ces observations morphologiques macroscopiques peuvent fournir des informations qualitatives et quantitatives utiles pour fonder d'éventuelles exigences futures en matière d'essais sur les poissons. Le nombre et la taille des tubercules nuptiaux chez le tête-de-boule ainsi que ceux des tubercules papillaires chez le medaka peuvent être quantifiés directement, ou de manière plus pratique sur des spécimens préservés. Les recommandations sur les procédures applicables pour l'évaluation des caractères sexuels secondaires du tête-de-boule et du medaka figurent respectivement à l'Appendice 5A et à l'Appendice 5B.

Vitellogénine (VTG)

41. Un prélèvement sanguin est effectué dans l'artère / la veine caudale grâce à un tubule capillaire à microhémotocrite héparinisé ou par ponction cardiaque avec une seringue. Selon la taille du poisson, les volumes sanguins prélevés sont généralement de 5 à 60 μ l par individu pour les têtes-de-boule et de 5 à 15 μ l par individu pour les poissons-zèbres. Le plasma est séparé du sang par centrifugation avant d'être stocké avec des inhibiteurs de protéase à -80°C jusqu'à son analyse pour le dosage de la vitellogénine. Chez le medaka, un prélèvement hépatique est utilisé; chez le poisson-zèbre, un homogénat tête/queue peut être utilisé comme échantillon tissulaire pour le dosage de la vitellogénine (Appendice 6). Le dosage de la VTG est effectué à l'aide d'une méthode ELISA homologue validée en utilisant des anticorps homologues et un standard de VTG homologue. Il est recommandé d'utiliser une méthode capable de détecter des concentrations de VTG de quelques ng/ml de plasma (ou ng/mg de tissus) seulement, correspondant à la concentration de fond chez les poissons mâles non exposés.
42. Le contrôle qualité de l'analyse de la vitellogénine se fait par le biais de solutions-étalons, de blancs et, au minimum, d'analyses dédoublées. Pour chaque méthode ELISA, l'effet de matrice (effet de la dilution de l'échantillon) est testé afin de déterminer le facteur de dilution minimale de l'échantillon. Chaque plaque ELISA utilisée pour le dosage de la VTG comporte les échantillons de contrôle qualité suivants: au moins six solutions-étalons couvrant la plage des concentrations attendues de vitellogénine, et au moins un blanc d'essai de liaison non spécifique (en analyse dédoublée). L'absorbance de ces blancs est inférieure à 5 % de l'absorbance maximale des solutions-étalons. Au moins deux aliquotes (puits dédoublés) de chaque dilution de l'échantillon sont analysés. Les puits dédoublés qui diffèrent de plus de 20 % font l'objet d'une nouvelle analyse.
43. Le coefficient de corrélation (R^2) des courbes d'étalonnage est supérieur à 0,99. Toutefois une corrélation élevée ne suffit pas à garantir la prédiction adéquate de la concentration pour toutes les plages de concentration. En plus d'obtenir une corrélation suffisamment élevée pour la courbe d'étalonnage, la concentration de chaque solution-étalon, calculée à partir de la courbe d'étalonnage, est comprise entre 70 et 120 % de sa concentration nominale. Si les concentrations nominales ont tendance à s'éloigner de la droite de régression de l'étalonnage (à des concentrations plus faibles, par exemple), il peut s'avérer nécessaire de partager la courbe d'étalonnage en deux plages, l'une forte et l'autre faible, ou d'utiliser un modèle non linéaire pour ajuster correctement les données relatives à l'absorbance. Si la courbe est partagée, les deux segments de droite doivent avoir un coefficient de corrélation $R^2 > 0,99$.
44. La limite de détection (LDD) est définie comme la limite en deçà de laquelle la concentration est trop faible pour que la substance soit détectée, et la limite de quantification (LDQ) est définie comme la limite en deçà de laquelle la concentration est trop faible pour que la substance soit détectée, multipliée par le facteur de dilution le plus faible.
45. Chaque jour où des essais portant sur la vitellogénine sont réalisés, un échantillon fortifié obtenu à partir d'un étalon de référence inter-essais sera analysé (Appendice 7). On notera alors systématiquement le rapport entre la concentration attendue et la concentration mesurée avec les résultats de chaque série d'essais effectués ce jour-là.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation de la réponse des biomarqueurs par l'analyse de la variance (ANOVA)

46. Pour identifier les effets potentiels d'une substance sur le système endocrinien, on compare les réponses des groupes traités et des groupes témoins en utilisant l'analyse de la variance (ANOVA). Si un témoin contenant un solvant est utilisé, une analyse statistique appropriée du témoin contenant l'eau de dilution et du témoin contenant le solvant est effectuée pour chaque effet observé. On trouvera dans OCDE (2006c) (27) des orientations sur le traitement des données relatives au témoin contenant l'eau de dilution et au témoin contenant le solvant lors de l'analyse statistique ultérieure. Les réponses biologiques obtenues sont analysées et notées séparément pour chaque sexe. Si les hypothèses requises concernant les méthodes paramétriques ne se vérifient pas — distribution non normale (par exemple test de Shapiro-Wilk) ou variance hétérogène (test de Bartlett ou de Levene) — il faudra envisager de transformer les données pour homogénéiser les variances avant de réaliser l'ANOVA ou de conduire une analyse pondérée de la variance. Le test de Dunnett (paramétrique) permettant de multiples comparaisons par paires ou le test de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni (non paramétrique) peuvent être utilisés pour une relation dose-réponse non monotone. D'autres tests statistiques peuvent être utilisés (test de Jonckheere-Terpstra ou de Williams) si la relation dose-réponse est approximativement monotone. Un ordinogramme d'analyse statistique figure à l'Appendice 8. Cet outil d'aide à la décision permet de choisir le test statistique le plus approprié. Le document de l'OCDE sur les méthodes actuelles d'analyse statistique des données d'écotoxicité (27) fournit d'autres informations en la matière.

Communication des résultats des essais

47. Le rapport d'essai contient les informations suivantes:

Installation d'essai:

- Personnel chargé de l'étude et responsabilités de chacun;
- Chaque laboratoire a démontré sa compétence sur une gamme de substances chimiques représentatives;

Substance chimique d'essai:

- Caractérisation de la substance chimique d'essai
- Nature physique et propriétés physico-chimiques pertinentes;
- Méthode et fréquence de préparation des concentrations d'essai;
- Informations sur la stabilité et la biodégradabilité;

Solvant:

- Caractérisation du solvant (nature, concentration utilisée);
- Justification du choix du solvant (si autre que l'eau);

Animaux d'expérience:

- Espèce et souche;
- Fournisseur et équipements particuliers du fournisseur;
- Âge des poissons au début de l'essai et état reproducteur;
- Informations détaillées sur la procédure d'acclimatation des animaux;
- Poids corporel des poissons au début de l'exposition (déterminé à partir d'un sous-échantillon issu de la population de poissons);

Conditions de l'essai:

- Méthode utilisée (type d'essai, taux de charge, densité de peuplement, etc.);
- Méthode de préparation des solutions mères et débit;
- Concentrations d'essai nominales, dosage hebdomadaire de la concentration des solutions d'essai et méthode analytique utilisée, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les cuves d'essai et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations de la substance chimique d'essai en solution vraie;
- Caractéristiques de l'eau de dilution (pH, dureté, alcalinité, température, concentration d'oxygène dissous, teneurs résiduelles en chlore, carbone organique total, solides en suspension et toute autre mesure effectuée);
- Qualité de l'eau dans les cuves d'essai: pH, dureté, température et concentration d'oxygène dissous;
- Informations détaillées sur l'alimentation (par exemple type d'aliments, provenance, quantité donnée et fréquence) et analyse des contaminants pertinents (PCB, HAP et pesticides organochlorés, par exemple);

Résultats:

- Données montrant que les témoins remplissent les critères de validité de l'essai;
- Données sur la mortalité pour chaque concentration d'essai et chaque témoin;
- Techniques d'analyse statistique appliquées, traitement des données et justification des méthodes utilisées;
- Données sur les observations biologiques de morphologie macroscopique, y compris les caractères sexuels secondaires et la vitellogénine;
- Résultats des analyses de données, de préférence sous forme de tableaux et de graphiques;
- Fréquence des réactions inhabituelles des poissons et des effets visibles produits par la substance chimique d'essai.

ORIENTATIONS POUR L'INTERPRÉTATION ET L'ACCEPTATION DES RÉSULTATS DE L'ESSAI

48. Cette partie traite des paramètres à prendre en compte pour l'interprétation des résultats de l'essai en ce qui concerne les différents effets mesurés. Les résultats sont interprétés avec prudence lorsque la substance chimique d'essai semble provoquer des signes de toxicité manifestes ou avoir des effets sur l'état général de l'animal d'expérience.
49. Lors de l'essai préliminaire de détermination des concentrations d'essai, on veillera à ne pas dépasser la concentration maximale tolérée pour pouvoir interpréter les données de façon fiable. Il importe d'appliquer au moins un traitement qui ne provoque aucun signe d'effets toxiques. Les symptômes de maladie et les signes d'effets toxiques font l'objet d'une évaluation et d'un rapport détaillés. Il est possible, par exemple, que la production de VTG chez les femelles soit également affectée par une toxicité générale et des modes d'action toxiques non liés au système endocrinien (hépatotoxicité, par exemple). Toutefois l'interprétation des effets peut être renforcée par d'autres niveaux de traitement dont les effets ne sont pas perturbés par la toxicité systémique.
50. Quelques paramètres sont pris en compte pour l'acceptation des résultats de l'essai. A titre indicatif, les niveaux de VTG sont distincts chez les mâles et les femelles témoins, et séparés d'au moins trois ordres de grandeur chez le tête-de-boule et le poisson-zèbre et d'un ordre de grandeur chez le medaka. Des exemples de la gamme des valeurs relevées dans les groupes témoins et les groupes traités sont disponibles dans les rapports de validation (1, 2, 3, 4). Des valeurs élevées de VTG chez les mâles des groupes témoins peuvent compromettre la performance de l'essai et sa capacité de détection des agonistes des œstrogènes de faible puissance. Des valeurs de VTG basses chez les femelles témoins peuvent compromettre la performance de l'essai et sa capacité de détection des inhibiteurs de l'aromatase et des antagonistes des œstrogènes. Les études de validation ont été utilisées pour la rédaction de ces orientations.
51. Si un laboratoire n'a pas procédé à cet essai auparavant ou s'il a procédé à des modifications substantielles (changement de souche ou de fournisseur de poissons, par exemple), il est conseillé de faire un essai pour vérifier la compétence technique. Il est recommandé d'utiliser des substances représentant une gamme de modes d'action ou d'impacts sur certains des paramètres mesurés durant l'essai. En pratique, chaque laboratoire est encouragé à constituer ses propres données de contrôle historiques pour les mâles et les femelles, et à faire un essai avec un témoin positif de l'activité œstrogénique (par exemple, 17 β -œstradiol à 100 ng/l/1, ou un agoniste faible connu) engendrant une augmentation de la VTG chez les mâles, un témoin positif de l'inhibition de l'aromatase (fadrozole ou prochloraz à 300 μ g/l, par exemple) engendrant une diminution de la VTG chez les femelles, et un témoin positif de l'activité androgénique (17 β -trenbolone à 5 μ g/l, par exemple) engendrant l'induction de caractères sexuels secondaires chez les femelles tête-de-boule et medaka. Toutes ces données peuvent être comparées aux données disponibles issues des études de validation (1, 2, 3) pour garantir la compétence du laboratoire.
52. En général, les mesures de la vitellogénine sont considérées comme positives en cas d'augmentation statistiquement significative de la VTG chez les mâles ($p < 0,05$) ou de baisse statistiquement significative chez les femelles ($p < 0,05$), et ce au moins à la concentration maximale soumise à l'essai par rapport au groupe témoin, et en l'absence de signes de toxicité générale. Un résultat positif est en outre confirmé par la démonstration d'une relation dose-réponse biologiquement plausible. Comme mentionné précédemment, la baisse de la vitellogénine peut ne pas être entièrement liée au système endocrinien; toutefois un résultat positif est en général interprété comme un élément de preuve d'une activité du système endocrinien *in vivo*, et motive normalement des actions visant à une clarification plus poussée

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE — Série sur les essais et l'évaluation, n° 60, ENV/JM/MON0(2006)27.
- (2) OCDE (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1 B). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE — Série sur les essais et l'évaluation, n° 61, ENV/JM/MON0(2006)29.
- (3) OCDE (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et l'évaluation, n° 78, ENV/JM/MON0(2007)25.
- (4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).

- (5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Rapport non publié daté du 15 décembre 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
- (6) OCDE, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement de l'OCDE — Série sur les essais et l'évaluation n° 94, ENV/JM/MONO(2008)21.
- (7) Sumpter et Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*; 103 Suppl 7:173-8 Review.
- (8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3):277-91.
- (9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
- (10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*; 67(1): 121-30.
- (11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.
- (12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.
- (13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Bruxelles, Belgique.
- (14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131
- (16) Rose J, Holbech H, Lindholm C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17β-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 531-539.
- (17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- (18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang JJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
- (19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301308.
- (20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.

- (21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life- cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23 (3):774-81.
 - (22) OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement de l'OCDE. — Série sur les essais et l'évaluation n° 23 Paris
 - (23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.6992.
 - (24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “signposts”, not “traffic lights,” in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*; 114 Suppl 1:106-14.
 - (25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
 - (26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
 - (27) OCDE (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement — Série sur les essais et l'évaluation n° 54. ENV/JM/MONO (2006)18.
 - (28) OCDE (2012) Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation de perturbateurs endocriniens (version révisée). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Série sur les essais et l'évaluation n° 150 ENV/JM/MONO(2012)22.
-

*Appendice 1***Abréviations & définitions**

Substance chimique: une substance ou un mélange

CV: coefficient de variation

ELISA: (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): procédé immunochimique d'absorption enzymatique

Taux de charge: poids frais de poissons par unité de volume d'eau

Densité de peuplement: nombre de poissons par unité de volume d'eau

Vitellogénine (VTG): lipo-glyco-phospho-protéine précurseur des protéines du vitellus normalement produite par les femelles sexuellement actives de toutes les espèces ovipares

Axe HHG: axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

CMT: concentration maximale tolérée représentant environ 10 % de la CL₅₀

Substance chimique d'essai: Toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Appendice 2

Conditions expérimentales du protocole de dépistage des substances agissant sur le système endocrinien des poissons non reproducteurs

1. Espèces recommandées	Tête-de-boule (<i>Pimephales promelas</i>)	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	Poisson-zèbre (<i>Danio rerio</i>)
2. Type d'essai	dynamique	dynamique	dynamique
3. Température de l'eau	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Qualité de l'éclairage	Ampoules fluorescentes (à large spectre)	Ampoules fluorescentes (à large spectre)	Ampoules fluorescentes (à large spectre)
5. Intensité de l'éclairage	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)
6. Photopériode (transitions — aube et crépuscule — optionnelles, mais non considérées comme nécessaires)	16 h de lumière, 8 h d'obscurité	12-16 h de lumière, 12-8 h d'obscurité	12-16 h de lumière, 12-8 h d'obscurité
7. Taux de charge	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Volume des enceintes d'essai	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Volume de la solution d'essai	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Remplacement volumique des solutions d'essai	Minimum 6 fois/jour	Minimum 5 fois/jour	Minimum 5 fois/jour
11. Âge des organismes d'essai	voir paragraphe 20	voir paragraphe 20	voir paragraphe 20
12. Poids frais approximatif des poissons adultes (g)	Femelles: 1,5 ± 20 % Mâles: 2,5 ± 20 %	Femelles: 0,35 ± 20 % Mâles: 0,35 ± 20 %	Femelles: 0,65 ± 20 % Mâles: 0,4 ± 20 %
13. Nombre de poissons par cuve	6 (2 mâles et 4 femelles)	10 (5 mâles et 5 femelles)	10 (5 mâles et 5 femelles)
14. Nombre de traitements	= 3 (plus témoins appropriés)	= 3 (plus témoins appropriés)	= 3 (plus témoins appropriés)
15. Nombre de cuves par traitement	4 minimum	2 minimum	2 minimum
16. Nombre de poissons par concentration d'essai	16 adultes femelles et 8 mâles (4 femelles et 2 mâles dans chaque répliquat)	10 adultes femelles et 10 mâles (5 femelles et 5 mâles dans chaque répliquat)	10 adultes femelles et 10 mâles (5 femelles et 5 mâles dans chaque répliquat)

17. Régime alimentaire	Artémies adultes ou nauplies d'artémies, vivantes ou congelées, deux ou trois fois par jour (ad libitum), nourriture disponible dans le commerce ou combinaison de ces éléments	Nauplies d'artémies, vivantes ou congelées, deux ou trois fois par jour (ad libitum), nourriture disponible dans le commerce ou combinaison de ces éléments	Nauplies d'artémies deux ou trois fois par jour (ad libitum), nourriture disponible dans le commerce ou combinaison de ces éléments
18. Aération	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air (VSA)	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air (VSA)	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air (VSA)
19. Eau de dilution	Eau de surface, de puits ou reconstituée, ou eau du robinet déchlorée	Eau de surface, de puits ou reconstituée, ou eau du robinet déchlorée	Eau de surface, de puits ou reconstituée, ou eau du robinet déchlorée
20. Période de préexposition	7 jours (recommandé)	7 jours (recommandé)	7 jours (recommandé)
21. Durée de l'exposition au produit chimique	21 jours	21 jours	21 jours
22. Effets biologiques mesurés	survie comportement caract. sexuels secondaires VTG	survie comportement caract. sexuels secondaires VTG	survie comportement VTG
23. Critères de validité de l'essai	Concentration d'oxygène dissous > 60 % de la VSA; température moyenne de 25 ± 2 °C; 90 % de survie dans les groupes témoins; concentration mesurée de la substance d'essai maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées pour chaque niveau de traitement	Concentration d'oxygène dissous > 60 % de la VSA; température moyenne de 24 ± 2 °C; 90 % de survie dans les groupes témoins; concentration mesurée de la substance d'essai maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées pour chaque niveau de traitement	Concentration d'oxygène dissous > 60 % de la VSA; température moyenne de 26 ± 2 °C; 90 % de survie dans les groupes témoins; concentration mesurée de la substance d'essai maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées pour chaque niveau de traitement

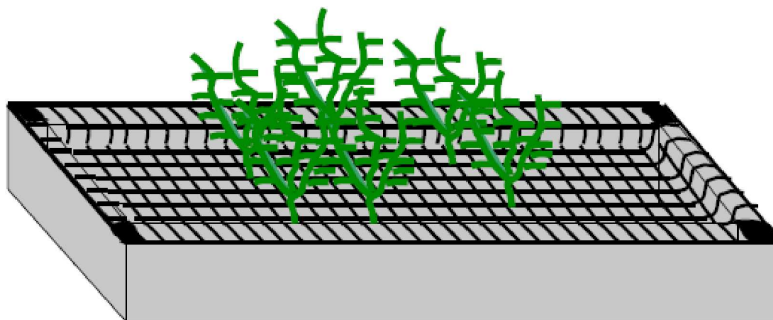
*Appendice 3***Quelques caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable**

Constituant	Concentrations
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

Appendice 4 A

Substrat de frai pour les poissons-zèbres

Plateau de frai: plat à instruments en verre, mesurant par exemple $22 \times 15 \times 5.5$ cm ($L \times l \times h$), recouvert d'une grille amovible en acier inoxydable (mailles de 2 mm de largeur). La base de cette grille se trouve plus bas que le bord du plat à instruments.



Le substrat de frai est fixé sur la grille. Il forme une structure dans laquelle les poissons peuvent pénétrer. Des plantes d'aquarium artificielles en plastique vert, par exemple, peuvent convenir (NB: l'adsorption possible de la substance chimique d'essai sur la matière plastique est prise en compte). Le plastique est lessivé dans un volume suffisant d'eau chaude et pendant un temps suffisant pour qu'aucune substance ne risque de se retrouver dans la solution d'essai. Si des objets en verre sont utilisés, on veille à ce que les poissons ne soient ni blessés ni entravés lors de mouvements vigoureux.

La distance entre le plateau et les parois de la cuve est d'au moins 3 cm pour que le frai ne se fasse pas à l'extérieur du plateau. Les œufs déposés sur le plateau traversent la grille et peuvent être prélevés 45 à 60 minutes après le début de l'éclairage. Les œufs translucides n'adhèrent pas et peuvent facilement être comptés grâce une lumière transversale. Pour cinq femelles par cuve, le nombre d'œufs pondus peut être considéré comme faible s'il est inférieur ou égal à 20 par jour, moyen s'il est compris entre 20 et 100, et élevé s'il est supérieur à 100. Le plateau de frai est retiré, les œufs ramassés et le plateau de frai réintroduit dans la cuve d'essai, le plus tard possible dans la soirée ou bien très tôt le matin. La réintroduction du plateau se fait dans un délai maximum d'une heure car sinon le signal du substrat de frai peut induire un accouplement et un frai à un moment inhabituel. Si la situation nécessite une introduction ultérieure du plateau de frai, il faut attendre au moins neuf heures après le début de l'éclairage. A cette heure tardive de la journée, l'induction de frai ne se fait plus.

Appendice 4 B

Substrat de frai pour les têtes-de-boule

Deux ou trois plaques et plateaux de frai en plastique/céramique/verre ou en acier inoxydable combinés sont placés dans chaque enceinte d'essai (morceau de gouttière semi-circulaire grise de 80 mm de longueur posé sur un plateau à rebords de 130 mm de long, par exemple) (voir photo). Il est avéré que les plaques en PVC ou en céramique vieilles pouvaient convenablement servir de substrat de frai (Thorpe *et al*, 2007).

Il est recommandé d'utiliser des plaques abrasées pour améliorer l'adhérence. Le plateau est aussi muni d'un écran de protection empêchant les poissons d'accéder aux œufs tombés, à moins que l'efficacité de l'adhérence des œufs ait été démontrée pour le substrat de frai utilisé.



Le socle est conçu pour contenir tous les œufs qui n'adhèrent pas à la surface des plaques et tomberaient donc au fond de l'enceinte (ou les œufs déposés directement sur le socle en plastique plat). Tous les substrats de frai sont lessivés pendant au moins 12 heures dans l'eau de dilution avant leur utilisation.

RÉFÉRENCES

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90-98.

Appendice 5 A

Évaluation des caractères sexuels secondaires du tête-de-boule pour la détection de certains perturbateurs endocriniens**Synthèse**

Chez les têtes-de-boule adultes, les caractéristiques physiques pouvant avoir de l'importance dans les essais de perturbateurs endocriniens sont les suivantes: couleur (claire/sombre), motifs de coloration (présence ou absence de bandes verticales), forme du corps (région de la tête et région pectorale, distension de l'abdomen) et caractères sexuels secondaires spécifiques de l'espèce (nombre et taille des tubercules nuptiaux, taille du bourrelet dorsal et ovipositeur).

Les tubercules nuptiaux sont situés sur la tête (bourrelet dorsal) des têtes-de-boule adultes mâles reproducteurs, et sont généralement disposés bilatéralement et symétriquement (Jensen et al. 2001). Les femelles et les juvéniles mâles et femelles des cuves témoins ne développent pas de tubercule (Jensen et al. 2001). Il est possible de dénombrer jusqu'à huit tubercules individuels autour des yeux et entre les narines des mâles. Les tubercules les plus importants en nombre et en taille forment deux lignes parallèles situées juste en dessous des narines et au-dessus de la bouche. De nombreux poissons possèdent des groupes de tubercules sous la mâchoire inférieure; tout près de la bouche on en trouve généralement une seule paire alors que le ventre peut comprendre jusqu'à quatre tubercules. Le nombre de tubercules dépasse rarement 30 (fourchette, 18-28; Jensen et al. 2001). Les tubercules les plus nombreux forment une seule et même structure de forme plutôt arrondie, dont la hauteur est à peu près égale au rayon. Chez la plupart des mâles reproducteurs, certains tubercules sont si étendus et protubérants qu'il est impossible de les distinguer les uns des autres.

Certains types de perturbateurs endocriniens peuvent provoquer l'apparition anormale de caractères sexuels secondaires chez le sexe opposé; ainsi, les agonistes des récepteurs d'androgènes tels que la 17 β -méthyltestostérone ou le 17 β -trenbolone peuvent provoquer l'apparition de tubercules nuptiaux chez le tête-de-boule femelle (Smith, 1974; Ankley *et al.*, 2001, 2003), tandis que les agonistes des récepteurs d'œstrogènes peuvent réduire le nombre ou la taille des tubercules nuptiaux chez les mâles (Miles-Richardson et al, 1999; Harries et al., 2000).

On trouvera ci-après une description de la caractérisation des tubercules nuptiaux chez les têtes-de-boule, fondée sur le mode opératoire utilisé par le laboratoire de l'Agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (USEPA) à Duluth, Minnesota. Les produits et/ou équipements spécifiques peuvent être remplacés par des matériaux comparables disponibles.

L'utilisation d'une loupe à éclairage ou d'un microscope binoculaire de dissection à éclairage (3X) permet une observation optimale. On observera le poisson en position dorsale, partie antérieure vers l'avant (tête vers l'observateur).

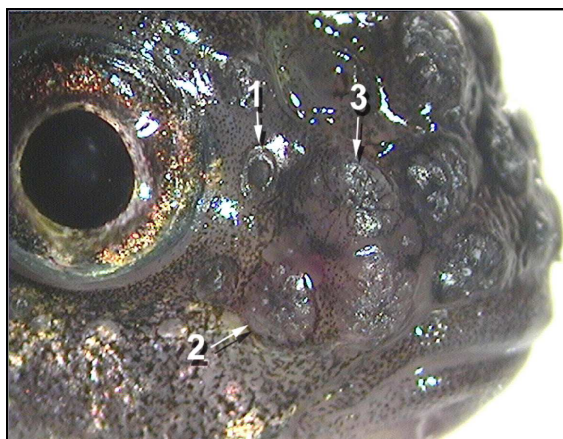
- a) Placer le poisson dans une petite boîte de Pétri (100 mm de diamètre, par exemple), sur le dos, partie antérieure vers l'avant. Régler le viseur pour pouvoir identifier les tubercules. Faire rouler doucement le poisson d'un côté puis de l'autre pour identifier les zones où se trouvent les tubercules. Compter et classer les tubercules.
- b) Renouveler l'observation sur la partie ventrale antérieure après avoir placé le poisson sur le dos, partie antérieure vers l'avant, dans la boîte de Pétri.
- c) Les observations ne prennent pas plus de 2 minutes par poisson.

Dénombrement et classement des tubercules

Six zones spécifiques ont été identifiées pour l'évaluation de la présence et du développement de tubercules chez les têtes-de-boule adultes. Une matrice a été créée pour cartographier la localisation des tubercules et la quantité de tubercules présents (voir fin du présent Appendice). Le nombre de tubercules est consigné, et les tubercules peuvent être classés comme suit en fonction de leur taille: 0-absence, 1-présent, 2-agrandi et 3-protubérant pour chaque organisme (Figure 1).

Classe 0-absence de tout tubercule. Classe 1-tubercule présent, identifié comme tout tubercule dont un seul point est de hauteur presque égale à son rayon (diamètre). Classe 2-tubercule agrandi, identifié par des tissus ressemblant à un astérisque, présentant généralement une large base radiale marquée de stries et de sillons partant du centre. La hauteur des tubercules est souvent plus irrégulière mais peut parfois être un peu arrondie. Classe 3-tubercule protubérant, de forme généralement plutôt large et arrondie et de structure moins bien définie. Ces tubercules s'agglomèrent parfois pour former une seule et même masse le long d'une zone ou de plusieurs zones (B, C et D, voir description ci-dessous). Leur couleur et leur forme sont similaires à celles de la classe 2, mais sont parfois assez indéterminées. Ce système de classement permet généralement d'obtenir un résultat global < 50 chez un mâle témoin normal possédant un nombre de tubercules compris entre 18 et 20 (Jensen et al. 2001).

Figure 1



Certains poissons peuvent présenter plus de tubercules que la matrice ne compte de cases (voir appendice A) pour une zone particulière. Dans ce cas, des chiffres supplémentaires peuvent être indiqués à l'intérieur, à droite ou à gauche de la case. La matrice n'a donc pas besoin d'afficher une symétrie. Une autre technique permettant de cartographier les tubercules allant par paires ou réunis verticalement le long du plan horizontal de la bouche pourrait consister à indiquer deux chiffres dans une seule case.

Zones cartographiées:

A — Tubercules situés autour des yeux. Localisés de dorsal à ventral autour du bord antérieur des yeux. Couramment multiples chez les mâles témoins mûrs, absents chez les femelles témoins, généralement par paires (un près de chaque œil) ou uniques chez les femelles exposées à des androgènes.

B — Tubercules situés entre les narines (pores-canaux sensoriels). Normalement par paires chez les mâles témoins à des niveaux de développement supérieurs (2-agrandi ou 3-protubérants). Absents chez les femelles témoins mais parfois présents chez les femelles exposées à des androgènes.

C — Tubercules situés immédiatement devant les narines, parallèlement à la bouche. Généralement agrandis ou protubérants chez les mâles témoins mûrs. Présents ou agrandis chez les mâles moins développés ou chez les femelles exposées à des androgènes.

D — Tubercules situés parallèlement à la bouche. Généralement classés "développés" chez les mâles témoins. Absents chez les femelles témoins mais présents chez les femelles exposées à des androgènes.

E — Tubercules situés sur la mâchoire inférieure, près de la bouche, généralement petits et par paires. Variables chez les mâles témoins ou traités et chez les femelles traitées.

F — Tubercules situés sous la zone E. Généralement petits et par paires. Présents chez les mâles témoins et chez les femelles exposées à des androgènes.

RÉFÉRENCES

- (1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
- (2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.
- (4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

- (5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. J Fish Biol 59:515-523.
- (6) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17D-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Aquat Toxicol 47:129-145.
- (7) Smith RJF. 1974. Effects of 17D-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Can J Zool 52:1031-1038.

Matrice pour la cartographie des tubercules**Classification numérique**

N° ident. _____

1-présent

Date _____

2-agrandi

Score total _____

3-protubérant

	A	X1	X1	X1	X1

	B	X1	X1	X1	X1

	C	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
	D	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

	E	X1	X1	
	F	X1	X1	X1

Appendice 5 B

Évaluation des caractères sexuels secondaires du medaka pour la détection de certains perturbateurs endocriniens

La mesure des tubercules papillaires (*), qui sont les caractères sexuels secondaires du medaka (*Oryzias latipes*) est décrite ci-après.

(*) Les tubercules papillaires sont normalement présents uniquement chez les mâles adultes, et se situent entre le deuxième et le septième ou le huitième rayon de nageoire en comptant à partir de l'extrémité postérieure de la nageoire anale (fig.1 et 2). Ils apparaissent rarement sur le premier rayon en comptant à partir de l'extrémité postérieure de la nageoire anale. Cette procédure opératoire standard (POS) permet de mesurer les tubercules présents sur le premier rayon de nageoire (le numéro du rayon est déterminé en comptant à partir de l'extrémité postérieure de la nageoire anale dans cette POS).

- 1) Après excision du foie (Appendice 6), la carcasse est placée dans un tube conique contenant 10 ml environ de formol tamponné à 10 % (tête en haut, queue en bas). Si la gonade est fixée dans une autre solution que du formol tamponné à 10 %, pratiquer à l'aide d'un rasoir une incision transversale dans la carcasse entre la région antérieure de la nageoire anale et l'anus, en prenant soin de ne pas abîmer le gonopore et la gonade (fig. 3). Placer la partie tête du corps du poisson dans la solution de fixation pour préserver la gonade, et la partie queue dans du formol tamponné à 10 % tel que décrit ci-dessus.
- 2) Après avoir placé le poisson dans du formol tamponné à 10 %, saisir la région antérieure de la nageoire anale avec des pincettes et la plier pendant une trentaine de secondes pour que la nageoire anale reste ouverte. En prenant la nageoire anale avec les pincettes, saisir quelques rayons de nageoire dans la région antérieure en prenant soin de ne pas abîmer les tubercules papillaires.
- 3) Après avoir maintenu la nageoire anale ouverte pendant une trentaine de secondes, placer le poisson dans du formol tamponné à 10 % à température ambiante jusqu'à la mesure des tubercules papillaires (cette mesure est effectuée au bout de 24 heures minimum).

Mesure

- 1) Après avoir fixé le poisson dans le formol tamponné à 10 % pendant au moins 24 heures, retirer la carcasse du tube conique et essuyer le formol avec du papier filtre (ou essuie-tout).
- 2) Placer le poisson abdomen vers le haut. Découper ensuite soigneusement la nageoire anale avec de petits ciseaux à dissection (il est préférable de découper la nageoire anale avec un peu de rayon endosquelettique).
- 3) Saisir la région antérieure de la nageoire anale excisée avec des pincettes et la poser sur une lame de verre avec quelques gouttes d'eau. Couvrir ensuite la nageoire anale avec une lamelle couvre-objet. Prendre soin de ne pas abîmer les tubercules papillaires en prenant la nageoire anale avec les pincettes.
- 4) Noter le nombre de plaques conjoints présentant des tubercules papillaires à l'aide du compteur placé sous un microscope biologique (microscope droit ou microscope inversé). On reconnaît les tubercules papillaires à la petite formation de tubercules visible sur le côté postérieur des plaques conjoints. Inscrire sur la feuille de travail le nombre de plaques conjoints présentant des tubercules papillaires pour chaque rayon de nageoire (premier rayon: 0, deuxième rayon: 10, troisième rayon: 12, etc.) puis inscrire leur somme sur la feuille Excel pour chaque poisson. Si nécessaire, photographier la nageoire anale et noter le nombre de plaques conjoints présentant des tubercules papillaires sur la photo.
- 5) Après la mesure, placer la nageoire anale dans le tube conique décrit au point 1) et le stocker.

Fig.1.

Schéma illustrant la différence de forme et de taille de la nageoire anale entre les sexes. A, mâle; B, femelle. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

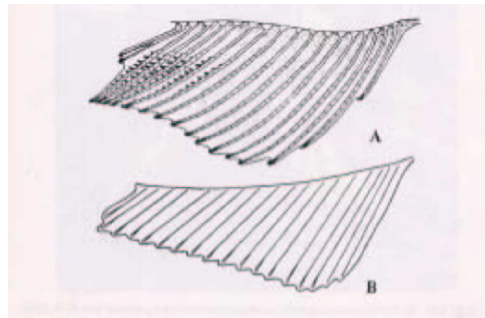


Fig.2.

A, Tubercules papillaires situés sur les plaques conjoints de la nageoire anale. J.P., plaque conjointe; A.S., espace axial; P., tubercule B, Extrémité distale de la nageoire anale. Les actinotriches (Act.) sont situés à l'extrémité. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

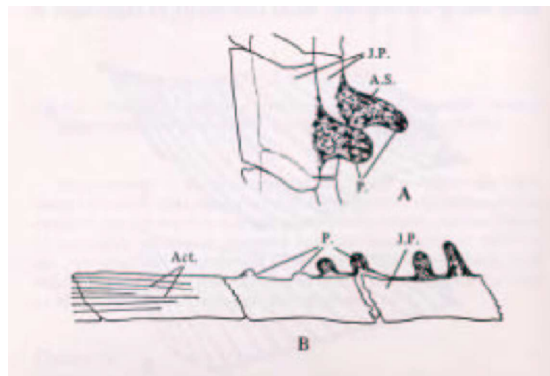
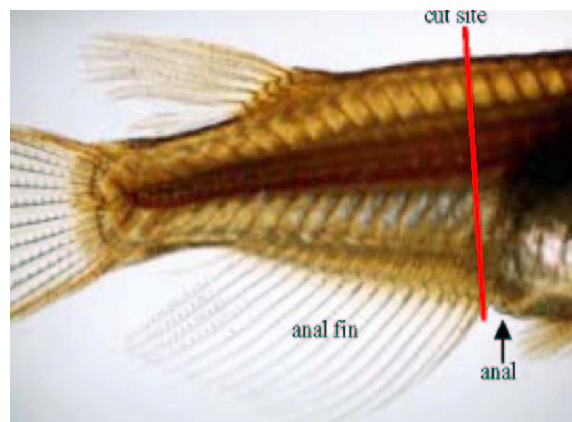


Fig.3.

Photographie montrant le site de coupe lorsque la gonade est fixée dans une autre solution que du formol tamponné à 10 %. Dans ce cas, le corps restant sera coupé entre la région antérieure de la nageoire anale et l'anus à l'aide d'un rasoir (trait rouge). La tête sera placée dans la solution de fixation pour préserver la gonade, et la queue dans le formol tamponné à 10 %.



Appendice 6

Procédures recommandées pour les prélèvements effectués à des fins de dosage de la vitellogénine

On prendra soin d'éviter la contamination croisée entre les échantillons de VTG des mâles et des femelles.

Procédure 1A: tête-de-boule, prélèvement sanguin dans l'artère / la veine caudale

Après anesthésie, le pédoncule caudal est partiellement sectionné avec une lame de scalpel, et un prélèvement sanguin est effectué dans l'artère/la veine caudale grâce à un tubule capillaire à microhématocrite héparinisé. Après le prélèvement sanguin, le plasma est rapidement séparé par centrifugation à température ambiante pendant 3 minutes à 15 000 g (ou bien à une température de 4 °C pendant 10 minutes à 15 000 g). Le pourcentage d'hématocrite peut éventuellement être déterminé à l'issue de la centrifugation. Le plasma est ensuite retiré du tube à microhématocrite puis stocké dans un tube de centrifugeuse avec 0,13 unité d'aprotinine (un inhibiteur de protéase) à – 80 °C jusqu'au dosage de la vitellogénine. Selon la taille du tête-de-boule (qui dépend du sexe), les volumes de plasma pouvant être prélevés sont généralement de 5 à 60 µl par individu (Jensen *et al.* 2001).

Procédure 1 B: tête-de-boule, prélèvement sanguin par ponction cardiaque

Il est également possible d'effectuer un prélèvement sanguin par ponction cardiaque effectuée à l'aide d'une seringue héparinisée (1 000 unités d'héparine par ml). Le sang est versé dans des tubes Eppendorf (maintenus dans de la glace) avant d'être centrifugé (5 minutes à 7 000 g à température ambiante). Le plasma est versé dans des tubes Eppendorf propres (dans des aliquotes si le volume de plasma le permet) puis rapidement congelé à – 80 °C jusqu'à l'analyse (Panter *et al.*, 1998).

Procédure 2 A: Medaka japonais, excision du foie

Retrait des poissons d'essai de l'enceinte d'essai

- (1) Les poissons d'essai sont sortis de l'enceinte d'essai à l'aide d'une épuisette. Attention à ne pas laisser tomber les poissons dans une autre enceinte d'essai.
- (2) En principe, les poissons d'essai sont retirés dans l'ordre suivant: témoin, cuve témoin contenant le solvant (s'il y a lieu), concentration minimale, concentration moyenne, concentration maximale et témoin positif. De plus, tous les mâles sont retirés de l'enceinte d'essai avant les femelles.
- (3) Le sexe de chaque poisson d'essai est identifié à partir des caractères sexuels secondaires externes (forme de la nageoire anale, par exemple).
- (4) Placer les poissons dans un conteneur puis les transporter jusqu'au poste de travail pour l'excision du foie. Vérifier les étiquettes de l'enceinte d'essai et du conteneur de transport par souci de précision et pour confirmer que le nombre de poissons sortis de l'enceinte d'essai et le nombre de poissons restés dans l'enceinte d'essai sont compatibles avec les prévisions.
- (5) Si le sexe ne peut pas être identifié d'après l'apparence externe du poisson, sortir tous les poissons de l'enceinte d'essai. Dans ce cas, le sexe est identifié par observation de la gonade ou des caractères sexuels secondaires au stéréomicroscope.

Excision du foie

- (1) Transférer les poissons d'essai du conteneur de transport vers la solution anesthésique avec l'épuisette.
- (2) Après anesthésie, saisir les poissons d'essai avec des pincettes (de modèle courant) pour les déposer sur le papier filtre (ou essuie-tout). En saisissant les poissons, appliquer les pincettes sur les côtés de la tête pour éviter de casser la queue.
- (3) Essuyer l'eau de la surface des poissons d'essai avec le papier filtre (ou essuie-tout).
- (4) Placer les poissons sur le dos. Pratiquer ensuite une petite incision transversale entre la région ventre-nuque et le milieu de l'abdomen avec des ciseaux à dissection.

- (5) Introduire les ciseaux à dissection dans la petite incision, et inciser l'abdomen le long de sa ligne médiane, depuis un point caudal par rapport au manteau branchial jusqu'au côté cranien de l'anus. Attention à ne pas introduire les ciseaux à disséquer trop profondément pour ne pas abîmer le foie et la gonade.
- (6) Mener les opérations suivantes sous le stéréomicroscope.
- (7) Placer les poissons sur le dos sur l'essuie-tout (ou une boîte de Pétri en verre ou une lame de verre).
- (8) Écarter les parois de la cavité abdominale avec les pincettes de précision puis extérioriser les organes internes. Il est également possible d'extérioriser les organes internes en retirant l'une des parois de la cavité abdominale si nécessaire.
- (9) Étaler la partie qui relie le foie et la vésicule biliaire à l'aide d'une autre paire de pincettes de précision. Saisir ensuite le canal biliaire et couper la vésicule biliaire. Veiller à ne pas rompre la vésicule biliaire.
- (10) Saisir l'œsophage et exciser les intestins du foie selon la même méthode. Veiller à ce que le contenu du tube digestif ne s'échappe pas. Exciser l'intestin caudal de l'anus et retirer le tractus de la cavité abdominale.
- (11) Retirer la masse de tissus graisseux et autres situés à la périphérie du foie. Prendre soin de ne pas abîmer le foie.
- (12) Saisir la zone de la porte hépatique avec les pincettes de précision et retirer le foie de la cavité abdominale.
- (13) Placer le foie sur la lame de verre. À l'aide des pincettes de précision, retirer les autres tissus graisseux et étrangers (paroi abdominale interne, par exemple), s'il y a lieu, de la surface du foie.
- (14) Peser le foie au moyen d'une balance de précision électronique, en utilisant comme tare un microtube de 1,5 ml. Consigner la valeur sur la feuille de travail (précision à 0,1 mg près). Confirmer les informations d'identification sur l'étiquette du microtube.
- (15) Fermer le capuchon du microtube contenant le foie. Stocker le microtube dans un bac de refroidissement (ou un bac de glace).
- (16) Après chaque excision de foie, nettoyer les instruments de dissection ou les remplacer par des instruments propres.
- (17) Retirer le foie de tous les poissons se trouvant dans les conteneurs de transport comme indiqué ci-dessus.
- (18) Après excision du foie de tous les poissons se trouvant dans le conteneur de transport (c'est-à-dire de tous les mâles et de toutes les femelles d'une enceinte d'essai), placer tous les spécimens hépatiques sur un support pour tubes munis d'une étiquette d'identification puis les stocker dans un congélateur. Lorsque les foies sont fournis pour pré-traitement peu de temps après leur excision, les spécimens sont transportés jusqu'au poste de travail le plus proche dans un bac de refroidissement (ou un bac de glace).

Après excision du foie, la carcasse est prête pour l'histologie gonadique et la mesure des caractères sexuels secondaires.

Spécimens

Stocker les spécimens hépatiques prélevés sur les poissons d'essai à une température ≤ -70 °C s'ils ne sont pas utilisés pour le pré-traitement juste après leur excision.

Fig-1

Une incision est pratiquée avec des ciseaux juste avant les nageoires pectorales.

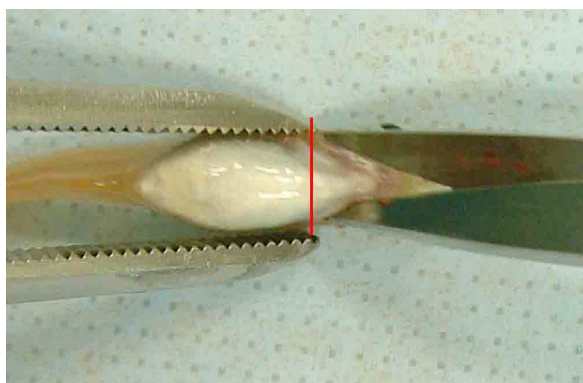
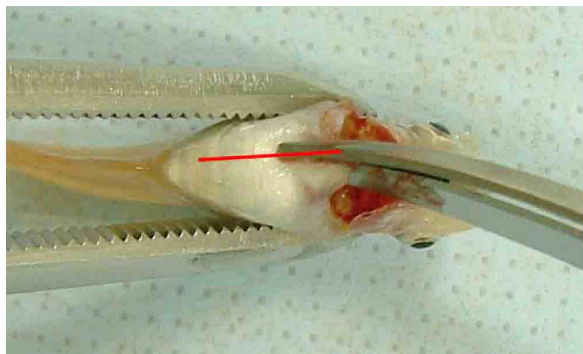
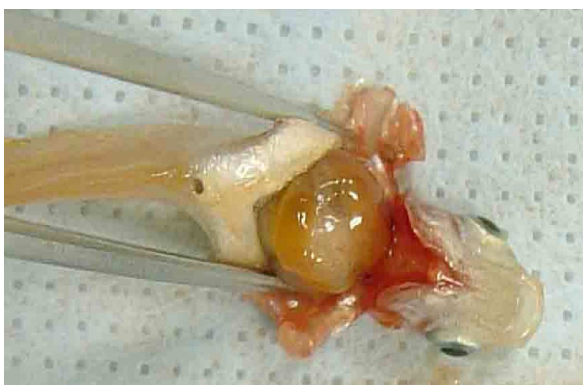


Fig-2

La ligne médiane de l'abdomen est incisée avec des ciseaux jusqu'à un point situé environ 2 mm au-dessus de l'anus.

*Fig-3*

Les parois abdominales sont écartées avec des pincettes pour exposer le foie et les autres organes internes (elles peuvent aussi être épinglées latéralement).

*Fig-4*

Le foie est disséqué et excisé avec des pincettes.

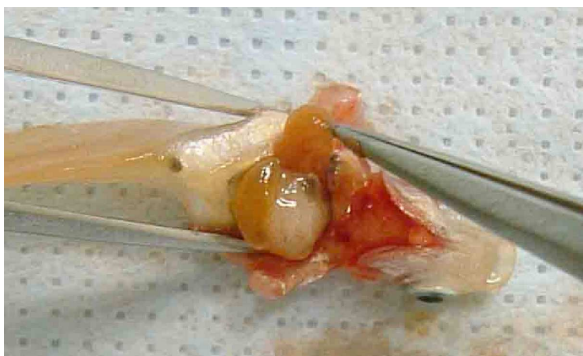


Fig-5

Les intestins sont délicatement retirés avec des pincettes.

*Fig-6*

Les deux extrémités des intestins et les attaches du mésentère sont sectionnées avec des ciseaux.

*Fig-7 (femelle)*

La procédure est identique pour les femelles.

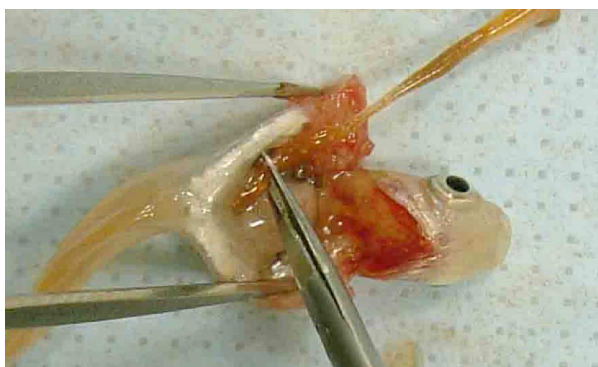


Fig-8

Procédure achevée.**Procédure 2 B: Medaka japonais (*Oryzias latipes*), pré-traitement du foie pour le dosage de la vitellogénine.**

Retirer la bouteille contenant le tampon d'homogénéat du kit ELISA et la refroidir avec de la glace pilée (température de la solution: $\leq 4^{\circ}\text{C}$). Si un tampon d'homogénéat provenant d'un kit ELISA EnBio est utilisé, laisser décongeler la solution à température ambiante, puis conserver la bouteille au frais avec de la glace pilée.

Calculer le volume de tampon d'homogénéat pour le foie à partir du poids de ce dernier (utiliser 50 μl de tampon d'homogénéat par mg de foie pour l'homogénéat). Exemple: Si le foie pèse 4,5 mg, le volume de tampon d'homogénéat pour le foie sera de 225 μl . Dresser une liste des volumes de tampon d'homogénéat pour tous les foies.

Préparation du foie pour le pré-traitement

- (1) Retirer le microtube de 1,5 ml contenant le foie du congélateur juste avant le pré-traitement.
- (2) Le pré-traitement du foie des mâles est effectué avant celui des femelles pour éviter toute contamination de la vitellogénine. De plus, le pré-traitement des groupes d'essai est effectué dans l'ordre suivant: témoin, cuve témoin contenant le solvant (s'il y a lieu), concentration minimale, concentration moyenne, concentration maximale et témoin positif.
- (3) Le nombre de microtubes de 1,5 ml contenant les échantillons hépatiques sortis du congélateur à un moment donné ne dépasse pas le nombre de tubes pouvant être centrifugés à ce moment-là.
- (4) Placer les microtubes de 1,5 ml contenant les échantillons hépatiques dans le bac de glace selon l'ordre de numérotation des spécimens (la décongélation du foie n'est pas utile).

Déroulement du pré-traitement**1. Ajout du tampon d'homogénéisation**

- (1) Vérifier sur la liste le volume de tampon d'homogénéat à utiliser pour un échantillon hépatique particulier et ajuster la micropipette (gamme de volumes: 100-1 000 μl au volume approprié. Attacher un embout propre à la micropipette.
- (2) Retirer le tampon d'homogénéat du flacon de réactif et ajouter le tampon dans le microtube de 1,5 ml contenant le foie.
- (3) Ajouter le tampon dans tous les microtubes de 1,5 ml contenant les échantillons hépatiques selon la procédure décrite ci-dessus. Il n'est pas nécessaire de remplacer l'embout de la micropipette par un embout neuf. Toutefois, si l'embout est contaminé ou suspect de contamination, il est changé.

2. Homogénéisation du foie

- (1) Attacher un nouveau pilon d'homogénéisation à l'homogénéisateur du microtube.
- (2) Introduire le pilon dans le microtube de 1,5 ml. Maintenir l'homogénéisateur pour presser le foie entre la surface du pilon et la paroi interne du microtube.
- (3) Faire fonctionner l'homogénéisateur pendant 10 à 20 secondes. Conserver le microtube au frais avec de la glace pilée pendant l'opération.
- (4) Retirer le pilon du microtube et laisser reposer pendant une dizaine de secondes. Procéder ensuite à une inspection visuelle de l'état de la suspension.
- (5) Si des morceaux de foie sont observés dans la suspension, répéter les opérations (3) et (4) pour obtenir un homogénat de foie satisfaisant.
- (6) Conserver l'homogénat hépatique en suspension dans le bac de glace jusqu'à sa centrifugation.
- (7) Utiliser un pilon neuf pour chaque homogénat.
- (8) Homogénéiser tous les foies avec un tampon d'homogénat selon la procédure décrite ci-dessus.

3. Centrifugation de l'homogénat hépatique en suspension

- (1) Confirmer que la température de la centrifugeuse réfrigérée est $\leq 5^{\circ}\text{C}$.
- (2) Introduire les microtubes de 1,5 ml contenant l'homogénat hépatique en suspension dans la centrifugeuse réfrigérée (rééquilibrer s'il y a lieu).
- (3) Centrifuger l'homogénat hépatique en suspension pendant 10 minutes à 13 000 g à une température $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Toutefois, si les surnageants sont correctement séparés, la force centrifuge et la durée de centrifugation peuvent être ajustées s'il y a lieu.
- (4) Après la centrifugation, vérifier que les surnageants sont correctement séparés (surface: lipides, intermédiaire: surnageant, culot: tissu hépatique). Si la séparation n'est pas concluante, renouveler la centrifugation de la suspension dans les mêmes conditions.
- (5) Retirer tous les échantillons de la centrifugeuse réfrigérée et les placer dans le bac de glace selon l'ordre de numérotation des spécimens. Prendre soin de ne pas remettre en suspension les couches séparées après centrifugation.

4. Collecte du surnageant

- (1) Placer quatre microtubes de 0,5 ml destinés au stockage du surnageant sur le support pour tubes.
- (2) Recueillir 30 μl de chaque surnageant (formant la couche intermédiaire après séparation) à l'aide de la micropipette et les verser dans un microtube de 0,5 ml. Prendre soin de ne pas recueillir de lipides de la surface ou de tissu hépatique du culot.
- (3) Recueillir le surnageant et le verser dans deux autres microtubes de 0,5 ml selon la procédure décrite ci-dessus.
- (4) Recueillir le reste du surnageant à l'aide de la micropipette (si possible: $\geq 100 \mu\text{l}$). Verser ensuite le surnageant dans le microtube de 0,5 ml restant. Prendre soin de ne pas recueillir de lipides de la surface ou de tissu hépatique du culot.
- (5) Fermer le microtube de 0,5 ml avec le capuchon et inscrire le volume de surnageant sur l'étiquette. Placer immédiatement les microtubes dans le bac de glace.
- (6) Remplacer l'embout de la micropipette par un embout neuf pour chaque surnageant. Si une grande quantité de lipides adhère à l'embout, remplacer immédiatement ce dernier par un embout neuf pour éviter la contamination de l'extrait hépatique avec la graisse.

- (7) Verser tout le surnageant centrifugé dans quatre microtubes de 0,5 ml selon la procédure décrite ci-dessus.
- (8) Après avoir versé le surnageant dans les microtubes de 0,5 ml, placer tous ces derniers sur le support pour tubes avec leur étiquette d'identification, puis les mettre immédiatement au congélateur. Si les concentrations de VTG sont mesurées immédiatement après le pré-traitement, conserver au frais un microtube de 0,5 ml (contenant 30 µl de surnageant) dans le support pour tubes et le transférer jusqu'au poste de travail où l'essai ELISA est conduit. Dans ce cas, placer les microtubes restants dans les supports pour tubes et mettre le tout au congélateur.
- (9) Après la collecte du surnageant, jeter le résidu comme il se doit.

Stockage des spécimens

Stocker les microtubes de 0,5 ml contenant le surnageant de l'homogénat hépatique à une température $\leq -70^{\circ}\text{C}$ jusqu'à la conduite de l'essai ELISA.

Procédure 3 A: Poisson-zèbre, prélèvement sanguin dans l'artère/la veine caudale

Immédiatement après anesthésie, le pédoncule caudal est sectionné transversalement, et un prélèvement sanguin est effectué dans l'artère/la veine caudale grâce à un tubule capillaire à microhématocrite héparinisé. Les volumes sanguins collectés varient entre 5 et 15 µl selon la taille du poisson. Un volume identique de tampon d'aprotinine [6 µg/ml de solution tampon phosphate (PBS)] est ajouté dans le tube microcapillaire, et le plasma est séparé du sang par centrifugation (5 minutes à 600 g). Le plasma est versé dans des tubes à essais puis stocké à une température de -20°C jusqu'au dosage de la vitellogénine ou d'autres protéines produisant des effets intéressants.

Procédure 3 B: Poisson-zèbre, prélèvement sanguin par ponction cardiaque

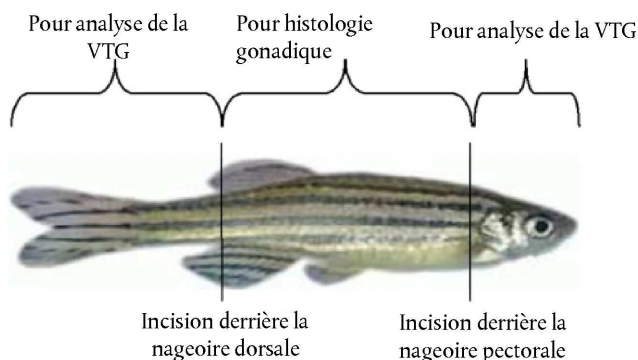
Pour éviter la coagulation du sang et la dégradation de la protéine, les échantillons sont collectés sur une solution tampon phosphate (PBS) contenant de l'héparine (1 000 unités/ml) et de l'aprotinine, un inhibiteur de protéase (2 TIU/ml). Pour constituer le tampon, il est recommandé d'utiliser de l'héparine (sel d'ammonium) et de l'aprotinine lyophilisée. Pour le prélèvement sanguin, une seringue (1 ml) munie d'une fine aiguille fixe (Braun Omnikan-F, par exemple) est recommandée. La seringue est pré-remplie avec le tampon (approximativement 100 µl) afin d'éluer complètement les faibles volumes sanguins de chaque poisson. Les prélèvements sanguins sont effectués par ponction cardiaque. Tout d'abord, le poisson est anesthésié avec du MS-222 (100 mg/l). Le bon plan d'anesthésie est celui qui permet à l'utilisateur de distinguer le battement du cœur du poisson-zèbre. Pendant la ponction cardiaque, maintenir le piston de la seringue sous faible tension. Les volumes sanguins pouvant être collectés varient entre 20 et 40 microlitres. Après la ponction cardiaque, le mélange sang/tampon est placé dans le tube à essais. Le plasma est séparé du sang par centrifugation (20 minutes à 5 000 g) et est stocké à une température de -80°C jusqu'à l'analyse.

Procédure 3C: POS: Poisson-zèbre, homogénéisation de la tête et de la queue

- (1) Les poissons sont anesthésiés puis euthanasiés conformément à la description de l'essai.
- (2) La tête et la queue du poisson sont coupées comme indiqué sur la figure 1.

Note importante: Tous les instruments de dissection ainsi que la planche à découper sont rincés et lavés correctement (avec de l'éthanol à 96 %, par exemple) entre chaque manipulation de poisson pour éviter que la vitellogénine des femelles ou des mâles induits ne "pollue" les mâles non-induits.

Figure 1



- (3) L'ensemble tête-queue de chaque poisson est pesé au mg près.
- (4) Après avoir été pesés, les morceaux sont placés dans des tubes appropriés (Eppendorf de 1,5 ml, par exemple) et stockés à une température de -80°C jusqu'à leur homogénéisation ou bien directement homogénéisées sur de la glace avec deux pilons en plastique. (D'autres méthodes peuvent être utilisées si elles impliquent de la glace et permettent d'obtenir une masse homogène). Note importante: Les tubes sont numérotés correctement de façon que la tête et la queue du poisson puissent être reliées à la partie du corps correspondante utilisée pour l'histologie gonadique.
- (5) Après obtention d'une masse homogène, on ajoute un tampon d'homogénéisation (*) glacé représentant $4 \times$ la masse pondérale tissulaire. Continuer à pilonner jusqu'à ce que le mélange soit homogène. Note importante: De nouveaux pilons sont utilisés pour chaque poisson.
- (6) Les échantillons sont placés sur de la glace jusqu'à centrifugation à 50 000 g pendant 30 min. et à une température de 4°C .
- (7) Utiliser une pipette pour répartir des portions de 20 μl de surnageant dans au moins deux tubes en plongeant l'embout de la pipette sous la couche lipidique située à la surface et en aspirant doucement le surnageant sans fraction lipidique ni culot.
- (8) Les tubes sont stockés à une température de -80°C jusqu'à leur utilisation.

(*) **Tampon d'homogénéisation:**

- [50 mM de Tris-HCl de pH 7,4; 1 % de cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma)]: 12 ml de Tris-HCl de pH 7,4 + 120 μl de cocktail d'inhibiteurs de protéase.
 - TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) de chez Bie & Berntsen (Danemark), par exemple.
 - Cocktail d'inhibiteurs de protéase: de chez Sigma (pour les tissus mammaliens). Numéro de produit P 8340.
 - Note: Le tampon d'homogénéisation est utilisé le jour de sa fabrication. Placer sur de la glace pendant l'utilisation.
-

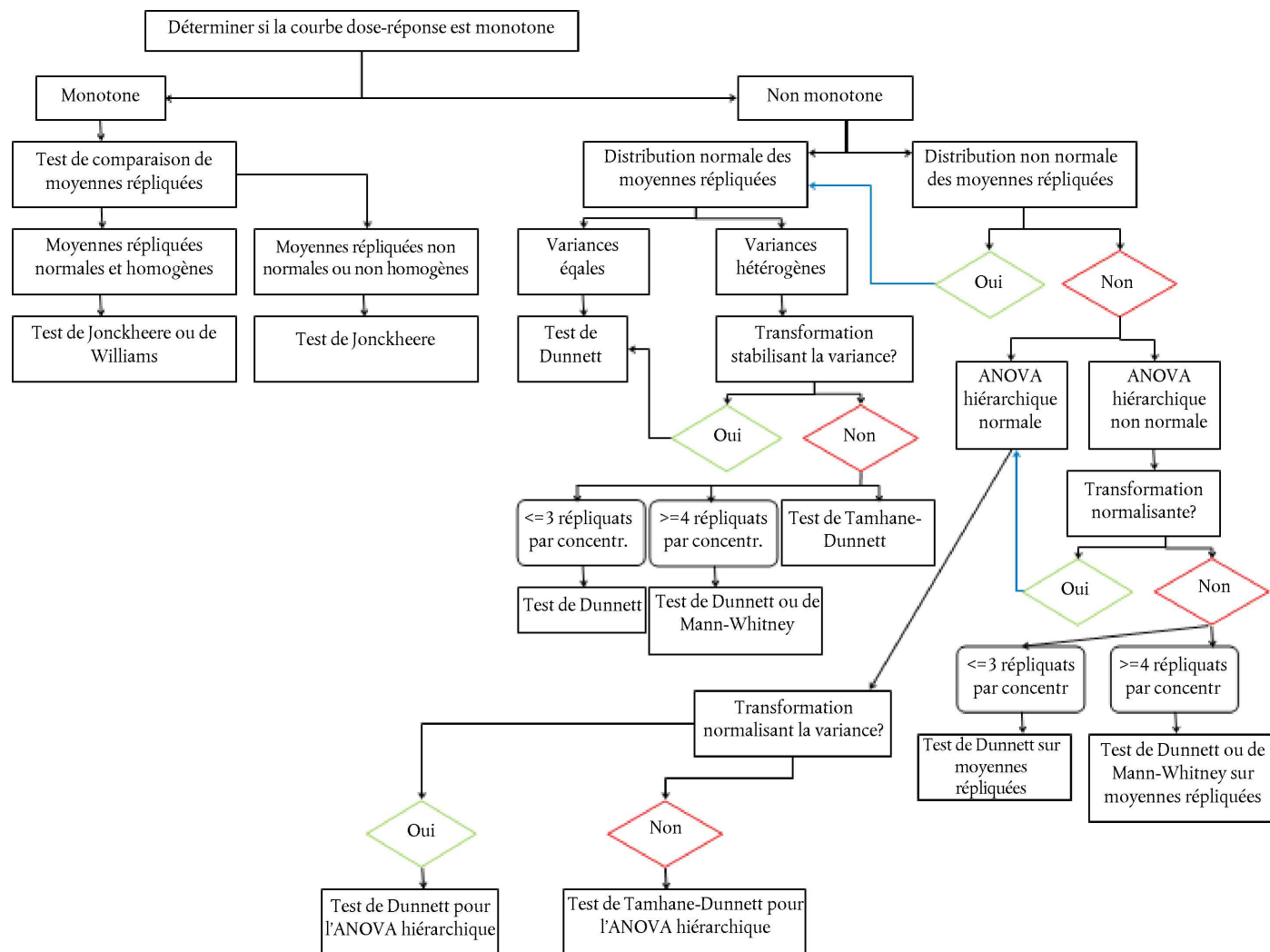
*Appendice 7***Échantillons fortifiés de vitellogénine utilisant un étalon de référence inter-essais**

Chaque jour où des essais d'induction de la vitellogénine sont effectués, un échantillon fortifié préparé à l'aide d'un étalon de référence inter-essais sera analysé. La vitellogénine utilisée pour préparer l'étalon de référence inter-essais sera issue d'un lot différent de celui utilisé pour préparer les solutions-étalons pour l'essai en cours.

Pour préparer l'échantillon fortifié, on ajoutera une quantité connue d'étalon inter-essais à un échantillon de plasma de mâle témoin. L'échantillon sera fortifié jusqu'à atteindre une concentration de vitellogénine de 10 à 100 fois supérieure à la concentration de vitellogénine attendue chez les mâles témoins. L'échantillon de plasma ainsi fortifié peut provenir d'un seul poisson ou de plusieurs poissons.

Un sous-échantillon du plasma de mâle témoin non fortifié sera analysé dans au moins deux puits dupliqués. L'échantillon fortifié sera aussi analysé dans au moins deux puits dupliqués. La quantité moyenne de vitellogénine dans les deux échantillons non fortifiés de plasma de mâle témoin sera ajoutée à la quantité calculée de vitellogénine ajoutée pour fortifier les échantillons afin de déterminer la concentration attendue. On notera alors systématiquement le rapport entre cette concentration attendue et la concentration mesurée, ainsi que les résultats de chaque série d'essais effectués ce jour-là.

Ordinogramme d'analyse statistique



C.38. ESSAI DE MÉTAMORPHOSE DES AMPHIBIENS**INTRODUCTION**

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 231(2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Le développement et la validation d'un essai, capable de déceler les substances chimiques actives sur le système thyroïdien chez les vertébrés, sont devenus nécessaires du fait des inquiétudes relatives à la présence dans l'environnement de produits chimiques dans des teneurs susceptibles de provoquer des effets néfastes sur les humains et la faune. En 1998, l'OCDE a lancé une activité à caractère hautement prioritaire visant à réviser les lignes directrices existantes ou à établir de nouvelles lignes directrices pour le dépistage et les tests des substances susceptibles d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien. Un des axes de cette activité consistait à développer une ligne directrice pour le dépistage des substances chimiques actives sur le système thyroïdien chez les vertébrés. Une version étendue du document intitulé Toxicité orale à doses répétées pendant 28 jours sur les rongeurs (Chapitre B.7 de la présente annexe) et un essai de métamorphose des amphibiens (EMA) ont été proposés. La méthode d'essai B.7 ainsi amendée a été soumise à validation, avant d'être publiée dans une nouvelle mouture révisée. L'essai de métamorphose des amphibiens (EMA) a suivi un programme de validation complet, comprenant des études intralaboratoires et interlaboratoires visant à en démontrer la pertinence et la fiabilité (1, 2). La validation de l'essai a ensuite fait l'objet d'un examen par les pairs, constitués d'un jury d'experts indépendants (3). La présente méthode d'essai est donc le fruit de l'expérience acquise au cours des études de validation concernant la détection de substances chimiques actives sur la thyroïde, ainsi que des travaux menés par ailleurs au sein des pays membres de l'OCDE.

PRINCIPE DE L'ESSAI

2. L'essai de métamorphose des amphibiens (EMA) est un essai de dépistage visant à identifier de manière empirique les substances chimiques susceptibles de perturber le fonctionnement normal de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien (HHT). L'EMA constitue un modèle généralisé pour les vertébrés, dans la mesure où il se fonde sur des fonctions et des structures conservées de l'axe HHT. Cet essai est important, car la métamorphose des amphibiens est un processus bien étudié, dépendant de la thyroïde, et répondant aux substances chimiques actives sur l'axe HHT. De plus, il s'agit du seul essai existant capable de détecter l'activité sur la thyroïde chez un animal en cours de développement morphologique.
3. Le schéma expérimental général comprend l'exposition de têtards de *Xenopus laevis* au stade 51 à un minimum de trois concentrations différentes d'une substance chimique d'essai ainsi qu'à un témoin d'eau pure pendant 21 jours. Chaque traitement d'essai est effectué avec quatre répliquats. La densité des larves au lancement de l'essai s'élève à 20 têtards par vivier ou répliquat pour l'ensemble des groupes traités. Les observations rapportées sont la longueur des pattes postérieures, la longueur museau-cloaque (LMC), le stade de développement, le poids humide, l'histologie de la thyroïde et la mortalité quotidienne. © OCDE, (2009). L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu pour usage personnel, dans un but non commercial sans autorisation préalable, sous réserve de mention de la source. Toute utilisation à but commercial doit faire l'objet d'une autorisation écrite préalable de l'OCDE.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Espèces utilisées dans l'essai**

4. *Xenopus laevis* est une espèce élevée couramment dans les laboratoires du monde entier, et aisément accessible auprès de fournisseurs commerciaux. Sa reproduction peut être induite facilement tout au long de l'année au moyen d'injections de gonadotropine chorionique humaine (hCG), les larves ainsi obtenues peuvent être élevées en grand nombre de manière systématique jusqu'aux stades de développement voulus, afin d'appliquer des protocoles d'essai spécifiques au stade de développement. Dans le cadre du présent essai, il est préférable d'utiliser des larves issues d'adultes élevés in situ. Bien qu'il ne s'agisse pas de la procédure privilégiée, il est également possible de transférer les œufs et les embryons à partir d'un autre laboratoire menant cet essai, et de leur permettre de s'acclimater. En revanche, l'expédition d'animaux au stade larvaire destinés à l'essai n'est pas acceptable.

Équipement et fournitures

5. Le matériel suivant est nécessaire à la conduite de l'essai:
 - a) système d'exposition (voir la description ci-dessous);
 - b) aquariums en verre ou en acier inoxydable (voir la description ci-dessous);
 - c) viviers de reproduction;
 - d) appareil de contrôle de la température (p. ex., dispositifs de chauffage et de refroidissement réglables à 22 ± 1 °C);

- e) thermomètre;
- f) microscope binoculaire à dissection;
- g) caméra numérique dotée d'une résolution minimale de 4 mégapixels et d'une fonction micro;
- h) logiciel de numérisation des images;
- i) boîtes de Petri (p. ex. 100 × 15 mm) ou chambre de plastique transparent de taille comparable;
- j) balance analytique d'une précision de 3 décimales (mg);
- k) appareil de mesure de l'oxygène dissous;
- l) pH-mètre;
- m) appareil de mesure de l'intensité lumineuse capable de fournir des résultats en lux;
- n) divers outils et éléments de verrerie de laboratoire;
- o) pipettes réglables (10 à 5 000 µl) ou série de pipettes de tailles équivalentes;
- p) quantités suffisantes de substance chimique d'essai pour mener l'étude, de préférence issues du même numéro de lot;
- q) instruments d'analyse adaptés à la substance d'essai, ou recours à des services d'analyse contractuels.

Testabilité des substances chimiques

6. L'EMA est fondé sur un protocole d'exposition en milieu aquatique selon lequel la substance d'essai est introduite dans le récipient d'essai par le biais d'un système d'écoulement continu. Les méthodes par écoulement continu sont néanmoins soumises aux contraintes relatives au type de substances chimiques pouvant être soumises à l'essai, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Par conséquent, avant la mise en œuvre de ce protocole, il convient de collecter les informations de référence sur la substance chimique en question pour déterminer sa testabilité, et de consulter la publication intitulée OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (4). Parmi les caractéristiques indiquant d'éventuelles difficultés pour un test en milieu aquatique figurent: des coefficients de partition eau/octanol ($\log K_{ow}$) élevés, une volatilité importante, une tendance à l'hydrolyse et à la photolyse dans les conditions d'éclairage ambiant d'un laboratoire. D'autres facteurs peuvent entrer en jeu dans la détermination de la testabilité, et font l'objet d'une évaluation au cas par cas. Si l'utilisation d'un système d'écoulement continu ne permet pas de tester la substance, il est possible de recourir à un dispositif de renouvellement statique. Dans le cas où aucune des solutions n'est adaptée à la substance d'essai, celle-ci ne peut donc pas être soumise au présent protocole.

Système d'exposition

7. Un système de dilution par écoulement continu est préférable, si possible, à un dispositif de renouvellement statique. Si les propriétés physiques et/ou chimiques de l'une des substances chimiques d'essai ne permettent pas de recourir à un système de dilution par écoulement continu, un procédé d'exposition différent (p. ex. avec renouvellement statique) peut être employé. Les composants du système sont constitués d'un matériau adapté au contact avec l'eau, comme le verre, l'acier inoxydable ou le polytétrafluoroéthylène. Certaines matières plastiques appropriées peuvent toutefois être utilisées à condition qu'elles ne perturbent par l'étude. Les viviers d'exposition sont constitués d'aquariums de verre ou d'acier inoxydable, équipés de conduites verticales maintenant le volume d'eau entre 4,0 et 10,0 l et une profondeur minimum du milieu de 10 à 15 cm. Le système prend en charge l'ensemble des concentrations d'exposition ainsi que le témoin, avec quatre répliquats par traitement. La vitesse d'écoulement de chaque vivier est constante afin de garantir la stabilité des conditions biologiques et de l'exposition chimique (par exemple 25 ml/min). Les viviers sont disposés de manière aléatoire au sein du système d'exposition, pour amoindrir les effets éventuellement liés à la position, comprenant notamment de légères variations de température, d'intensité lumineuse, etc. Un éclairage fluorescent est apporté selon un cycle de 12 h de lumière/12 h d'obscurité, avec une intensité à la surface de l'eau comprise entre 600 et 2 000 lux (lumens/m²). Dans chaque vivier d'essai, les conditions sont maintenues aux valeurs suivantes: température de l'eau à 22 ± 1 °C, pH entre 6,5 et 8,5, et concentration d'oxygène dissous (OD) supérieure à 3,5 mg/l (> 40 % de la saturation de l'air). Ces valeurs sont contrôlées au minimum une fois par semaine, la température étant de préférence mesurée en permanence dans au moins un des récipients d'essai. L'Appendice 1 présente les conditions expérimentales nécessaires à l'exécution de ce protocole. Pour des informations complémentaires concernant la mise en place de systèmes d'exposition à écoulement continu et/ou renouvellement statique, veuillez vous reporter au guide de l'ASTM intitulé Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians (5) et aux essais de toxicologie aquatique généraux.

Qualité de l'eau

8. Toute eau disponible localement (par exemple: eau de source ou eau du robinet filtrée sur charbon) et permettant la croissance et le développement normaux des têtards de *X. laevis* peut être employée. Dans la mesure où la qualité de l'eau est susceptible de varier de façon importante d'une zone à l'autre, elle est évaluée, en particulier en l'absence de données historiques concernant l'usage de cette eau pour élever des *xénopes*. Il convient de vérifier avec soin que l'eau ne contient pas de cuivre, de chlore ou de chloramines, tous ces produits chimiques étant toxiques pour les grenouilles et les têtards. Il est également recommandé d'analyser les concentrations de fluorure, perchlorate et chlorate (produits secondaires issus de la désinfection de l'eau potable) dans le milieu aquatique, puisque tous ces anions sont des substrats des transporteurs d'iode de la glande thyroïde, et que des teneurs élevées de chacun de ces ions sont susceptibles de perturber les résultats de l'essai. L'analyse est réalisée avant le lancement des essais, et l'eau utilisée dans ce cadre ne contient donc normalement pas ces anions.

Concentration d'iode dans l'eau employée pour l'essai

9. La synthèse d'hormones par la glande thyroïde repose sur des apports suffisants d'iode aux larves, assurés par une combinaison de sources aqueuses et alimentaires. Il n'existe aujourd'hui aucune recommandation d'origine empirique concernant les concentrations d'iode minimales. Cependant, la disponibilité de l'iode est susceptible d'affecter la capacité de réponse du système thyroïdien aux agents actifs sur la thyroïde, un facteur par ailleurs connu pour influencer l'activité basale de cette glande: ce point mérite d'être pris en compte lors de l'interprétation des résultats d'histopathologie de la thyroïde. C'est pourquoi les concentrations d'iode mesurées dans le milieu aquatique utilisé pour l'essai sont rapportées. D'après les données accessibles des études de validation, les concentrations de l'iodure (I⁻) dans l'eau de l'essai étaient situées entre 0,5 et 10 µg/l. Dans l'idéal, cette concentration ne devrait pas chuter en dessous de 0,5 µg/L. Lorsque l'essai est mené avec de l'eau désionisée, un supplément d'iode est nécessaire afin d'atteindre cette concentration minimum de 0,5 µg/l. Tout nouvel ajout d'iode ou d'autres sels à l'eau de l'essai est notifié dans le rapport.

Maintenance des animaux

Soin et reproduction des adultes

10. Le soin et la reproduction des adultes sont réalisés conformément aux guides standard. Pour des informations plus détaillées, et le lecteur est invité à se reporter au guide des normes en matière d'essai de tératogénèse sur embryons de grenouille (FETAX) (6). Ces guides standard présentent un exemple des méthodes de soin et de reproduction adaptées, sans qu'il ne soit nécessaire de s'y conformer strictement. Pour provoquer la reproduction, des couples (3 à 5) d'adultes mâles et femelles reçoivent une injection de gonadotropine chorionique humaine (hCG). La dose injectée aux femelles et aux mâles s'élève respectivement à environ 800 UI - 1 000 UI et 600 UI — 800 UI de hCG dissoute dans une solution saline à 0,6 - 0,9 %. Les couples de reproducteurs sont placés dans de grands viviers, à l'abri des perturbations et dans des conditions statiques, en vue de stimuler l'amplexus. Chaque vivier de reproduction est équipé d'une grille en plastique ou en acier inoxydable en guise de faux plancher, permettant aux amas d'œufs de tomber dans un double fond. Si les grenouilles reçoivent une injection en fin d'après-midi, elles déposent habituellement la majorité de leurs œufs vers le milieu de la matinée suivante. Lorsqu'une quantité suffisante d'œufs ont été libérés et fertilisés, il convient de retirer les adultes des viviers de reproduction.

Soin et sélection des larves

11. Une fois que les adultes ont quitté les viviers de reproduction, les œufs sont collectés et évalués en termes de viabilité en se fondant sur un sous-échantillon d'embryons représentatifs issus de tous ces viviers. Le ou les meilleurs frais produits par un individu (2 à 3 sont recommandés pour évaluer la qualité des frais) sont retenus, d'après des critères liés à la viabilité et à la quantité des embryons (s'élevant à 1 500 minimum). Tous les organismes employés dans l'étude sont issus d'un même frai, ce qui implique que les frais ne soient pas mélangés les uns aux autres. Les embryons sont transférés dans une boîte ou un récipient plat, et tous les œufs manifestement morts ou anormaux [voir la définition en (5)] sont retirés à l'aide d'une pipette. Les embryons sains de chacun des trois frais sont alors placés dans trois viviers différents d'éclosion. Quatre jours après ce transfert, le meilleur frai est sélectionné, sur des critères de viabilité et de succès de l'éclosion, et les larves sont réparties dans un nombre approprié de viviers d'élevage à 22 ± 1 °C. En outre, d'autres larves sont hébergées dans des viviers supplémentaires pour servir de doublure dans l'hypothèse où une mortalité serait observée dans les viviers d'élevage pendant la première semaine. Cette procédure maintient une densité d'individus cohérente, ce qui limite les divergences de développement au sein d'une cohorte issue d'un même frai. L'ensemble des viviers d'élevage sont vidés quotidiennement. Par précaution, les gants vinyle ou nitrile sont préférés aux gants en latex. Les individus décédés sont retirés tous les jours et remplacés par les larves prévues à cet effet afin de maintenir une densité d'organismes constante pendant la première semaine. Les larves sont alimentées au moins deux fois par jour.

12. Pendant la phase de pré-exposition, les têtards sont acclimatés aux conditions correspondant à la phase d'exposition réelle, y compris le type de nourriture, la température, le cycle lumière/obscurité et le milieu d'élevage. Il est donc recommandé d'employer la même eau pour la dilution/l'élevage au cours des phases de pré-exposition puis d'exposition. Lorsqu'un système d'élevage statique est utilisé lors de la préexposition des têtards, le milieu est intégralement renouvelé au moins deux fois par semaine. Il convient d'éviter le surpeuplement, dû à des densités de larves importantes pendant la période de pré-exposition, car ces conditions sont susceptibles de fortement perturber le développement des têtards lors de la phase d'essai consécutive. Aussi la densité ne doit-elle pas dépasser environ quatre têtards par litre de milieu d'élevage (dans le cas d'un système d'exposition statique) ou dix têtards par litre de milieu d'élevage (avec p. ex. une vitesse d'écoulement de 50 ml/min dans le système d'élevage ou de pré-exposition). Dans ces conditions, les têtards se développent pour passer du stade 45/46 au stade 51 en douze jours. Le stade de développement des têtards représentatifs de la population de cette lignée est évalué quotidiennement afin de déterminer le bon moment pour entamer la phase d'exposition. Il convient d'être attentif à stresser et perturber les têtards le moins possible, en particulier pendant les déplacements, le nettoyage des aquariums et la manipulation des larves. De même, toute activité ou condition stressante est évitée, notamment les bruits forts et/ou constants, les vibrations et coups au niveau des aquariums, l'activité excessive en laboratoire et les changements brusques de l'environnement (exposition lumineuse, température, pH, OD, vitesse d'écoulement, etc.). Si les têtards ne se développent pas jusqu'au stade 51 dans les 17 jours qui suivent la fertilisation, l'excès de stress est considéré comme une des causes éventuelles de ce retard.

Alimentation et élevage des larves

13. Les têtards sont nourris avec, par exemple, l'aliment pour têtards du commerce qui est utilisé dans les études de validation (voir également l'Appendice 1) pendant la période de pré-exposition [après le stade Nieuwkoop Faber (NF) 45/46 (8)] et durant toute la phase d'essai de 21 jours, ou tout autre régime alimentaire ayant fait preuve des mêmes performances dans le cadre d'un essai de métamorphose des amphibiens. Pendant la période de préexposition, le régime alimentaire est soigneusement ajusté aux demandes des têtards en développement. En pratique, de petites portions de nourriture sont apportées aux larves nouvellement écloses plusieurs fois par jour (au moins deux fois). Néanmoins, l'excès de nourriture est à éviter i) pour maintenir la qualité de l'eau et ii) pour prévenir l'encrassement des filtres des branchies avec des particules alimentaires et des détritiques. En cas d'emploi de l'aliment pour têtards utilisé dans les études de validation, les rations quotidiennes sont augmentées au cours de la croissance des têtards jusqu'à atteindre environ 30 mg/animal/jour, peu avant le début de l'essai. Cet aliment pour têtards disponible dans le commerce, dont les études de validation ont révélé l'aptitude à permettre une croissance et un développement corrects des larves de *X. laevis* se compose de fines particules qui restent en suspension dans la colonne d'eau pendant une longue période, et peuvent être entraînées par l'écoulement. La dose quotidienne de nourriture est donc répartie en portions réduites, apportées au moins deux fois par jour. Dans le cas de cet aliment, le régime alimentaire est présenté dans le Tableau 1. Le rythme d'alimentation est enregistré. L'aliment peut être administré sous forme sèche ou mis en réserve en solution dans l'eau de dilution. Une telle solution de réserve est préparée de nouveau un jour sur deux, et conservée à 4 °C quand elle n'est pas utilisée.

Tableau 1.

Régime alimentaire des têtards de *X. laevis* pendant la phase de l'EMA où les animaux sont en vie, en condition d'écoulement continu

Jour d'étude	Ration alimentaire (mg d'aliment/animal/jour)
0 - 4	30
5 - 7	40
8 - 10	50
11 - 14	70
15 - 21	80

Analyse chimique

14. Avant de lancer l'étude, il convient d'évaluer la stabilité de la substance chimique d'essai en se penchant sur les informations disponibles en termes de solubilité, de dégradabilité et de volatilité. Des échantillons des solutions d'essai de chaque vivier répliqué pour chacune des concentrations sont soumis à des analyses chimiques au début de l'essai (jour 0), et une fois par semaine pendant son déroulement pour un minimum de quatre échantillons. Il est également conseillé d'analyser chaque concentration d'essai lors de la préparation du système afin d'en vérifier les performances, avant de lancer l'essai. L'analyse des solutions de réserve est en outre recommandée à chaque fois qu'elles sont renouvelées, en particulier si leur volume ne correspond pas aux quantités de produits chimiques suffisantes pour couvrir l'ensemble de la période d'échantillonnage de routine. Si les substances chimiques se révèlent indétectables à certaines, voire toutes les concentrations prévues pour l'essai, les solutions de réserve sont analysées et les vitesses d'écoulement du système sont enregistrées en vue de calculer les concentrations nominales.

Introduction des substances chimiques

15. La méthode employée pour introduire la substance chimique d'essai dans le système est variable en fonction des propriétés physico-chimiques de la substance chimique. Les substances hydrosolubles peuvent être mises en solution en aliquotes dans l'eau utilisée pour l'essai à des concentrations aboutissant à la teneur voulue dans le cadre d'une introduction au moyen d'un système d'écoulement continu. Les substances chimiques liquides à température ambiante mais peu solubles dans l'eau peuvent être introduites avec les méthodes de saturation liquide-liquide. Les substances chimiques solides à température ambiante et faiblement hydrosolubles peuvent être introduites par saturation avec colonne de laine de verre (7). Les systèmes dépourvus de véhicules sont préférables, cependant les différentes substances d'essai possèdent des propriétés physico-chimiques variables, qui réclament des approches diverses pour la préparation des solutions aqueuses visant à l'exposition chimique. La priorité demeure néanmoins de chercher à éviter les solvants et autres véhicules, car: i) certains solvants sont par eux-mêmes susceptibles de se révéler toxiques et/ou d'induire des réponses endocriniennes indésirables ou inattendues, ii) l'essai de substances chimiques à une concentration supérieure à leur solubilité dans l'eau (ce qui arrive fréquemment si des solvants sont utilisés) peut fausser la détermination des concentrations efficaces, et iii) le recours aux solvants dans les essais à long terme peut se traduire par la formation importante de biofilms associés à l'activité microbienne. En présence de substances d'essai difficiles à tester, le solvant n'est utilisé qu'en dernier ressort, et le document intitulé OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (4) est consulté afin de déterminer la meilleure méthode à employer. Le choix du solvant est guidé par les propriétés chimiques de la substance concernée. Parmi les solvants qui se sont révélés efficaces pour les essais de toxicité aquatique figurent l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthylformamide et le triéthylène glycol. Si un solvant est employé comme véhicule, ses concentrations demeurent en dessous de la concentration sans effet observé chronique; le document d'orientation de l'OCDE préconise un maximum de 100 µl/l, cependant un rapport récent ramène cette recommandation à une concentration de solvant dans l'eau de dilution limitée à 20 µl/l seulement (12). De plus, en cas de recours à un solvant comme véhicule, des témoins appropriés pour le solvant sont analysés en plus des témoins sans solvant (eau pure). Lorsque l'introduction du produit chimique se révèle impossible via l'eau, que ce soit en raison de ses caractéristiques physico-chimiques (faible solubilité) ou de sa disponibilité limitée, l'administration par le biais de l'alimentation peut être envisagée. Quelques travaux préliminaires ont été menés pour ce qui relève de l'exposition par la nourriture, cependant cette méthode demeure marginale. Le choix du procédé s'appuie sur une documentation solide et fait l'objet de vérification par l'analyse.

Sélection des concentrations d'essai

Établissement de la concentration d'essai maximale

16. Dans le cadre de l'essai, la concentration maximale correspond: soit à la limite de solubilité de la substance en question: soit à la concentration maximale tolérée (CMT) pour les substances chimiques présentant une toxicité aiguë, soit à 100 mg/l, la concentration résultante la plus basse étant retenue.
17. La CMT est définie comme la concentration de la substance d'essai la plus élevée entraînant moins de 10 % de mortalité aiguë. Pour recourir à cette approche, des données empiriques relatives à la mortalité aiguë permettant d'estimer la valeur de la CMT sont nécessaires. La détermination de la CMT peut s'avérer inexacte, et requiert donc généralement un avis professionnel. Si les modèles de régression constituent les outils les plus solides techniquement pour estimer la CMT, il est néanmoins possible d'en obtenir une approximation utile en divisant par trois les données existantes de toxicité aiguë exprimée par la CL_{50} . Les données de toxicité aiguë peuvent cependant manquer pour les espèces employées dans l'essai. Si ces valeurs ne sont pas disponibles pour ces espèces, un essai de CL_{50} peut être effectué sur 96 h avec des têtards représentatifs (c'est-à-dire au même stade de développement) de la population soumise à l'EMA. Il est également possible, lorsque des données sur d'autres espèces aquatiques sont disponibles (par exemple des études de CL_{50} chez les poissons ou chez d'autres amphibiens), de faire appel à l'avis d'un professionnel qui fournira une estimation de la CMT probable, au moyen d'une extrapolation interspèces.

18. Si la substance chimique ne présente pas de toxicité aiguë et demeure soluble à plus de 100 mg/l, une autre solution consiste à choisir cette valeur comme concentration d'essai maximale (CEM), puisque cette dernière est habituellement considérée comme "pratiquement non toxique".
19. Par ailleurs, et bien qu'il ne s'agisse pas de la procédure recommandée, des méthodes de renouvellement statique peuvent être mises en œuvre quand les méthodes par écoulement continu ne permettent pas d'atteindre la CMT. Si ces méthodes de renouvellement statiques sont employées, la stabilité de la concentration de la substance chimique d'essai est alors consignée, et reste dans les limites des critères de performances de l'essai. Des périodes de renouvellement de 24 h sont conseillées. En revanche, les périodes de renouvellement dépassant les 72 h ne sont pas acceptables. Les autres paramètres caractérisant la qualité de l'eau (notamment OD, température, pH, etc.) sont en outre mesurés à l'issue de chaque période, juste avant le renouvellement.

Fourchette de concentrations de l'essai

20. Le minimum requis comprend trois concentrations d'essai et un témoin d'eau pure (plus un véhicule témoin, le cas échéant). Le différentiel entre la plus élevée et la plus basse des concentrations d'essai minimale observées est d'environ une unité d'ordre de grandeur. La distance entre deux doses correspond au maximum à un facteur de 0,1 et au minimum de 0,33.

PROCÉDURE

Lancement et conduite de l'essai

Jour 0

21. L'exposition débute lorsqu'un nombre suffisant de têtards de la population d'élevage en préexposition ont atteint le stade de développement 51, d'après Nieuwkoop et Faber (8), et que leur âge postfertilisation est inférieur ou égal à 17 jours. Pour sélectionner les individus destinés à l'essai, les têtards d'aspect sain et normal sont isolés du reste de la lignée et placés dans un même récipient contenant un volume adapté d'eau de dilution. La détermination du stade de développement est effectuée en retirant un à un les têtards du vivier commun à l'aide d'un petit filet ou d'une passoire pour les transférer dans une chambre de mesure transparente (p. ex. une boîte de Petri de 100 mm) remplie d'eau de dilution. S'il est préférable de ne pas recourir à l'anesthésie pendant la détermination du stade de développement, on peut toutefois anesthésier les têtards individuellement avant manipulation avec 100 mg/l de méthanesulfonate de tricaine (p. ex. MS-222), convenablement tamponné au bicarbonate de sodium (pH 7,0). Si le choix de l'anesthésie est retenu, il convient de recueillir la méthodologie appropriée pour utiliser le MS-222, par exemple, auprès de laboratoires expérimentés, et de la rapporter avec les résultats de l'essai. Les animaux sont traités avec soin durant le transfert afin de minimiser le stress dû à la manipulation et d'éviter toute blessure.
22. Le stade de développement des individus est évalué au moyen d'un microscope binoculaire à dissection. Pour réduire la variabilité maximale du stade de développement, il est important de mener cet examen le plus précisément possible. D'après Nieuwkoop et Faber (8), le premier repère de développement permettant de sélectionner les larves ayant atteint le stade 51 est constitué par la morphologie des pattes postérieures. Les caractéristiques morphologiques des membres postérieurs sont donc à examiner au microscope. Le guide complet de Nieuwkoop et Faber (8) est consulté pour collecter les informations complètes sur la détermination du stade de développement des têtards, néanmoins, il est aussi possible de caractériser ce stade de manière fiable au moyen de critères morphologiques apparents. Le tableau suivant est un outil permettant de simplifier et rationaliser le procédé de détermination du stade de développement tout au long de l'étude, en identifiant les critères morphologiques apparents associés aux différents stades dans l'hypothèse d'un développement normal.

Tableau 2.

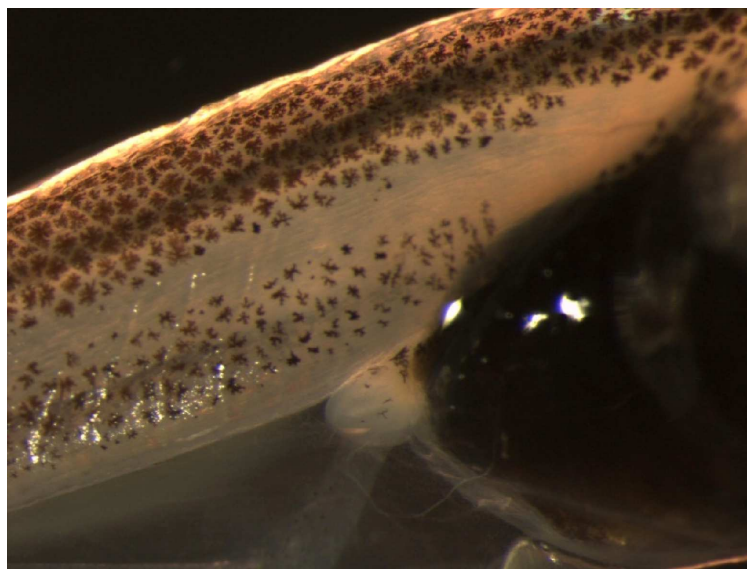
Critères morphologiques apparents pour la détermination du stade de développement d'après les recommandations de Nieuwkoop et Faber

Critères morphologiques apparents	Stade de développement															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Pattes postérieures	X	X	X	X	X	X	X									
Pattes antérieures						X	X	X	X	X						
Structure crâniofaciale										X	X	X	X			
Morphologie du nerf olfactif											X	X	X			
Longueur de la queue													X	X	X	X

23. L'essai n'est lancé que lorsque tous les têtards ont atteint le stade 51. Le principal critère morphologique apparent pour la détermination du stade de développement est la morphologie des pattes postérieures, comme cela est démontré dans la Figure 1.

Figure 1.

Morphologie des pattes postérieures d'un têtard de *X. laevis* au stade 51.



24. En plus de la sélection en fonction du stade de développement, il est également possible d'effectuer une sélection des animaux destinés à l'expérimentation en fonction de leur taille. À cette fin, la longueur totale du corps (différente de la longueur museau-cloaque — LMC) est relevée au jour 0 chez un sous-échantillon d'environ 20 têtards au stade NF 51. Une fois que la moyenne de la longueur totale du corps a été calculée pour ce groupe d'individus, les valeurs limites minimum et maximum de cette longueur pour les individus admis dans l'essai sont fixées respectivement en soustrayant et en ajoutant 3 mm à la moyenne établie précédemment (les valeurs moyennes de la longueur totale du corps sont comprises entre 24,0 et 28,1 mm chez les têtards de stade 51). La détermination du stade de développement demeure néanmoins le principal paramètre pour évaluer si un animal est prêt pour l'essai ou non. Les têtards présentant des malformations manifestes ou des blessures sont exclus de l'essai.
25. Les individus répondant aux critères liés au stade décrits précédemment sont mis de côté dans un vivier rempli avec l'eau d'élevage pure, jusqu'à la fin du processus de détermination du stade de développement. Une fois que cette étape est terminée, les larves sont réparties aléatoirement dans les viviers destinés au traitement d'exposition, jusqu'à ce que chacun d'eux compte 20 animaux. Chacun de ces viviers fait alors l'objet d'une inspection afin de détecter les individus d'apparence anormale, présentant notamment des blessures, une nage inhabituelle, etc. Quand leur aspect n'est absolument pas sain, les têtards sont retirés des viviers de traitement et remplacés par les larves nouvellement sélectionnées dans le vivier commun.

Observations

26. Des informations plus approfondies sur les procédures de clôture de l'essai et le traitement des têtards sont disponibles dans le document d'orientation de l'OCDE intitulé Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology (9).

Mesures au jour 7

27. Au jour 7, cinq têtards par répliquat sont prélevés au hasard dans chaque vivier d'essai. La procédure aléatoire employée garantit une même probabilité d'être sélectionné à tous les individus. Pour cela, toute méthode de choix aléatoire est valable, mais tous les têtards sont capturés dans un filet. Les larves non retenues sont rendues à leur vivier d'origine, et les individus sélectionnés sont euthanasiés humainement en les plaçant dans 150 à 200 mg/l de MS-222, par exemple, convenablement tamponné à pH 7,0 avec du bicarbonate de sodium. Les têtards euthanasiés sont rincés à l'eau, séchés, puis pesés au milligramme près. La longueur des pattes postérieures, la longueur museau-cloaque et le stade de développement (évalués à l'aide d'un microscope binoculaire à dissection) sont déterminés pour chaque larve.

Mesures au jour 21 (clôture de l'essai)

28. À la fin de l'essai (jour 21), les têtards restants sont euthanasiés humainement en les plaçant dans 150 à 200 mg/l de MS-222, par exemple, convenablement tamponné avec du bicarbonate de sodium, comme précédemment. Ils sont alors rincés à l'eau, séchés, puis pesés au milligramme près. Le stade de développement, la LMC et la longueur des pattes postérieures sont déterminés pour chaque têtard.
29. Les larves sont ensuite toutes placées dans le fixateur de Davidson durant 48 à 72 h, soit comme échantillon de corps entier, soit en ne conservant que les tissus de la tête, y compris la mandibule, pour les évaluations histologiques. Pour l'histopathologie, l'échantillonnage exige un total de cinq têtards par vivier répliqué. La hauteur des cellules folliculaires dépendant du stade de développement (10), l'approche la mieux adaptée pour l'échantillonnage consiste à sélectionner les individus ayant atteint le même stade, autant que possible. Pour choisir des têtards de même stade de développement, il faut que ce stade soit connu chez tous les animaux avant la sélection et le traitement des données collectées et conservées. Il est nécessaire d'achever cette détermination des stades de développement car des différences de développement normales se traduisent par des différentiels dans la distribution des divers stades au sein de chaque vivier répliqué.
30. Les animaux sélectionnés pour l'histopathologie ($n = 5$ pour chaque répliquat) correspondent au stade médian observé chez les témoins (répliquats regroupés), autant que possible. S'il se trouve des viviers répliqués comptant plus de cinq larves au stade approprié, cinq individus sont alors sélectionnés au hasard.
31. À l'inverse, si certains viviers répliqués contiennent moins de cinq animaux au stade approprié, des individus sont choisis de manière aléatoire au sein de la population de stade immédiatement inférieur ou supérieur pour rejoindre le groupe échantillon, jusqu'à ce que cet ensemble compte cinq larves par répliquat. Idéalement, le choix de prélever des larves au sein de la population de stade immédiatement inférieur ou supérieur pour compléter l'échantillon est étayé par l'évaluation globale de la distribution des stades de développement dans les populations témoins et soumises aux traitements chimiques. Ainsi, si l'exposition chimique entraîne un retard de développement, les larves complémentaires sont alors prélevées dans la population présentant le stade immédiatement inférieur. Inversement, si l'exposition chimique entraîne une accélération du développement, les larves complémentaires sont prélevées dans la population présentant le stade immédiatement supérieur.
32. En cas de perturbation sévère du développement des têtards en raison du traitement avec la substance chimique d'essai, la distribution des stades observés dans la population exposée chimiquement est susceptible de ne pas correspondre à la médiane des stades de développement calculée pour les témoins. Dans ces cas uniquement, le processus de sélection est modifié et se fonde sur un stade différent de la médiane des stades de développement observés pour les témoins, afin d'obtenir un échantillon de larves destinées à l'histologie de la thyroïde cohérent en termes de stade. En outre, si les stades demeurent indéterminés (dans les cas d'asynchronie), il convient de choisir au hasard cinq têtards dans chaque répliquat, pour les analyses histologiques. Les raisons motivant l'intégration dans l'échantillon de toute larve présentant un stade de développement différent de la valeur médiane chez les témoins sont rapportées.

Détermination des observations et effets biologiques

33. Pendant la phase d'exposition de 21 jours, le relevé des principales observations rapportées a lieu aux jours 7 et 21, néanmoins une observation quotidienne de la population étudiée est nécessaire. Le Tableau 3 présente un aperçu de l'ensemble des observations rapportées et le moment où elles sont relevées. Des informations plus détaillées concernant les techniques relatives au relevé des observations biologiques et aux évaluations histologiques sont disponibles dans le document d'orientation de l'OCDE (9)

Tableau 3.

Date et fréquence des observations rapportées au cours de l'EMA.

Observations rapportées	Quotidiennement	Jour 7	Jour 21
— Mortalité	•		
— Stade de développement		•	•
— Longueur des pattes postérieures		•	•
— Longueur museau-cloaque (LMC)		•	•
— Poids du corps humide		•	•
— Histologie de la glande thyroïde			•

Observations rapportées

34. Le stade de développement, la longueur des pattes postérieures, la LMC et le poids humide constituent les observations morphologiques de l'EMA; chacune de ces observations fait l'objet d'une discussion ci-après. Des informations techniques complémentaires sur la collecte de ces données, sont disponibles dans le document d'orientation de l'OCDE cité en référence, qui comprend entre autres les procédures d'analyse assistée par ordinateur recommandées.

Stade de développement

35. Le stade de développement des têtards de *X. laevis* est déterminé à l'aide des critères d'évaluation établis par Nieuwkoop et Faber (8). Les données relatives au stade de développement permettent de déceler si celui-ci est accéléré, asynchrone, retardé ou non affecté. Une accélération ou un retard de développement sont détectés en comparant les stades médians atteints chez les témoins et les groupes traités, respectivement. Une asynchrone est rapportée quand les tissus observés ne présentent aucune anomalie ou malformation, mais que le rythme de la morphogenèse ou le développement des différents tissus sont en décalage chez un même individu.

Longueur des pattes postérieures

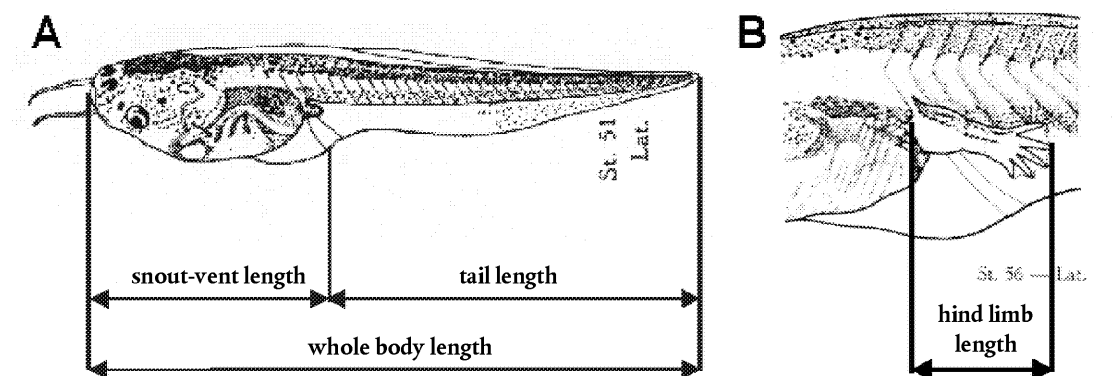
36. La différenciation et la croissance des pattes postérieures sont contrôlées par les hormones thyroïdiennes et constituent des critères de développement majeurs, déjà employés pour la détermination du stade. Le développement des pattes postérieures est employé comme donnée qualitative pour déterminer le stade de développement, cependant, dans le cas présent, il s'agit d'un paramètre d'évaluation quantitatif. Par voie de conséquence, la longueur des pattes postérieures est mesurée pour détecter des effets sur l'axe thyroïdien (graphique 2). Par souci de cohérence, cette longueur est mesurée sur la patte postérieure gauche. La longueur des pattes postérieures est relevée aux jours 7 et 21 de l'essai. Au jour 7, cette valeur est mesurée directement, comme l'illustre le graphique 2. En revanche, le relevé de la longueur des pattes postérieures au jour 21 est compliqué par les courbures du membre. Aussi les mesures au jour 21 doivent-elles être prises à partir de la paroi corporelle puis suivre la ligne médiane de la patte, en se pliant à toutes les déviations angulaires. Des changements de longueur des pattes postérieures observés dès le jour 7, même s'ils ne sont pas évidents au jour 21, sont considérés comme des signes potentiels d'une activité sur la thyroïde. Les longueurs sont mesurées sur des photos numériques, au moyen de logiciels d'analyse d'image, procédé décrit dans le document d'orientation de l'OCDE intitulé Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology (9).

Longueur et poids humide du corps

37. Le protocole d'essai comprend la caractérisation de la longueur museau-cloaque (LMC) (Figure 2) et du poids humide, en vue d'évaluer les effets potentiels des substances chimiques d'essai sur la vitesse de croissance des têtards, par comparaison avec un groupe témoin. Par ailleurs, ces valeurs sont utiles pour détecter la toxicité générale de la substance chimique d'essai. Dans la mesure où l'élimination du film d'eau avant la pesée est susceptible de stresser les têtards et de leur infliger des blessures cutanées, de tels relevés sont limités à un sous-échantillon au jour 7, avant d'être effectués sur l'ensemble des animaux à la fin de l'essai (jour 21). À des fins de cohérence, il convient de considérer l'aspect crânien du cloaque comme la limite de la queue, pour la mesure.
38. La longueur museau-cloaque (LMC) sert à évaluer la croissance des têtards, comme l'illustre la Figure 2.

Figure 2.

(A) Types de mesures de la longueur du corps et (B) de la longueur des pattes postérieures chez les têtards de *X. laevis* (1).



Histologie de la glande thyroïde

39. Les observations du stade de développement et de la longueur des pattes postérieures sont importantes pour évaluer les changements du développement métamorphique liés à l'exposition, cependant, un retard de développement ne saurait être considéré en soi comme le signe d'une activité antithyroïdienne. Certaines modifications ne sont observables qu'au cours d'analyses histopathologiques de routine. Les critères de diagnostic comprennent l'hypertrophie/atrophie de la glande thyroïde, l'hypertrophie des cellules folliculaires, l'hyperplasie des cellules folliculaires, et, en tant que critères qualitatifs complémentaires: la superficie de la lumière folliculaire, la qualité des colloïdes ainsi que la taille/forme des cellules folliculaires. Le grade de sévérité attribué (sur 4 grades) est consigné. Des informations complémentaires sur l'obtention et le traitement des échantillons destinés à l'analyse histologique, et sur la mise en œuvre de telles analyses sur les échantillons tissulaires sont disponibles dans les documents intitulés "Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 — Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation" et "Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 — Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas" (9). Les laboratoires menant cet essai pour la ou les premières fois sont invités à recueillir les conseils de pathologistes expérimentés pour se former, avant de s'engager dans l'analyse histologique et l'évaluation de la glande thyroïde. Les changements aussi importants que manifestes observés sur les paramètres morphologiques indiquant une accélération du développement ou une asynchronie peuvent dispenser du besoin d'effectuer des analyses histologiques sur les glandes thyroïdes. L'absence de modifications morphologiques évidentes ou de retard de développement attesté justifie toutefois le recours aux analyses histologiques.

Mortalité

40. L'ensemble des viviers est suivi quotidiennement pour détecter les têtards morts et contrôler le nombre de larves correspondant à chaque vivier. Il convient de consigner la date, la concentration et le numéro du vivier pour tout cas de mortalité. Les animaux morts sont retirés du vivier d'essai dès qu'ils sont identifiés. Les taux de mortalité supérieurs à 10 % sont des indicateurs potentiels de conditions d'essai mal adaptées, ou d'effets toxiques de la substance chimique d'essai.

Observations complémentaires

41. L'observation d'un comportement anormal, de malformations très visibles et de lésions est consignée. Il convient de noter la date, la concentration et le numéro du vivier pour tout cas de comportement anormal, de malformations évidentes et de lésions. Un comportement normal se caractérise par la suspension des têtards dans la colonne d'eau, la queue élevée au-dessus de la tête, un battement léger de la queue sur un rythme régulier, des remontées à la surface, un opercule mobile, et la réponse au stimulus. Inversement, un comportement anormal implique notamment des animaux flottant à la surface, immobiles au fond du vivier, une nage inversée ou irrégulière, un manque d'activité à la surface, et l'absence de réponse au stimulus. En outre, les différences de consommation de nourriture entre les groupes de traitement sont consignées lorsqu'elles sont importantes. Les malformations apparentes et les lésions se manifestent éventuellement par des anomalies morphologiques (par exemple difformité des membres), des lésions hémorragiques et des infections bactériennes ou fongiques, entre autres. Ces déterminations sont d'ordre qualitatif, et sont considérées comme analogues aux signes cliniques de maladies/stress, et toujours en comparaison avec les animaux témoins. Une occurrence ou un taux d'occurrence supérieur dans les viviers exposés par rapport au groupe témoin constitue la preuve d'une toxicité manifeste.

DONNÉES ET RAPPORTS

Collecte des données

42. Toutes les données sont collectées à l'aide de systèmes électroniques ou manuels conformes aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL). Les données de l'étude comprennent:

Substance chimique d'essai:

- Caractérisation de la substance chimique d'essai: propriétés physico-chimiques; informations sur la stabilité et la biodégradabilité.
- Informations et données chimiques: méthode et fréquence de préparation des dilutions. Les informations sur les substances chimiques d'essai détaillent leurs concentrations réelle et nominale, et, dans certains cas, celles de produits chimiques qui ne sont pas la substance d'essai initiale, le cas échéant. Les mesures sur la substance d'essai peuvent aussi bien concerner les solutions de réserve que les solutions d'essai.
- Solvant (s'il ne s'agit pas de l'eau pure): justification du choix et caractérisation de ce solvant (nature, concentration employée).

Conditions de l'essai:

- Registres opérationnels: ils compilent les observations relatives au fonctionnement du système d'essai ainsi qu'à l'environnement et aux infrastructures qui y participent. Habituellement, les registres comprennent: la température ambiante, la température d'essai, la période d'exposition lumineuse, l'état des éléments cruciaux du système d'exposition (notamment les pompes, les compteurs de cycles, les pressions), les débits, les niveaux d'eau, les renouvellements des bouteilles de réserve, et les rapports sur l'alimentation. Les paramètres généraux sur la qualité de l'eau incluent: le pH, l'oxygène dissous, la conductivité, l'iode total, l'alcalinité et la dureté.
- Déviations par rapport à la méthode d'essai: compile toutes les informations ou descriptions narratives des déviations consenties par rapport à la méthode d'essai.

Résultats:

- Observations et données biologiques: elles comprennent les observations quotidiennes sur la mortalité, la consommation de nourriture, les nages anormales, la léthargie, la perte d'équilibre, les malformations, les lésions etc. Les observations et données collectées à intervalle prédéterminé incluent: le stade de développement, la longueur des pattes postérieures, la longueur museau-cloaque et le poids humide.
- Techniques d'analyse statistique utilisées et justification de leur emploi; la présentation des résultats de cette analyse statistique sera de préférence sous forme de tableau.
- Données histologiques: elles incluent les descriptions narratives ainsi que le degré de sévérité et le taux d'incidence des observations spécifiques, conformément au document d'orientation sur l'histopathologie.
- Observations ad hoc: ces observations concernent toute description narrative de l'étude ne correspondant pas aux catégories décrites précédemment.

Rapports de données

43. L'Appendice 2 propose des feuilles de calcul relatives au relevé quotidien des données, qui constituent une aide utile pour entrer les valeurs et calculer les statistiques globales. De plus, des tableaux de rapport sont fournis, ce qui facilite la communication des récapitulatifs des données concernant les effets mesurés. Les tableaux de rapport pour l'évaluation histologique sont disponibles dans l'Appendice 2.

Critères de performance et acceptabilité/validité de l'essai

44. En général, des déviations importantes par rapport à la méthode d'essai se traduisent par des données qui ne sont pas acceptables pour être interprétées et faire l'objet de rapports. Aussi les critères suivants, détaillés dans le tableau 4, ont-ils été développés en vue d'orienter la détermination de la qualité de l'essai effectué et la performance générale des individus témoins.

Tableau 4.

Critères de performance pour l'EMA.

Critères	Limites acceptables
Concentrations d'essai	Maintenues ≤ 20 % CV (variabilité de la concentration d'essai mesurée) sur les 21 jours de l'essai
Mortalité chez les témoins	≤ 10 % — la mortalité dans chaque répliquat des témoins ne dépasse pas 2 têtards
Stade de développement médian chez les témoins à la fin de l'essai	57
Répartition du stade de développement dans le groupe témoin	Les individus correspondant respectivement à 10 % et à 90 % de la distribution du stade de développement ne présentent pas une différence de plus de 4 stades.
Oxygène dissous	≥ 40 % de la saturation de l'air (*)

Critères	Limites acceptables
pH	Le pH demeure entre 6,5 et 8,5. Les différentiels inter-répliquat et intertraitement n'excèdent pas 0,5.
Température de l'eau	22 ± 1 °C — Les différentiels interrépliquat et intertraitement n'excèdent pas 0,5 °C.
Concentrations d'essai hors toxicité manifeste	≥ 2
Performance des répliquats	≤ 2 répliquats sur l'ensemble de l'essai peuvent être compromis
Conditions particulières pour l'utilisation d'un solvant	Si un solvant est utilisé comme véhicule, il convient de mettre en place un témoin pour le solvant et pour l'eau, et les résultats correspondants sont consignés.
	Les différences statistiquement significatives entre les groupes témoins pour le solvant et pour l'eau sont traitées de manière particulière. Voir ci-dessous pour plus d'informations
Conditions particulières pour le recours à un système de renouvellement statique	Les analyses chimiques représentatives effectuées avant et après le renouvellement sont rapportées.
	La teneur en ammoniacque est calculée juste avant le renouvellement.
	Tous les paramètres liés à la qualité de l'eau récapitulés dans le Tableau 1 de l'Appendice 1 sont évalués juste avant le renouvellement.
	La période entre deux renouvellements ne dépasse pas 72 h.
	Un calendrier d'alimentation adapté (50 % de la ration quotidienne de l'aliment pour têtards du commerce).
(*) L'aération de l'eau peut être maintenue au moyen de bulleurs. Il est conseillé de placer les bulleurs à des endroits où ils n'entraînent pas de stress excessif chez les têtards.	

Validité de l'essai

45. Pour être jugé acceptable/valide, un essai satisfait les exigences suivantes:

Validité d'une expérience menée dans le cadre de l'essai, pour conclure à une substance négative en termes d'activité sur la thyroïde:

- (1) Pour tous les traitements considérés (y compris les témoins), la mortalité n'excède pas 10 %. Pour un répliquat donné, la mortalité ne dépasse pas trois têtards; dans le cas contraire, le répliquat est jugé compromis.
- (2) Au moins deux niveaux de traitement dont les quatre répliquats demeurent non compromis sont nécessaires pour effectuer les analyses.
- (3) Au moins deux niveaux de traitement exempts de toxicité manifeste sont nécessaires pour effectuer les analyses.

Validité d'une expérience menée dans le cadre de l'essai, pour conclure à une substance positive en termes d'activité sur la thyroïde:

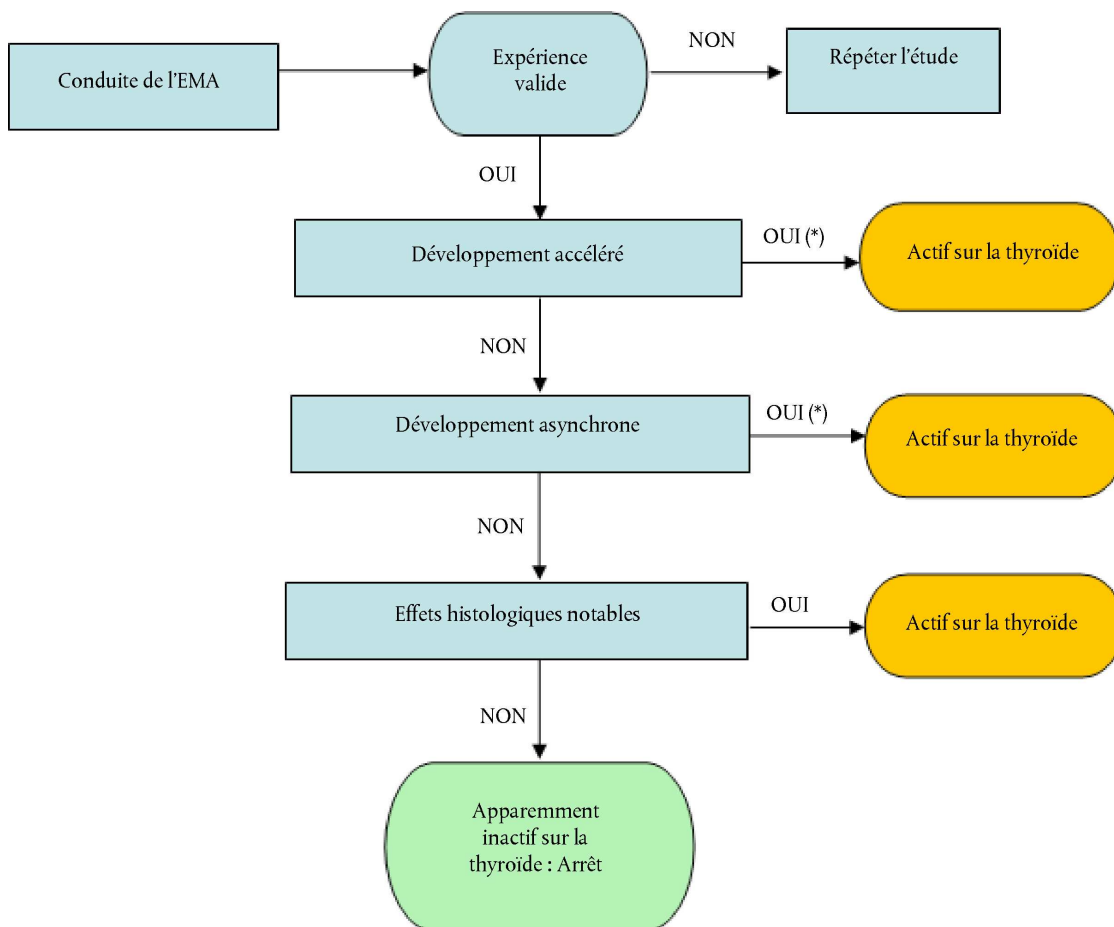
- (1) La mortalité observée est limitée à deux têtards par répliquat dans le groupe témoin, au maximum.

Diagramme de décision dans la conduite de l'EMA

46. Un diagramme de décision a été créé pour l'EMA afin d'offrir une assistance logique dans la conduite et l'interprétation des résultats du bioessai (voir le diagramme de décision dans le Graphique 3). Ce diagramme de décision accorde, par essence, une forte pondération aux observations relevées que sont le développement accéléré, asynchrone, ou l'histopathologie thyroïdienne, tandis que les autres observations susceptibles d'être également affectées par la toxicité générale, comme le retard de développement, la longueur museau-cloaque et le poids du corps humide sont caractérisés par une pondération moindre.

Figure 3.

Diagramme de décision dans la conduite de l'EMA



(*) Certaines autorités réglementaires peuvent réclamer une histologie, malgré l'observation de différences importantes dans le développement accéléré et asynchrone. L'organisme en charge de l'essai est invité à consulter les autorités compétentes avant le début des expériences, afin de déterminer les relevés d'observation requis.

Développement accéléré (évalué avec le stade de développement, la LMC et la longueur des pattes postérieures)

47. On sait que le développement accéléré est dû uniquement aux effets liés aux hormones thyroïdiennes. Parmi ces effets figurent ceux qui affectent les tissus périphériques, notamment dus à l'interaction directe avec les récepteurs des hormones thyroïdiennes (par exemple T4), ou ceux qui entraînent une altération des concentrations d'hormones thyroïdiennes en circulation. Chacun de ces cas est jugé suffisant pour conclure à une activité de la substance sur la thyroïde. Le développement accéléré est évalué de l'une ou l'autre manière suivante: soit le stade de développement général est déterminé en se basant sur l'approche standard détaillée par Nieuwkoop et Faber (8), soit les caractères morphologiques spécifiques peuvent être quantifiés, par exemple la longueur des pattes postérieures, aux jours 7 et 21, car ce critère réagit positivement aux activités agonistes sur les récepteurs des hormones thyroïdiennes. Si les statistiques dégagent une accélération significative du développement ou de la croissance des pattes postérieures, l'essai indique que la substance présente une activité sur la thyroïde.
48. L'évaluation d'un éventuel développement accéléré chez les animaux de l'essai par rapport à la population témoin se fonde sur les résultats des analyses statistiques menées sur les quatre relevés d'observations suivants:
- longueur des pattes postérieures (normalisée par la LMC) au jour 7 de l'étude
 - longueur des pattes postérieures (normalisée par la LMC) au jour 21 de l'étude
 - stade de développement au jour 7 de l'étude
 - stade de développement au jour 21 de l'étude
49. Les analyses statistiques portant sur la longueur des pattes postérieures exploitent les données relevées pour le membre postérieur gauche. La normalisation de la longueur des pattes postérieures se fait en calculant le rapport entre cette longueur et la longueur museau-cloaque pour chaque individu. Les moyennes des valeurs normalisées sont alors comparées. L'accélération du développement est alors signalée par une forte hausse de la moyenne des longueurs des pattes postérieures (normalisées) mesurées dans le groupe traité chimiquement, par rapport à celle du groupe témoin, au jour 7 et/ou 21 de l'étude (voir Appendice 3).
50. Les analyses statistiques du stade de développement sont effectuées avec les stades évalués conformément aux critères morphologiques décrits par Nieuwkoop et Faber (8). L'accélération du développement est caractérisée quand les analyses multi-quantiques détectent une forte hausse des valeurs du stade de développement dans le groupe traité chimiquement, par rapport à celles du groupe témoin, au jour 7 et/ou 21 de l'étude.
51. Dans la méthode de l'essai de métamorphose des amphibiens, un effet significatif observé sur l'un quelconque des quatre relevés d'observations mentionnés ci-dessus est considéré comme suffisant pour conclure à un développement accéléré. Ainsi, des effets significatifs sur la longueur des pattes postérieures relevés à un moment donné n'ont pas besoin d'être confirmés: ils n'impliquent pas nécessairement que la même tendance soit attestée lors de l'observation suivante, ni que le stade de développement soit affecté de la même manière, au même moment. De la même manière, les effets significatifs sur le stade de développement relevés à un moment donné n'ont pas besoin d'être confirmés: ils n'impliquent pas nécessairement que la même tendance soit attestée lors de l'autre observation, ni que la longueur des pattes postérieures soit affectée de la même manière, au même moment. Néanmoins, si des effets significatifs touchent plusieurs des observations rapportées, ils renforcent les preuves en faveur d'un développement accéléré.

Développement asynchrone (évalué avec le stade de développement)

52. Un développement asynchrone se caractérise par un décalage dans le rythme de morphogenèse ou de développement des différents tissus chez un même têtard. L'impossibilité d'établir clairement le stade de développement d'un individu en se basant sur la série d'observations morphologiques considérées comme typiques d'un stade donné indique que les tissus se développent de manière asynchrone, à travers la métamorphose. Un développement asynchrone est un signe d'activité sur la thyroïde. Les seuls modes d'action connus entraînant une telle asynchronie sont fondés sur les effets de produits chimiques sur l'action périphérique et/ou le métabolisme associés aux hormones thyroïdiennes dans les tissus en développement, comme on l'observe avec les inhibiteurs de la déiodinase.
53. L'évaluation du développement asynchrone chez les animaux inclus dans l'essai par rapport au groupe témoin s'appuie sur les examens morphologiques d'ensemble effectués sur les larves aux jours 7 et 21.
54. La description du développement normal des xénopes par Nieuwkoop et Faber (8) constitue le cadre permettant d'identifier l'ordre séquentiel du remodelage des tissus attendu. Le terme "développement

asynchrone" se rapporte spécifiquement aux déviations dans le développement morphologique général des têtards empêchant la détermination du stade de développement conformément aux références de Nieuwkoop et Faber (8), parce que les relevés morphologiques clés indiquent des stades différents.

55. Comme le suppose le terme "développement asynchrone", seuls les cas présentant des déviations de la progression du remodelage de tissus spécifiques par rapport au remodelage d'autres tissus sont pris en considération. Parmi les phénotypes classiques figurent le retard ou l'absence d'apparition des pattes antérieures, tandis que les tissus des pattes postérieures et de la queue se développent normalement ou de manière avancée, ou la résorption précoce des branchies par rapport au stade de morphogenèse des membres postérieurs et à la résorption de la queue. Un animal sera enregistré comme présentant un développement asynchrone s'il n'est pas possible de lui attribuer un stade dans la mesure où il ne répond pas à la majorité des critères de Nieuwkoop et Faber correspondants (8), ou si une ou plusieurs caractéristiques clés se montrent très retardées ou accélérées (par exemple queue complètement résorbée alors que les pattes antérieures ne sont pas apparues). Cette évaluation est d'ordre qualitatif, et intègre l'intégralité des caractéristiques répertoriées par Nieuwkoop et Faber (8). Il n'est toutefois pas nécessaire de consigner l'état de développement de chacun de ces critères caractéristiques chez les animaux observés. Les individus chez lesquels un développement asynchrone est diagnostiqué ne se voient pas attribuer de stade de développement au sens de Nieuwkoop et Faber (8).
56. Ainsi, un des critères principaux pour désigner les anomalies du développement morphologique comme "développement asynchrone" réside dans le décalage entre le rythme relatif au remodelage et à la morphogenèse des tissus, tandis que la morphologie des tissus affectés ne présente pas d'anomalies évidentes. À titre d'exemple de cette interprétation des anomalies morphologiques importantes, un retard dans la morphogenèse des pattes postérieures par rapport au développement des autres tissus suffira à conclure à un "développement asynchrone", contrairement aux cas d'absence de ces membres postérieurs, d'anomalies digitales (par exemple ectrodactylie, polydactylie) ou autres malformations des pattes évidentes.
57. Dans ce contexte, les principaux critères morphologiques à évaluer en termes d'avancée coordonnée de la métamorphose comprennent la morphogenèse des pattes postérieures et antérieures, l'apparition des pattes antérieures, le stade de résorption de la queue (en particulier la résorption de la nageoire caudale) et la morphologie de la tête (par exemple la taille des branchies et le stade où elles se résorbent, la morphologie de la mandibule, ou la protrusion du cartilage de Meckel).
58. Selon le mécanisme d'action de la substance chimique, différents phénotypes morphologiques importants sont susceptibles d'apparaître. Parmi les phénotypes classiques, on compte le retard ou l'absence d'apparition des pattes antérieures, malgré un développement normal voire accéléré des membres postérieurs et des tissus de la queue, ainsi que la résorption précoce des branchies par rapport aux pattes postérieures et au remodelage de la queue.

Histopathologie

59. Si le produit chimique ne présente pas de toxicité manifeste et n'entraîne pas d'accélération ou d'asynchronie du développement, l'histopathologie de la glande thyroïde est alors étudiée, à l'aide du document d'orientation approprié (9). En l'absence de toxicité, le retard de développement est un indicateur fort d'activité anti-thyroïdienne. Cependant, l'étude du stade de développement est moins sensible et permet moins d'établir un diagnostic que les analyses histopathologiques de la glande thyroïde. Dans ce cas, ces analyses sont donc requises. Des effets sur l'histologie des glandes thyroïdes ont été démontrés, même lorsque le développement demeure normal. Si des changements sur l'histopathologie de la thyroïde sont observés, la substance chimique est alors considérée comme présentant une activité sur la thyroïde. Inversement, si les glandes thyroïdes ne souffrent d'aucune lésion histologique et qu'il n'y a pas de retard de développement, le produit chimique est considéré comme inactif sur la thyroïde. La raison de cette distinction repose sur le fait que la thyroïde est sous l'influence de la HST (hormone de stimulation thyroïdienne), si bien que toute substance chimique altérant suffisamment la circulation des hormones thyroïdiennes pour affecter la sécrétion de HST entraîne alors des modifications histopathologiques dans les glandes thyroïdes. Divers mécanismes et modes d'action sont susceptibles de réduire la circulation des hormones thyroïdiennes. Ainsi, même si la concentration des hormones thyroïdiennes représente une indication de l'effet sur la thyroïde, cet élément ne suffit pas à préciser le mécanisme ou le mode d'action associé à la réponse.
60. Ces effets mesurés sur la glande thyroïde ne se prêtant pas aux approches statistiques de base, la détermination d'un effet consécutif à une exposition chimique s'appuie sur l'expertise d'un pathologiste.

Retard de développement (évalué avec le stade de développement, la longueur des pattes postérieures, le poids corporel et la LMC)

61. Des retards de développement peuvent apparaître du fait de mécanismes anti-thyroïdiens ou d'une toxicité indirecte. De légers retards de développement associés à des signes importants de toxicité indiquent probablement un effet toxique non spécifique. L'évaluation de la toxicité non liée à la thyroïde constitue un

élément primordial de l'essai, afin de diminuer la probabilité d'apparition de faux positifs. Une mortalité excessive est un signe évident que d'autres mécanismes toxiques entrent en jeu. De la même manière, de légers retards de croissance, évalués au moyen du poids humide et/ou de la LMC, suggèrent également une toxicité non liée à la thyroïde. Une augmentation apparente de la croissance est souvent observée avec les substances chimiques qui perturbent le développement normal. La présence d'animaux plus développés n'indique donc pas nécessairement une toxicité non thyroïdienne. En revanche, la croissance n'est pas le seul élément étayant la détermination de la toxicité sur la thyroïde. Elle est plutôt associée au stade de développement et à l'histopathologie de la thyroïde afin de juger de l'activité sur la thyroïde. D'autres observations sont prises en compte pour déterminer la toxicité manifeste, y compris les œdèmes, les lésions hémorragiques, la léthargie, une baisse de la consommation de nourriture, une nage erratique/altérée, etc. Si une toxicité manifeste se déclare pour toutes les concentrations testées, il convient de réévaluer la substance d'essai dans une fourchette de concentrations plus basse avant de conclure à une éventuelle activité sur la thyroïde.

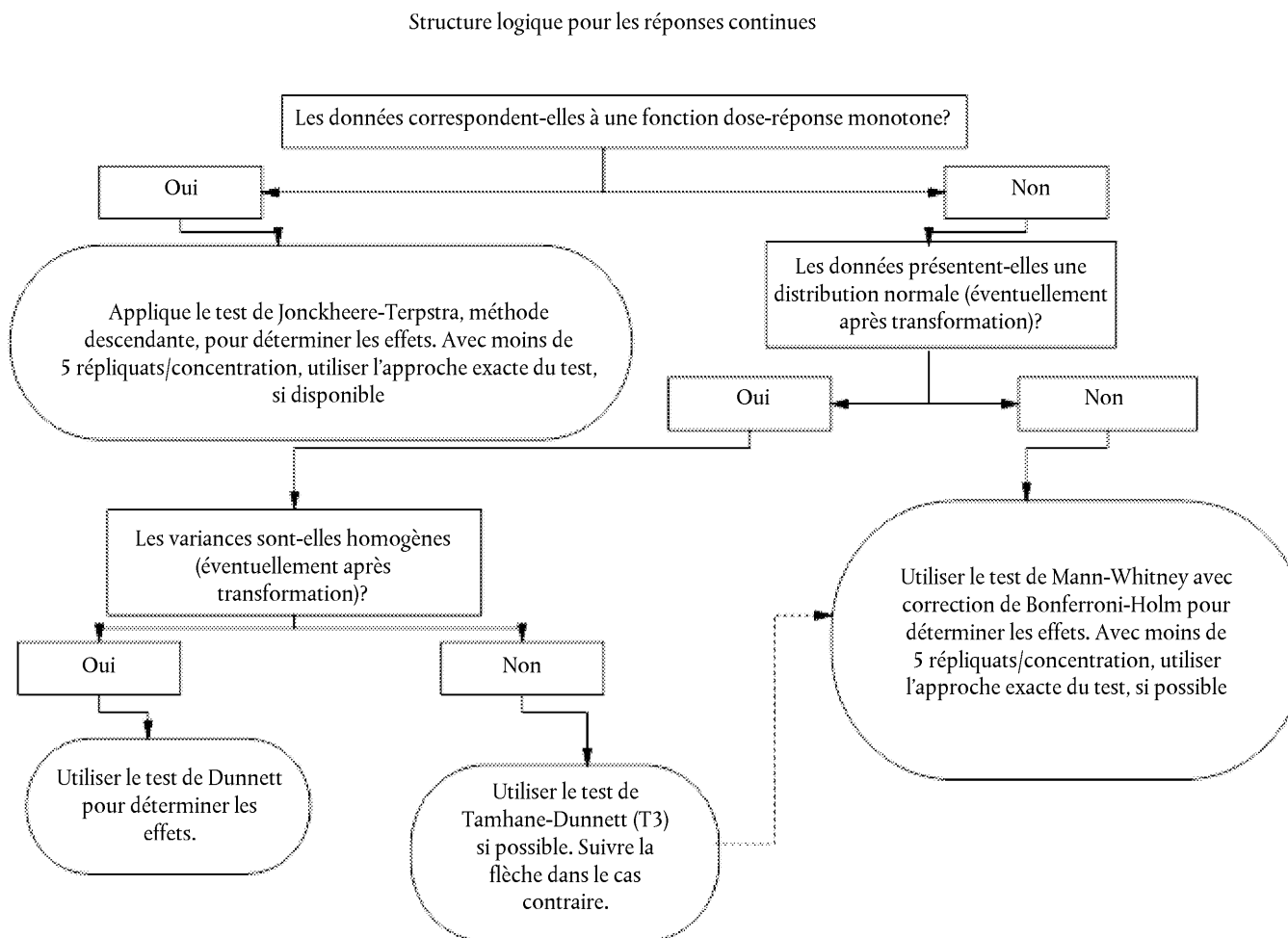
62. En l'absence de signes de toxicité manifeste, les retards de développement statistiquement significatifs indiquent que le produit chimique est actif sur la thyroïde (par un mécanisme antagoniste). En outre, s'il n'existe pas de réponse statistiquement marquée, cette observation peut être complétée par les résultats de l'histopathologie de la thyroïde.

Analyses statistiques

63. Il est préférable d'effectuer ces analyses statistiques en suivant les procédures décrites dans le document intitulé *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (11). En ce qui concerne l'ensemble des paramètres d'évaluation quantitatifs et continus (longueur des pattes postérieures, LMC, poids humide) correspondant à une fonction dose-réponse monotone, il convient d'appliquer le test de Jonckheere — Terpstra par méthode descendante afin de dégager un effet significatif du traitement.
64. Pour les paramètres d'évaluation continus ne correspondant pas à une fonction dose-réponse monotone, les données sont examinées en termes de normalité (de préférence avec les tests de Shapiro — Wilk ou d'Anderson — Darling) et d'homogénéité de la variance (en priorité avec le test de Levene). Les deux tests utilisent les données résiduelles d'une ANOVA. S'il est possible de substituer les jugements d'un expert à ces tests formels de normalité et d'homogénéité de la variance, ces derniers demeurent toutefois préférables. En cas de non-normalité ou d'hétérogénéité de la variance, une transformation visant à normaliser les données et stabiliser la variance est recherchée. Si les valeurs (éventuellement après transformation) présentent une distribution normale avec une variance homogène, le test de Dunnett permet de dégager les effets significatifs du traitement. Si les valeurs (éventuellement après transformation) présentent une distribution normale avec une variance hétérogène, les effets significatifs du traitement sont déterminés grâce au test de Tamhane — Dunnett, ou au test T3, ou encore avec le test U de Mann — Whitney — Wilcoxon. Dans le cas où aucune transformation visant à normaliser les données n'a été trouvée, les effets significatifs du traitement sont déterminés avec le test U de Mann — Whitney — Wilcoxon après corrections des p-valeurs selon la méthode Bonferroni — Holm. Le test de Dunnett s'applique indépendamment du test F de l'ANOVA, et le test Mann — Whitney est indépendant de tout test de Kruskal — Wallis global.
65. Aucune mortalité significative n'est attendue, néanmoins il convient de l'évaluer par méthode descendante avec le test de Cochran — Armitage lorsque les données se traduisent par une fonction dose-réponse monotone; dans les autres cas, c'est le test exact de Fisher avec correction de Bonferroni — Holm qui est appliqué.
66. Un éventuel effet significatif du traitement sur le stade de développement est évalué par méthode descendante au moyen du test de Jonckheere — Terpstra sur les médianes des répliquats. Une autre technique pour dégager un tel effet consiste à recourir à des analyses multi-quantiques avec le test de Jonckheere en se basant sur les résultats compris entre les 20^e et 80^e percentiles; comme cette méthode prend en compte des changements dans le profil de distribution, elle est préférable aux autres.
67. L'unité d'analyse correcte est le répliquat: ainsi, le test de Jonckheere — Terpstra ou le test U de Mann — Whitney exploitent les médianes des répliquats, tandis que le test de Dunnett analyse les moyennes des répliquats. Il est possible d'évaluer visuellement le caractère monotone de la fonction dose-réponse en examinant les moyennes ou médianes des répliquats et des traitements, ou bien par le biais de tests formels tels que ceux décrits précédemment (11). Si le nombre de répliquats par traitement ou pour les témoins est inférieur à cinq, il convient d'employer une approche fondée sur des permutations exactes, des tests de Jonckheere — Terpstra et Mann — Whitney, dans la mesure du possible. Pour tous les tests cités, on conclut à la significativité statistique au-dessus de 0,05.
68. La Figure 4 présente la structure logique d'exécution des tests statistiques sur les données continues.

Figure 4.

Structure logique de l'approche statistique pour le traitement des données de réponse continues.



Considérations particulières pour l'analyse des données

Utilisation des traitements compromis

69. Plusieurs facteurs entrent en jeu pour déterminer si un répliquat ou l'intégralité d'un traitement présentent une toxicité manifeste et s'il convient alors de les exclure de l'analyse. Une toxicité manifeste se caractérise par une mortalité supérieure à deux individus dans un répliquat, mortalité qui ne saurait être imputable à une erreur technique, et s'explique donc par la toxicité. Parmi les signes supplémentaires de toxicité manifeste figurent l'hémorragie, les comportements anormaux, les nages anormales, l'anorexie ainsi que tout autre signe clinique de maladie. Des évaluations qualitatives s'avèrent parfois nécessaires pour les signes de toxicité sous-létale, toujours par rapport au groupe témoin dans l'eau pure.

Témoins associés au solvant

70. Un solvant n'est employé qu'en dernier ressort, après avoir considéré toutes les autres solutions de transport du produit chimique. Si l'option du solvant est néanmoins retenue, il est impératif de mettre en place conjointement un témoin constitué d'eau pure. À la clôture de l'essai, les effets potentiels du solvant font l'objet d'une évaluation. Pour cela, les résultats correspondant au groupe témoin du solvant sont comparés à ceux du groupe témoin de l'eau pure. Les relevés d'observation les plus pertinents dans ce cadre sont le stade de développement, la LMC et le poids humide, puisque ces relevés sont sensibles aux toxicités non thyroïdiennes. Si des différences statistiquement significatives entre les groupes témoins solvant et eau pure se dégagent sur ces relevés, il convient de déterminer les effets correspondants aux relevés d'observation en se fondant sur les observations relevées chez les témoins dans l'eau pure. Si, à l'inverse, il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes pour l'ensemble des observations relevées, les effets se fondent sur les observations relevées à la fois chez les témoins correspondant à l'eau de dilution et au solvant.

Groupes de traitement atteignant un stade de développement supérieur ou égal à 60

71. Au-delà du stade 60, le poids et la taille des têtards diminuent du fait de la résorption des tissus et de la baisse de leur masse d'eau en valeur absolue. Aussi les mesures du poids humide et de la LMC ne sont-elles plus appropriées aux analyses statistiques des différences de vitesse de croissance. Les valeurs du poids humide et de la longueur des animaux à un stade NF supérieur à 60 sont donc censurées et exclues des analyses des moyennes et des médianes des répliquats. Deux approches différentes sont envisageables pour analyser les paramètres de croissance.
72. L'une d'elle consiste à ne prendre en compte que les têtards à un stade de développement inférieur ou égal à 60 pour les analyses statistiques du poids humide et/ou de la LMC. Cette approche est supposée apporter des informations suffisamment solides sur la sévérité des éventuels effets sur la croissance, à condition que la proportion d'animaux exclus de l'analyse demeure limitée 20 %. Si un nombre plus important de têtards se caractérisent par un stade de développement dépassant 60 (≥ 20 %) dans une ou plusieurs concentrations nominales, il convient d'effectuer une ANOVA à deux facteurs intégrant une structure de variance sous-jacente pour évaluer les effets sur la croissance dus aux traitements chimiques sur l'ensemble des individus, tout en prenant en compte l'effet du stade de développement avancé sur la croissance. L'annexe 3 propose des orientations concernant l'ANOVA à deux facteurs (poids et longueur)..

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2007) Final report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 — Optimisation of the Test Protocol. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. N° 76, Paris.
- (2) OCDE (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 — Multi-chemical Interlaboratory Study. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. N° 76. Paris
- (3) OCDE (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. No 92. Paris
- (4) OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. No 23. Paris

- (5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729- 96(2002), Philadelphie, PA
 - (6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay — Xenopus (FETAX). E 1439-98
 - (7) Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. & Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. *Chemosphere* 39, pp. 539-551
 - (8) Nieuwkoop,P.D. & Faber,J. (1994) Normal Table of *Xenopus laevis*. Garland Publishing, New York
 - (9) OCDE (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. No 82. Paris
 - (10) Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599
 - (11) OCDE (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. No 54. Paris
 - (12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Rapport. Aquatic Toxicology*, 76; pp. 69-92.
-

Appendice 1

Tableau 1

Conditions expérimentales de l'essai de métamorphose des amphibiens sur 21 jours.

Animaux d'essai	Larves de <i>Xenopus laevis</i>	
Stade larvaire initial	Stade 51 selon Nieuwkoop et Faber	
Durée d'exposition	21 jours	
Critères de sélection des larves	stade de développement et longueur totale (optionnelle)	
Concentrations d'essai	Minimum de 3 concentrations s'étendant sur environ une unité de l'ordre de grandeur	
Régime d'exposition	Avec écoulement continu (de préférence) et/ou renouvellement statique	
Vitesse d'écoulement dans le système d'essai	25 ml/min (renouvellement complet du volume environ toutes les 2,7 h)	
Principales observations rapportées — Calendrier des relevés	Mortalité	Quotidiennement
	Stade de développement	J7 et 21
	Longueur des pattes postérieures	J7 et 21
	Longueur museau-cloaque	J7 et 21
	Poids du corps humide	J7 et 21
	Histologie de la thyroïde	J21
Eau de dilution — Témoin du laboratoire	Eau du robinet déchlorée (filtrée sur charbon) ou source équivalente issue du laboratoire	
Densité de larves	20 larves/récipient d'essai (5/l)	
Solution d'essai/Récipient d'essai	4 - 10 l (10 - 15 cm d'eau minimum)/récipient d'essai en verre ou en acier inoxydable (p. ex. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Réplication	4 récipients d'essai répliqués par concentration d'essai et témoin	
Taux de mortalité admis chez les témoins	≤ 10 % par récipient d'essai répliqué	
Fixation thyroïdienne	Nombre d'individus concernés	Tous les têtards (5/répliquat évalués initialement)
	Région	Tête ou corps entier
	Fluide de fixation	Fixateur de Davidson

Alimentation	Nourriture	Sera Micron® ou équivalent
	Quantité — Fréquence	Consulter le tableau 1 présentant le régime alimentaire adapté à l'emploi de Sera Micron®
Éclairage	Période d'exposition lumineuse	12 h de lumière pour 12 h d'obscurité
	Intensité	600 à 2 000 lux (mesurée à la surface de l'eau)
Température de l'eau		22 ± 1 °C
pH		6,5 – 8,5
Concentration d'oxygène dissous (OD)		> 3,5 mg/l (> 40 % de la saturation de l'air)
Calendrier d'échantillonnage pour les analyses chimiques		Une fois par semaine (4 échantillonnages/essai)

Appendice 2

Tableau pour le rapport des données brutes et résumées

Tableau 1

Informations générales sur la substance chimique d'essai

Informations sur la substance chimique chimique		
Entrer la substance chimique, les unités de concentration et les traitements		
Substance chimique d'essai:		
Unités de concentration		
Traitement 1		
Traitement 2		
Traitement 3		
Traitement 4		
Date (jour 0):		Entrer la date (jj/mm/aa)
Date (jour 7):		Entrer la date (jj/mm/aa)
Date (jour 21):		Entrer la date (jj/mm/aa)

Tableau 2

Feuille de collecte des données brutes pour les jours 7 et 21.

JOUR X

DATE 00/00/00

	Concentration	Numéro du traitement	Numéro du répliquat	Numéro de l'individu	Identifiant de l'individu	Stade de développement	Longueur LMC (mm)	Longueur des pattes postérieures (mm)	Poids du corps humide (mg)
ROW	TRT	TRT	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							

	Concentration	Numéro du traitement	Numéro du répliquat	Numéro de l'individu	Identifiant de l'individu	Stade de développement	Longueur LMC (mm)	Longueur des pattes postérieures (mm)	Poids du corps humide (mg)
ROW	TRT	TRT	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							

	Concentration	Numéro du traitement	Numéro du répliquat	Numéro de l'individu	Identifiant de l'individu	Stade de développement	Longueur LMC (mm)	Longueur des pattes postérieures (mm)	Poids du corps humide (mg)
ROW	TRT	TRT	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
33	0,00	2							
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							
59	0,00	3							
60	0,00	3							

	Concentration	Numéro du traitement	Numéro du répliquat	Numéro de l'individu	Identifiant de l'individu	Stade de développement	Longueur LMC (mm)	Longueur des pattes postérieures (mm)	Poids du corps humide (mg)
ROW	TRT	TRT	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

Tableau 3

Valeurs résumées calculées pour les observations des jours 7 et 21

TRT	REP	Stade de développement			LMC (mm)		Longueur des pattes postérieures (mm)		Poids (mg)	
		MIN	MEDIA-NE	MAX	MOYEN-NE	ECART TYPE	MOYEN-NE	ECART TYPE	MOYEN-NE	ECART TYPE
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Note: les calculs effectués sont normalement associés avec les données entrées dans le tableau 2.

Tableau 4

Données de mortalité quotidienne

Jour	Date	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Value!																
2	#Value!																
3	#Value!																
4	#Value!																
5	#Value!																
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Somme répliquat		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Somme traitement		0				0				0				0			

Note: les calculs effectués sont normalement associés avec les données entrées dans le tableau 1.

Tableau 5

Critères de qualité de l'eau

Système d'exposition (flux continu/renouvellement statique):

Température:

Intensité lumineuse:

Cycle jour-nuit:

Nourriture:

Fréquence de l'alimentation:

pH de l'eau:

Concentration d'iode dans la solution d'essai:

Tableau 6

Résumé des données de chimie.

Nom de la substance chimique

CAS:

[illegible]

Nom de la substance chimique																							
# CAS:																							
Jour	Date	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
6	#Value!																						
7	#Value!																						
8	#Value!																						
9	#Value!																						
10	#Value!																						
11	#Value!																						
12	#Value!																						
13	#Value!																						
14	#Value!																						
15	#Value!																						
16	#Value!																						
17	#Value!																						
18	#Value!																						
19	#Value!																						
20	#Value!																						
21	#Value!																						

Note: les calculs effectués sont normalement associés avec les données entrées dans le tableau 1.

Tableau 7

Tableau de rapport des critères essentiels utilisés en histopathologie

Date:

Substance chimique:

Pathologiste:

ID Animal témoin — répliquat 1			Hypertrophie de la glande thyroïde
			Atrophie de la glande thyroïde
			Hypertrophie des cellules folliculaires
			Hyperplasie des cellules folliculaires
ID Animal témoin — répliquat 2			
Total:			

Dose Animal ID — répliquat 1			Hypertrophie de la glande thyroïde
			Atrophie de la glande thyroïde
			Hypertrophie des cellules folliculaires
			Hyperplasie des cellules folliculaires
Dose Animal ID — répliquat 2			
Total:			

Dose Animal ID — répliquat 1			Hypertrophie de la glande thyroïde
			Atrophie de la glande thyroïde
			Hypertrophie des cellules folliculaires
			Hyperplasie des cellules folliculaires
Dose Animal ID — répliquat 2			
Total:			

Dose Animal ID — répliquat 1			Hypertrophie de la glande thyroïde
			Atrophie de la glande thyroïde
			Hypertrophie des cellules folliculaires
			Hyperplasie des cellules folliculaires
Dose Animal ID — répliquat 2			
Total:			

Tableau 8

Critères supplémentaires utilisés en histopathologie

Date:

Substance chimique:

Pathologiste:

		Augmentation de la surface de la lumière folliculaire	Diminution de la surface de la lumière folliculaire
Animal témoin ID — répliquat 1			
Animal témoin ID — répliquat 2			
Total:			

		Augmentation de la surface de la lumière folliculaire	Diminution de la surface de la lumière folliculaire
Dose Animal ID — répliquat 1			
Dose Animal ID — répliquat 2			
Total:			

		Augmentation de la surface de la lumière folliculaire	Diminution de la surface de la lumière folliculaire
Dose Animal ID — répliquat 1			
Dose Animal ID — répliquat 2			
Total:			

		Augmentation de la surface de la lumière folliculaire	Diminution de la surface de la lumière folliculaire
Dose Animal ID — répliquat 1			
Dose Animal ID — répliquat 2			
Total:			

Tableau 9

Description narrative des observations histopathologiques

Date:

Substance chimique:

Pathologiste:

Description narrative		
Animal témoin ID — répliquat 1		
Animal témoin ID — répliquat 2		
Dose Animal ID — répliquat 1		
Dose Animal ID — répliquat 2		

Dose Animal ID — répliquat 1		
Dose Animal ID — répliquat 2		

Dose Animal ID — répliquat 1		
Dose Animal ID — répliquat 2		

Tableau 10

Tableau de rapport des données résumées pour le jour J (7 ou 21) de l’EMA

		Témoïn				Traitement 1					Traitement 2					Traitement 3				
Observation	Répliquat	Moye- nne	Ec. Type	CV	N	Moye- nne	Ec. Type	CV	N	p-value	Moye- nne	Ec. Type	CV	N	p-value	Moye- nne	Ec. Type	CV	N	p-value
Longueur des pattes posté- rieures (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Moyenn- e:																			
LMC (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Moyenn- e:																			
Poids humide (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Moyenn- e:																			

Tableau 11

Tableau de rapport des données de stade de développement résumées pour le jour J (7 ou 21) de l'EMA.

		Témoin				Traitement 1					Traitement 2					Traitement 3				
	Répliquat	Médiane	Min	Max	N	Médiane	Min	Max	N	p-value	Médiane	Min	Max	N	p-value	Médiane	Min	Max	Médiane	p-value
Stade de développement	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Moyenn-e:																			

Appendice 3

Autres méthodes d'analyse du poids et de la longueur dans le cas où un stade de développement avancé concerne plus de 20 % des têtards dans une ou plusieurs concentrations

Si un nombre plus important de têtards se caractérisent par un stade de développement dépassant 60 (≥ 20 %) dans une ou plusieurs concentrations nominales, il convient d'effectuer une ANOVA à deux facteurs intégrant une structure de variance sous-jacente pour évaluer les effets sur la croissance dus aux traitements chimiques sur l'ensemble des individus, tout en prenant en compte l'effet du stade de développement avancé sur la croissance.

Il s'agit là d'exploiter l'intégralité des données, mais de prendre en compte l'effet du stade de développement avancé. À cette fin, il est possible de recourir à une ANOVA à deux facteurs intégrant une structure de variance sous-jacente. Ainsi, le critère Stade avancé = OUI concerne tout animal présentant un stade de développement supérieur ou égal à 61. Dans le cas contraire, le critère est défini par Stade avancé = NON. L'ANOVA à deux facteurs concernant les interactions entre la concentration et le Stade avancé est ainsi rendue possible, avec rep(Conc) comme facteur aléatoire et Têtard(rep) comme effet aléatoire. Cette méthode traite toujours le répliquat comme unité d'analyse, et fournit essentiellement les mêmes résultats qu'une analyse des moyennes rep*Stade avancé, pondérée par le nombre d'animaux par moyenne. Si les données ne répondent pas à l'exigence de normalité et d'homogénéité de la variance posée par une ANOVA, une transformation par rang normalisée peut être effectuée pour résoudre le problème.

En plus du test F classique de l'ANOVA sur les effets des Conc, Stade avancé et leurs interactions, le test F d'interaction peut être scindé en deux tests F d'ANOVA, l'un d'entre eux traitant les réponses moyennes obtenues sur l'ensemble des concentrations avec le critère Stade avancé = NON, tandis que le second se fonde sur les réponses moyennes relevées pour toutes les concentrations correspondant à Stade avancé = OUI. De plus amples comparaisons entre les moyennes des divers traitements par rapport au témoin sont menées au sein de chaque groupe défini par le critère Stade avancé. Une analyse tendancielle peut être effectuée en employant les contrastes appropriés ou une simple comparaison par paires, si la fonction dose-réponse se révèle non monotone chez un des groupes caractérisés par le critère Stade avancé. Une correction des p-valeurs selon Bonferroni — Holm n'est requise que lorsque la partie du test F correspondante n'est pas significative. Ces opérations sont prises en charge par SAS, et probablement d'autres logiciels statistiques. Des complications peuvent survenir si certaines concentrations ne comptent aucun animal présentant un stade de développement avancé, cependant ces situations peuvent être résolues simplement.

*Appendice 4***Définitions**

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

C.39. ESSAI DE REPRODUCTION DE COLLEMBOLS DANS LE SOL

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 232 (2009) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La présente méthode d'essai est destinée à évaluer les effets des substances chimiques sur la reproduction des collembolles dans le sol. Elle est fondée sur les procédures existantes (1) (2). *Folsomia candida*, qui se reproduit par parthénogénèse, et *Folsomia fimetaria*, dont la reproduction est sexuée, sont deux des espèces de collembolles les plus répandues, qu'il est possible d'élever et qui sont disponibles dans le commerce. Lorsque des habitats spécifiques où ni l'une ni l'autre de ces espèces ne sont présentes sont évalués, la procédure peut également être étendue à d'autres espèces de collembolles dès lors qu'elles peuvent satisfaire aux critères de validité de l'essai.
2. Les collembolles, qui peuplent les sols, sont des espèces écologiquement pertinentes pour les essais d'écotoxicité. Les collembolles sont des hexapodes possédant un exosquelette extrêmement perméable à l'air et à l'eau, et constituent des espèces d'arthropodes caractérisées par une autre voie et un autre taux d'exposition que les vers de terre et les enchytréides.
3. Les densités des populations de collembolles atteignent communément 10^5 m^{-2} dans le sol et la litière feuillue dans beaucoup d'écosystèmes terrestres (3) (4). Les adultes mesurent généralement de 0,5 à 5 mm et leur contribution à la biomasse animale totale présente dans le sol et à la respiration totale du sol se situe d'après les estimations dans une fourchette de 1 % à 5 % (5). Ils pourraient donc jouer principalement le rôle de régulateurs potentiels des processus écologiques en s'alimentant de microorganismes comme au travers de la prédation de la microfaune. Les collembolles sont les prédateurs d'un vaste éventail d'invertébrés endogés et épigés, tels que les acariens, les millepattes, les araignées, les coléoptères carabidés et les staphylins. Les collembolles contribuent aux processus de décomposition dans les sols acides où ils peuvent être, avec les enchytréides, les principaux invertébrés présents dans le sol, puisque les vers de terre et les diplopodes en sont généralement absents.
4. *F. fimetaria* a une répartition mondiale et est commun dans plusieurs types de sols, depuis les sols sableux jusqu'aux sols limoneux et depuis les mulls jusqu'aux mors. C'est un collembolle dépourvu d'yeux et de pigmentation. Il a été observé dans les sols agricoles de toute l'Europe (6). Il a un régime alimentaire omnivore composé de filaments de mycélium, de bactéries, de protozoaires et de détritiques. Il interagit au travers du broutage avec les infections imputables aux champignons pathogènes des végétaux (7) et pourrait exercer une influence sur les mycorhizes, à l'instar de *F. candida*, dont on sait que tel est le cas. Comme la plupart des espèces de collembolles, il se reproduit sexuellement, aussi la présence permanente de mâles est-elle indispensable pour la fécondation des œufs.
5. *F. candida* a également une répartition mondiale. Bien qu'il soit commun dans la plupart des sols naturels, on le rencontre souvent en de très nombreux endroits riches en humus. C'est un collembolle dépourvu d'yeux et de pigmentation. Doté d'une furca (organe de saut) bien développée, il court vivement et s'empresse de bondir s'il est dérangé. Le rôle écologique de *F. candida* est similaire à celui de *F. fimetaria*, mais ses habitats sont constitués de sols organiques plus riches. Il se reproduit par parthénogénèse. La proportion de mâles peut être inférieure à 1 pour mille.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Des collembolles synchrones, adultes (*F. fimetaria*) ou juvéniles (*F. candida*), sont exposés à une gamme de concentrations de la substance chimique d'essai mélangée à un sol artificiel modifié (8) comportant une teneur en matières organiques de 5 % (ou à un sol de remplacement). On peut distinguer deux étapes dans la procédure d'essai:
 - un essai préliminaire de détermination des concentrations, si des informations sur la toxicité manquent, dans lequel la mortalité et la reproduction sont les principaux paramètres évalués après 2 semaines pour *F. fimetaria* et 3 semaines pour *F. candida*
 - l'essai de reproduction proprement dit dans lequel on évalue le nombre total de juvéniles produits par animal parent et la survie des animaux parents. La durée de l'essai proprement dit est de 3 semaines pour *F. fimetaria* ou de 4 semaines pour *F. candida*.

L'effet toxique de la substance chimique d'essai sur la mortalité et le taux de reproduction des adultes est mesuré par les valeurs CL_x et CE_x , les données étant ajustées à un modèle approprié au moyen d'une régression non linéaire en vue d'estimer la concentration qui entraînerait x % de mortalité ou de réduction du taux de reproduction, respectivement, ou encore par celle de la CSEO/CME0 (9).

INFORMATION SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

7. Il est préférable de connaître les propriétés physiques, l'hydrosolubilité, le log K_{oe} , le coefficient de partage entre l'eau et le sol et la pression de vapeur de la substance chimique d'essai. Des informations supplémentaires sur le devenir de la substance d'essai dans le sol, notamment sa vitesse de photolyse, d'hydrolyse et de dégradation biotique, seraient souhaitables. L'identification chimique de la substance d'essai selon la nomenclature de l'IUPAC, le numéro CAS, le lot de fabrication, le lot de conditionnement, la formule structurale et le degré de pureté devraient également être consignés si ces informations sont disponibles.
8. La présente méthode d'essai convient à l'essai de substances chimiques hydrosolubles ou insolubles; néanmoins, le mode d'application de la substance d'essai variera en conséquence. Cette méthode d'essai n'est pas applicable aux substances volatiles, c'est-à-dire aux substances chimiques pour lesquelles la constante de Henry ou le coefficient de partage air/eau est supérieur à un, ou celles pour lesquelles la pression de vapeur dépasse 0,0133 Pa à 25 °C.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

9. Les témoins non traités devraient satisfaire aux critères suivants pour que le résultat de l'essai soit considéré comme valide:
 - la mortalité moyenne des adultes n'excède pas 20 % à la fin de l'essai;
 - le nombre moyen de juvéniles par récipient est au moins égal à 100 à la fin de l'essai;
 - le coefficient de variation calculé pour le nombre de juvéniles est inférieur à 30 % à la fin de l'essai proprement dit.

SUBSTANCE CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

10. Une substance chimique de référence est testée à sa concentration efficace à 50 % (CE_{50}) pour le type de sol d'essai choisi, soit à intervalles réguliers, soit dans tous les essais, afin de vérifier que la réponse des organismes d'essai dans le système expérimental demeure de niveau normal. L'acide borique, qui devrait réduire de 50 % la reproduction de l'une et l'autre espèces (10) (11) à environ 100 mg/kg de sol en poids sec, est une substance de référence appropriée.

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Récipients expérimentaux et matériel

11. Les récipients expérimentaux peuvent contenir 30 g de sol humide. Le matériau est constitué de verre ou de plastique inerte (non toxique). Cependant, l'utilisation de récipients en plastique est évitée si l'exposition à la substance chimique d'essai est diminuée du fait de la sorption. Les récipients expérimentaux ont une surface horizontale telle qu'ils puissent contenir des échantillons de sol d'une profondeur effective de 2 à 4 cm. Les récipients sont munis de couvercles (en verre ou en polyéthylène, par exemple) afin de réduire l'évaporation de l'eau, tout en autorisant les échanges gazeux entre le sol et l'atmosphère. Les récipients sont au moins partiellement transparents afin de permettre le passage de la lumière.
12. Cet essai requiert du matériel de laboratoire courant, en particulier:
 - armoire à séchage;
 - stéréomicroscope;
 - pH-mètre et luxmètre;
 - balances suffisamment précises;
 - instruments appropriés permettant de réguler la température;
 - instruments permettant de contrôler l'humidité de l'air (facultatifs si les récipients expérimentaux sont fermés par des couvercles);
 - incubateur ou petite chambre à température contrôlée;
 - pinces ou appareil d'aspiration de faible puissance.

Préparation du sol d'essai

13. Un sol artificiel modifié (8) contenant 5 % de matière organique est utilisé pour l'essai. Un sol naturel peut également être utilisé, étant donné que le sol artificiel ne ressemble pas aux sols naturels. La composition recommandée du sol artificiel est la suivante (en poids secs, séchés à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant):
- 5 % de tourbe à sphaigne, séchée à l'air et finement broyée (une dimension des particules de 2 +/- 1 mm est acceptable);
 - 20 % d'argile kaolinique (taux de kaolinite de préférence supérieur à 30 %);
 - environ 74 % de sable industriel séché à l'air (selon la quantité de CaCO_3 nécessaire), essentiellement du sable fin contenant plus de 50 % de particules mesurant entre 50 et 200 microns. La quantité exacte de sable dépend de la quantité de CaCO_3 (voir ci-dessous), la part conjointe de ces deux éléments devant atteindre 75 %;
 - 1,0 % de carbonate de calcium (CaCO_3 , pulvérisé, qualité analytique) afin d'obtenir un pH de $6,0 \pm 0,5$; la quantité de carbonate de calcium à ajouter dépend principalement de la qualité et de la nature de la tourbe (voir note 1).

Note 1: La quantité de CaCO_3 requise dépend des composants du substrat de sol et est déterminée par mesure du pH des sous-échantillons de sol humide préincubé immédiatement avant l'essai.

Note 2: Il est recommandé de mesurer le pH et de manière facultative le rapport C/N, la capacité d'échange de cations (CEC) et la teneur en matières organiques du sol en vue de permettre une normalisation ultérieure et une meilleure interprétation des résultats.

Note 3: Si besoin est, par exemple à des fins d'essai spécifiques, des sols naturels provenant de sites non pollués peuvent également servir de substrat d'essai et/ou de culture. Toutefois, lorsque l'on utilise un sol naturel, il faut le caractériser au moins par son origine (site de récolte), son pH, sa texture (distribution de tailles de particules) sa CEC et sa teneur en matières organiques, et il doit être exempt de toute contamination. Pour ce qui est des sols naturels, il convient de démontrer qu'ils sont adaptés à la réalisation d'un essai et qu'ils permettent de répondre aux critères de validité de l'essai.

14. Les constituants secs du sol sont soigneusement mélangés (par exemple, dans un grand mélangeur de laboratoire). La capacité de rétention d'eau (CRE) maximale du sol artificiel est déterminée conformément aux protocoles décrits dans l'Appendice 5. La teneur en humidité du sol d'essai est optimisée de sorte à lui donner une structure meuble et poreuse qui permette aux collemboles de pénétrer dans les pores. Tel est généralement le cas entre 40 et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau.
15. Le sol artificiel sec est préhumidifié par l'ajout d'une quantité suffisante d'eau désionisée pour atteindre environ la moitié de sa teneur en eau finale 2 à 7 jours avant le début de l'essai, pour que l'acidité s'équilibre/se stabilise. Le pH est déterminé avec un mélange de sol et d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M ou de chlorure de calcium (CaCl_2) 0,01 M dans un rapport 1/5 (voir Appendice 6). Si l'acidité du sol est supérieure à la limite requise, elle peut être ajustée par addition d'une quantité appropriée de CaCO_3 . Si le sol est trop alcalin, il peut être rééquilibré par l'ajout d'un acide inorganique sans danger pour les collemboles.
16. Le sol préhumidifié est divisé en autant de portions que de concentrations expérimentales, de témoins et de substances chimiques de référence utilisés dans l'essai. Les substances chimiques d'essai sont ajoutées et la teneur en eau est régulée comme indiqué au paragraphe 24.

Sélection et préparation des animaux d'essai

17. *F. candida*, qui est parthénogénétique, est l'espèce recommandée parce que dans l'essai circulaire de la méthode d'essai (11), le critère de validité relatif à la survie a été rempli plus souvent avec cette espèce qu'avec *F. fimetaria*. Si une espèce alternative est utilisée, il faut qu'elle remplisse les critères de validité mentionnés au paragraphe 9. Au début de l'essai les animaux sont bien nourris et âgés de 23 à 26 jours dans le cas de *F. fimetaria* et de 9 à 12 jours dans celui de *F. candida*. Pour chaque expérience identique, le nombre de *F. fimetaria* est de 10 mâles et 10 femelles, et pour ce qui est de *F. candida* 10 femelles sont utilisées (voir Appendices 2 et 3). Pour chacun des lots ajoutés à une expérience identique, les animaux synchrones sont tirés au hasard des récipients et leur état de santé et leur condition physique sont contrôlés. Chaque groupe de 10/20 individus est ajouté à un récipient d'essai choisi au hasard et de grosses femelles de *F. fimetaria* sont sélectionnées de sorte qu'elles puissent être aisément distinguées des *F. fimetaria* mâles.

Préparation des concentrations expérimentales

18. Quatre méthodes d'application de la substance chimique d'essai peuvent être utilisées: 1) mélanger la substance d'essai au sol en utilisant de l'eau en guise de support, 2) mélanger la substance d'essai au sol en utilisant un solvant organique en guise de support, 3) mélanger la substance d'essai au sol en utilisant du sable en guise de support, ou 4) appliquer la substance d'essai à la surface du sol. Le choix de la méthode appropriée dépend des caractéristiques de la substance d'essai et de la finalité de l'essai. On recommande, en général, de mélanger la substance chimique d'essai au sol. Des modes d'application conformes à l'utilisation concrète de la substance d'essai pourraient cependant s'imposer (par exemple, la pulvérisation de préparations liquides ou l'utilisation de présentations spéciales de pesticides telles que les granulés ou les produits de traitement des semences). Le sol est traité avant l'ajout des collemboles, qu'il convient de laisser s'enfoncer dans le sol, sauf si la substance d'essai est appliquée à la surface de celui-ci.

Substance chimique d'essai hydrosoluble

19. Une solution de la substance chimique d'essai dans de l'eau désionisée est préparée en une quantité suffisante pour toutes les expériences identiques d'une concentration expérimentale. Chaque solution de la substance d'essai est soigneusement mélangée à un lot du sol préhumidifié, avant d'être introduite dans le récipient expérimental.

Substance chimique d'essai insoluble dans l'eau

20. Les substances chimiques non solubles dans l'eau mais solubles dans des solvants organiques peuvent être dissoutes dans le plus petit volume possible d'un solvant approprié (par exemple de l'acétone) permettant néanmoins un bon mélange de la substance chimique dans le sol ainsi que son mélange avec une partie du sable quartziqzique requis. Seuls des solvants volatils peuvent être utilisés. Lorsqu'un solvant organique est utilisé, toutes les concentrations expérimentales et un témoin négatif de solvant supplémentaire contiennent la même quantité minimale de solvant. Les récipients où est effectuée l'application sont laissés sans couvercle pendant un certain temps afin de permettre au solvant associé à l'application de la substance d'essai de s'évaporer, en veillant à ce qu'aucune dissipation de la substance toxique ne se produise pendant ce temps.

Substance chimique d'essai peu soluble dans l'eau et les solvants organiques

21. Pour les substances chimiques peu solubles dans l'eau et les solvants organiques, on mélange du sable quartziqzique, qui doit faire partie du volume total de sable ajouté au sol, à la quantité de substance d'essai nécessaire pour obtenir la concentration expérimentale voulue. Ce mélange de sable quartziqzique et de la substance d'essai est ajouté au sol préhumidifié, auquel il est soigneusement mélangé après l'ajout de la quantité d'eau désionisée nécessaire pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est réparti entre les récipients expérimentaux. On répète la procédure pour chaque concentration expérimentale et on prépare un témoin approprié.

Application de la substance chimique d'essai à la surface du sol

22. Si la substance d'essai est un pesticide, il peut être pertinent de l'appliquer à la surface du sol par pulvérisation. Le sol est traité après l'ajout des collemboles. Les récipients expérimentaux sont d'abord remplis avec le substrat de sol humidifié, puis les animaux sont ajoutés et les récipients expérimentaux sont ensuite pesés. Afin d'éviter toute exposition directe des animaux par contact direct avec la substance d'essai, celle-ci est appliquée au moins une demi-heure après l'introduction des collemboles. La substance chimique d'essai devrait être répartie à la surface du sol de façon aussi régulière que possible, à l'aide d'un épandeur de laboratoire apte à simuler la pulvérisation sur un champ. L'application devrait avoir lieu à une température de $\pm 2^\circ\text{C}$ et, s'agissant de solutions aqueuses, d'émulsions ou de dispersions à une densité conforme aux recommandations d'évaluation des risques. Il convient de vérifier le taux à l'aide d'une technique d'étalonnage appropriée. L'application des présentations spéciales, telles que les granulés ou les produits de traitement des semences, pourrait reproduire leur mode d'emploi en agriculture. La nourriture est ajoutée après la pulvérisation.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions expérimentales

23. L'essai est conduit à une température moyenne de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, dans une fourchette de températures de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. L'essai est mené sous des cycles réglés de lumière et d'obscurité (de préférence 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité), avec un éclairage de 400 à 800 lux dans la zone des récipients expérimentaux.

24. Pour vérifier l'humidité du sol, on pèse les récipients au début, au milieu et à la fin de l'essai. Toute perte de poids > 2 % est compensée par l'ajout d'eau désionisée. Remarquons que la perte d'eau peut être réduite par le maintien d'un taux d'humidité de l'air élevé (> 80 %) dans l'incubateur.
25. Le pH est mesuré au début et à la fin de l'essai préliminaire de détermination des concentrations et de l'essai proprement dit. Des mesures devraient être effectuées sur un échantillon supplémentaire témoin et un échantillon supplémentaire de sol traité (à toutes les concentrations), préparés et entretenus de la même manière que les cultures expérimentales, mais sans ajout des collemboles.

Procédure d'essai et mesures

26. Pour chaque concentration expérimentale, une quantité de sol d'essai correspondant à 30 g de poids frais est placée à l'intérieur du récipient expérimental. On prépare également des témoins d'eau sans substance d'essai. Si la substance d'essai est appliquée à l'aide d'un véhicule, une série de témoins contenant uniquement le véhicule devrait être mis à l'essai parallèlement à la série traitée avec la substance d'essai. La concentration du solvant ou du dispersant devrait être identique à celle utilisée dans les récipients expérimentaux contenant la substance d'essai.
27. Les collemboles sont transférés avec soin dans les différents récipients expérimentaux (entre lesquels ils sont répartis aléatoirement) et placés à la surface du sol. Pour assurer un transfert efficace des animaux, un appareil d'aspiration de faible puissance peut être utilisé. Le nombre d'expériences identiques pour les concentrations expérimentales et les témoins dépend de la conception de l'essai. Les récipients expérimentaux sont placés au hasard dans l'incubateur et leurs emplacements sont modifiés au hasard chaque semaine.
28. Pour l'essai avec *F. fimetaria*, 20 adultes, 10 mâles et 10 femelles, âgés de 23 à 26 jours sont utilisés par récipient expérimental. Au 21^{ème} jour, les collemboles sont extraits du sol et comptés. Dans le cas de *F. fimetaria*, le sexe des animaux synchronisés composant le lot utilisé pour l'essai est déterminé en fonction de leur taille. Les femelles sont en effet nettement plus grosses que les mâles (Voir Appendice 3).
29. Pour l'essai avec *F. candida*, 10 juvéniles de 9 à 12 jours par récipient expérimental sont utilisés. Au 28^{ème} jour, les collemboles sont extraits du sol et comptés.
30. Une source de nourriture appropriée constituée d'une quantité suffisante, de 2 à 10 mg par exemple, de levure de boulanger sèche en granulés, disponible dans le commerce pour un usage ménager, est ajoutée à chaque récipient au début de l'essai puis après 2 semaines environ.
31. À la fin de l'essai, la mortalité et la reproduction sont évaluées. Après 3 semaines (*F. fimetaria*) ou 4 semaines (*F. candida*), les collemboles sont extraits du sol d'essai (voir Appendice 4) et comptés (12). Un collemboule est consigné comme mort s'il n'est pas présent lors de l'extraction. La méthode d'extraction et de comptage est validée. Sa validité implique une efficacité d'extraction des juvéniles supérieures à 95 %, et peut par exemple être vérifiée par l'ajout d'un nombre connu d'individus au sol.
32. Le déroulement concret de la procédure d'essai et son calendrier sont décrits dans l'Appendice 2.

Plan de l'essai

Essai préliminaire de détermination des concentrations

33. Si nécessaire, un essai préliminaire de détermination des concentrations est mené avec, par exemple, cinq concentrations expérimentales: 0,1, 1,0, 10, 100 et 1 000 mg/kg de masse sèche de sol. Deux expériences identiques par concentration et par témoin sont par ailleurs effectuées. Des informations supplémentaires, provenant d'essais avec des substances chimiques similaires ou tirées d'études déjà publiées, sur la mortalité ou la reproduction des collemboles peuvent également être utiles pour décider de la gamme de concentrations à utiliser dans l'essai préliminaire de détermination des concentrations.
34. La durée de l'essai préliminaire de détermination des concentrations est de deux semaines pour *F. fimetaria* et de 3 semaines pour *F. candida* afin de garantir que des juvéniles auront été produits. À la fin de l'essai, la mortalité et la reproduction des collemboles sont évaluées. Le nombre d'adultes et celui de juvéniles sont consignés.

Essai proprement dit

35. Pour déterminer la CE_x (par exemple CE_{10} , CE_{50}), il faut tester douze concentrations. Au minimum deux expériences identiques par concentration d'essai plus six témoins identiques sont recommandés. Le facteur d'espacement peut varier en fonction de la relation dose-réponse.
36. Pour déterminer la CSEO/CMEO, il faut tester au moins cinq concentrations formant une série géométrique. Quatre expériences identiques par concentration d'essai plus huit témoins sont recommandées. Les concentrations sont espacées d'un facteur d'au plus 1,8.
37. Une démarche combinée permet de déterminer à la fois la CSEO/CMEO et la CE_x . On utilise à cet effet huit concentrations formant une série géométrique. Quatre expériences identiques par concentration d'essai plus huit témoins sont recommandées. Les concentrations sont espacées d'un facteur d'au plus 1,8.
38. Si aucun effet n'est observé à la plus forte concentration lors de l'essai préliminaire de détermination des concentrations (1 000 mg/kg), l'essai de reproduction peut devoir être conduit comme un essai limite, avec une concentration expérimentale de 1 000 mg/kg plus le témoin. Un essai limite permettra de démontrer l'absence d'effet statistiquement significatif à la concentration limite. Il faut alors utiliser huit expériences identiques pour le sol traité et pour le témoin.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

39. Le taux de reproduction est le principal paramètre à évaluer (par exemple le nombre de juvéniles produits par récipient expérimental). L'analyse statistique, à l'aide par exemple des procédures d'analyse de la variance (ANOVA), compare les différentes concentrations au moyen du test t de Student, du test de Dunnett, ou du test de Williams. Les intervalles de confiance à 95 % sont calculés pour les moyennes établies aux différentes concentrations.
40. Le nombre d'adultes survivants dans les témoins non traités est un critère de validité essentiel qui est détaillé. Comme dans l'essai préliminaire de détermination des concentrations, tous les autres signes de nocivité sont également consignés dans le rapport final.

 CL_x et CE_x

41. On calcule les valeurs de CE_x et leurs limites de confiance à 95 % supérieures et inférieures correspondant au paramètre, en utilisant des méthodes statistiques adéquates (fonction logistique ou de Weibull, méthode abrégée de Spearman-Kärber, ou interpolation simple, par exemple). Une CE_x est obtenue en intégrant une valeur correspondant à x % de la moyenne du témoin dans l'équation retenue. Pour calculer la CE_{50} ou toute autre CE_x , la série de données complète est soumise à une analyse de régression. La CL_{50} est généralement estimée par analyse des probits ou par des méthodes d'analyse similaires prenant en compte les données sur la mortalité, qui suivent une distribution binomiale.

CSEO/CMEO

42. Lorsqu'une analyse statistique est appliquée pour déterminer la CSEO ou la CMEO, il faut disposer de statistiques par récipient (chaque récipient individuel étant considéré comme une expérience distincte). Il convient alors d'utiliser des méthodes statistiques adéquates conformément au Document 54 de l'OCDE intitulé *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application* (9). En général, les effets indésirables de la substance chimique d'essai par rapport au témoin sont étudiés en procédant à une vérification de l'hypothèse unilatérale (plus faible) pour $p \leq 0,05$.
43. La distribution normale et l'homogénéité de la variance peuvent être vérifiées à l'aide d'un test statistique approprié, tel que le test de Shapiro-Wilk et le test de Levene, respectivement ($p \leq 0,05$). Une analyse de la variance à un facteur (ANOVA), puis des tests multi-comparaisons peuvent être effectués. Des tests de comparaisons multiples (test de Dunnett, par exemple) ou des tests d'analyse de tendance descendante (tel que le test de William) peuvent permettre de calculer d'éventuelles différences significatives ($p \leq 0,05$) entre les témoins et les diverses concentrations de substance chimique d'essai [on choisira le test recommandé conformément au Document 54 de l'OCDE (9)]. On peut toutefois utiliser des méthodes non paramétriques (tels que le test U de Bonferroni conformément à Holm ou le test de tendance de Jonckheere-Terpstra) pour déterminer la CSEO et la CMEO.

Essai limite

44. Si un essai limite a été mis en œuvre (comparaison du témoin et d'un seul traitement) et que les conditions requises pour les procédures de tests paramétriques (normalité, homogénéité) sont remplies, on peut évaluer les réponses métriques par le test de Student (test t). Le test t de variance inégale (test t de Welch) ou bien un test non paramétrique tel que le test U de Mann-Whitney peuvent être employés lorsque ces conditions ne sont pas satisfaites.
45. Si l'on cherche à déterminer des différences significatives entre les témoins (témoin et témoin de solvant), les répliques de chaque témoin peuvent être testées comme décrit pour l'essai limite. Lorsque les essais ne détectent aucune différence significative, il est possible de rassembler toutes les expériences identiques témoins et témoins de solvant. Dans le cas contraire, il faut comparer tous les traitements avec le témoin de solvant.

Rapport d'essai

46. Le rapport d'essai comprend au moins les informations suivantes:

Substance chimique d'essai

- identité de la substance d'essai, lot de fabrication, lot de conditionnement et numéros CAS, degré de pureté;
- propriétés physico-chimiques de la substance d'essai (par exemple log K_{ow}, hydrosolubilité, pression de vapeur, constante de Henry (H) et, de préférence, information sur le devenir de la substance d'essai dans le sol) si elles sont connues;
- formulation de la substance d'essai et nature des additifs si ce n'est pas le produit chimique pur qui est testé;

Organisme d'essai

- identification des espèces et fournisseur des organismes d'essai, description des conditions d'élevage et fourchettes d'âges des organismes d'essai;

Conditions expérimentales

- description du plan de l'étude et du mode opératoire;
- détails sur la préparation du sol d'essai; description détaillée lorsque l'on utilise un sol naturel (origine, histoire, distribution de tailles de particules, pH, teneur en matières organiques);
- capacité de rétention d'eau du sol;
- description de la méthode d'application de la substance chimique d'essai dans le sol;
- conditions expérimentales intensité lumineuse, durée des cycles de lumière et d'obscurité, température;
- description du régime d'administration de la nourriture, nature et quantité de nourriture fournie au cours de l'essai, dates d'alimentation;
- pH et teneur en eau du sol au début et à la fin de l'essai (pour le témoin et chacune des concentrations);
- description détaillée de la méthode d'extraction et de l'efficacité d'extraction;

Résultats de l'essai

- nombre de juvéniles déterminés dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai;
- nombre et mortalité des adultes (%) dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai;
- description des effets physiologiques évidents ou des symptômes pathologiques ou des changements nets de comportement;
- résultats obtenus avec la substance chimique d'essai de référence;
- valeurs de la CSEO/CMEO, des CL_x pour la mortalité et des CE_x pour la reproduction (principalement les CL₅₀, CL₁₀, CE₅₀ et CE₁₀) et intervalles de confiance à 95 % Graphique du modèle ajusté utilisé pour effectuer le calcul, équation de la fonction correspondante, ainsi que ses paramètres (9);

- toutes les informations et observations utiles à l'interprétation des résultats;
- puissance du test effectivement réalisé s'il est procédé à une vérification de l'hypothèse formulée (9);
- écarts par rapport aux procédures décrites dans la présente méthode d'essai et faits inhabituels survenus au cours de l'essai;
- validité de l'essai;
- en cas d'estimation de la CSEO, différence minimale détectable.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (dir. de pub. H Løkke et CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- (2) ISO (1999) Soil Quality — Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. N° 11267. Organisation internationale de normalisation, Genève.
- (3) Burges A et Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. Londres.
- (4) Petersen H et Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388.
- (5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. *Acta Zoologica Fennica* 195: 111-118.
- (6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330pp (ISBN 0-19-854084-1)
- (7) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychiurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (dir. de pub.), Actes du VIème colloque international sur la zoologie du sol, Louvain-la-neuve (Belgique), 30 août — 2 septembre 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268.
- (8) Chapitre C.36 de la présente annexe, Essai de reproduction d'un acarien prédateur [*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*] dans le sol
- (9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. A guidance to application, Série de l'OCDE sur les essais et évaluations, Numéro 54, ENV/JM/MONO(2006) 18, OCDE, Paris
- (10) Scott-Fordsmand JJ et Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Ministère danois de l'environnement.
- (11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Agence danoise pour la protection de l'environnement, Environmental Project No. 1256, pp. 66.
- (12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. *Appl. Soil Ecol.* 7, 201-205.
- (13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. *Norsk Entomologisk Forening*.
- (14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In *Soil Zoology* (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, Londres, pp. 412-416.
- (15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. *Entomologists' Monthly Magazine* 96:138-140.

*Appendice 1***Définitions**

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai (dans cet essai, toutes les concentrations efficaces sont exprimées en masse de la substance chimique d'essai rapportée à la masse sèche du sol d'essai):

Substance chimique: une substance ou un mélange

CSEO (concentration sans effet observé): la concentration de la substance chimique d'essai à laquelle aucun effet n'est observé. Dans cet essai, la concentration correspondant à la CSEO n'a pas d'effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

CMEO (concentration minimale avec effet observé): la plus faible concentration de la substance chimique d'essai qui exerce un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

CE_x (concentration efficace à x %): concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'expérience durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, une CE₅₀ est une concentration estimée produire un effet sur un paramètre évalué de l'essai dans 50 % d'une population exposée durant une période d'exposition déterminée.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Appendice 2

Principales actions et calendrier de réalisation d'un essai sur les collemboles

Les étapes de l'essai peuvent se résumer comme suit:

Date (jour)	Action
- 23 à - 26.	Préparation d'une culture synchrone de <i>F. fimetaria</i>
- 14	Préparer le sol artificiel (mélanger les ingrédients secs) Vérifier le pH du sol artificiel et l'ajuster en conséquence Mesurer la capacité de rétention d'eau maximale du sol
- 9 à - 12.	Préparation d'une culture synchrone de <i>F. candida</i>
- 2 à - 7	Sol préhumidifié
- 1	Répartir les juvéniles en lots Préparer les solutions mères et appliquer la substance chimique d'essai si un solvant est requis
0	Préparer les solutions mères et appliquer la substance chimique d'essai si l'application d'une substance chimique solide ou hydrosoluble est requise, ou qu'elle est effectuée en surface. Mesurer le pH du sol et peser les récipients. Ajouter la nourriture. Introduire les collemboles.
14	Essai préliminaire de détermination des concentrations pour <i>F. fimetaria</i> : mettre un terme à l'essai, extraire les animaux, mesurer le pH du sol et la perte d'eau (poids) Essais proprement dits: mesurer la teneur en humidité et compenser les pertes d'eau, et ajouter de 2 à 10 mg de levure
21	Essai proprement dit pour <i>F. fimetaria</i> : mettre un terme à l'essai, extraire les animaux, mesurer le pH du sol et la perte d'eau (poids) Essai préliminaire de détermination des concentrations pour <i>F. candida</i> : mettre un terme à l'essai, extraire les animaux, mesurer le pH du sol et la perte d'eau (poids)
28	Essai proprement dit pour <i>F. candida</i> : mettre un terme à l'essai, extraire les animaux, mesurer le pH du sol et la perte d'eau (poids)

Appendice 3

Recommandations en matière d'élevage et de synchronisation de *F. fimetaria* et *F. candida*

Les indications de dates et de durées données dans les présentes recommandations sont vérifiées pour chaque variété particulière de collemboles afin de s'assurer que le calendrier prévu permettra de disposer d'une quantité suffisante de juvéniles synchronisés. Pour l'essentiel, ce sont la survenue de la ponte après le transfert des adultes à un substrat frais et l'éclosion des œufs qui déterminent le jour approprié pour la collecte des œufs et pour celle des juvéniles synchrones.

Il convient de disposer en permanence d'une culture mère composée par exemple de 50 récipients/boîtes de Petri. Cette culture mère devrait être maintenue dans de bonnes conditions d'alimentation en lui fournissant de la nourriture et de l'eau toutes les semaines, et en retirant la nourriture ancienne et les cadavres. Si le nombre de collemboles présents sur le substrat est trop faible, il peut s'ensuivre une inhibition en raison d'une plus grande formation de moisissures. Si la culture mère est utilisée trop souvent pour la production d'œufs, elle risque de s'épuiser. Les signes d'épuisement prennent la forme de la présence d'adultes morts et de moisissures sur le substrat. Les œufs restant après la production d'animaux synchrones peuvent être utilisés pour rajeunir la culture.

Dans une culture synchrone de *F. fimetaria*, les mâles se distinguent principalement des femelles par la taille. Les mâles sont en effet nettement plus petits que les femelles, et ils se caractérisent par une plus grande vitesse de déplacement qu'elles. La bonne détermination des sexes n'exige guère d'expérience et elle peut être confirmée par inspection de la zone génitale au microscope (13).

1. Élevage**1.a. Préparation du substrat de culture**

Le substrat de culture est constitué de plâtre de Paris (sulfate de calcium) et de charbon de bois actif. On obtient ainsi un substrat humide, la fonction du charbon étant d'absorber les effluents gazeux et les excréments (14) (15). Différentes formes de charbon peuvent être utilisées pour faciliter l'observation des collemboles. Du charbon de bois en poudre est ainsi utilisé pour *F. candida* et *F. fimetaria* (donnant une coloration gris-noir au plâtre de Paris):

Composition du substrat:

- 20 ml de charbon de bois actif
- 200 ml d'eau distillée
- 200 ml de plâtre de Paris

ou

- 50 g de charbon de bois actif réduit en poudre
- 260-300 ml d'eau distillée
- 400 g de plâtre de Paris.

On laisse reposer le mélange du substrat avant son utilisation.

1.b. Reproduction

Les collemboles sont maintenus dans des récipients tels que des boîtes de Petri (90 mm × 13 mm), dont le fond est couvert d'une couche de 0,5 cm de substrat formé de plâtre et de charbon de bois. Ils sont cultivés à une température de 20 ± 1 °C et sous des cycles de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité (avec un éclairage de 400 à 800 lux). Les récipients sont maintenus humides en permanence de sorte que l'humidité relative de l'air y atteigne 100 %. Cela peut être obtenu en assurant la présence d'eau libre dans le plâtre poreux mais en évitant qu'une pellicule d'eau se forme à la surface du plâtre. La perte d'eau peut être évitée en maintenant l'humidité de l'air ambiant. Tous les individus morts devraient être retirés des récipients, de même que toute nourriture moisie. Pour stimuler la production d'œufs, les animaux adultes sont transférés dans des boîtes de Petri contenant un substrat de plâtre de Paris et de charbon de bois fraîchement préparé.

1.c. Source de nourriture

Pour *F. candida* comme pour *F. fimetaria*, la seule source de nourriture utilisée est constituée de levure de boulanger sèche en granulés. De la nourriture fraîche leur est fournie une ou deux fois par semaine, afin d'éviter la moisissure. Elle est directement placée en un petit tas sur le plâtre de Paris. La quantité de levure de boulanger ajoutée devrait être ajustée à la taille de la population de collemboles, mais un apport de 2 à 15 mg sera généralement suffisant.

2. Synchronisation

L'essai est mené avec des animaux synchronisés afin de disposer d'animaux d'essai homogènes, au même stade de développement et de même taille. Qui plus est, la synchronisation permet de distinguer les *F. fimetaria* mâles des femelles à partir de l'âge de 3 semaines sur la base de leur dimorphisme sexuel, c'est-à-dire de leurs différences de tailles. La procédure ci-dessous constitue une suggestion quant à la manière d'obtenir des animaux synchronisés (les étapes concrètes sont facultatives).

2.a. Synchronisation.

- Préparer des récipients contenant une couche de 0,5 cm de substrat constitué de plâtre de Paris et de charbon de bois.
- Pour la ponte, transférer dans les récipients de 150 à 200 *F. fimetaria* adultes et de 50 à 100 *F. candida* tirés des 15 à 20 meilleurs récipients de la culture mère avec un substrat vieux de 4 à 8 semaines et les nourrir avec 15 mg de levure de boulanger. Éviter de mêler des juvéniles aux adultes car la présence de juvéniles risquerait d'inhiber la production d'œufs.
- Maintenir la culture à 20 ± 1 °C (la moyenne devrait être de 20 °C) et sous des cycles de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité (avec un éclairage de 400 à 800 lux). Veiller à ce que de la nourriture fraîche soit disponible et à ce que l'air soit saturé d'eau. Le manque de nourriture peut amener les animaux à déféquer sur les œufs, aboutissant à la formation de moisissures sur ceux-ci, ou encore *F. candida* pourrait cannibaliser ses propres œufs. Après 10 jours les œufs sont soigneusement collectés avec une épingle et une spatule et déposés sur du "papier à œufs" (petits morceaux de papier filtre plongés dans une barbotine de plâtre de Paris et de charbon de bois) qui est placé dans un récipient contenant un substrat frais constitué de plâtre et de charbon de bois. Quelques grains de levure sont ajoutés au substrat pour attirer les juvéniles et leur faire quitter ledit papier. Il importe que ce papier tout comme le substrat soient humides, car sinon les œufs souffriront de déshydratation. Une autre solution consiste à retirer les animaux adultes des boîtes de culture synchronisée après qu'ils ont produit des œufs pendant 2 ou 3 jours.
- Après trois jours, la plupart des œufs déposés sur le papier auront éclos, et quelques juvéniles pourront être trouvés sous celui-ci.
- Pour obtenir des juvéniles d'âge homogène, le papier et les œufs non éclos présents sur celui-ci sont retirés de la boîte de Petri à l'aide de pinces. Désormais âgés de 0 à 3 jours, les juvéniles demeurent dans le récipient et sont nourris avec de la levure de boulanger. Les œufs non éclos sont jetés.
- Les œufs et les juvéniles éclos sont cultivés de la même manière que les adultes. Pour *F. fimetaria* en particulier, il conviendrait de prendre les dispositions suivantes: fournir suffisamment de nourriture fraîche et retirer la vieille nourriture qui commence à moisir, puis après 1 semaine répartir les juvéniles dans de nouvelles boîtes de Petri sous réserve que leur densité demeure supérieure à 200.

2.b. Gestion des collemboles au début de l'essai

- Les *F. candida* âgés de 9 à 12 jours ou les *F. fimetaria* âgés de 23 à 26 jours sont collectés, par exemple par aspiration, puis relâchés dans un petit récipient contenant un substrat humide constitué de plâtre et de charbon de bois, leur condition physique étant contrôlée sous le stéréomicroscope (les animaux blessés ou ayant subi des dommages sont éliminés). Il convient de suivre les différentes étapes en maintenant les collemboles dans une atmosphère humide afin d'éviter tout stress dû à la sécheresse, en utilisant par exemple des surfaces humidifiées, etc.
- Retourner le récipient et en tapoter le fond afin de transférer les collemboles sur le sol. Il convient de neutraliser l'électricité statique, au risque que les animaux se retrouvent sinon tout simplement en suspension dans l'air, ou adhérent aux parois du récipient expérimental et s'y dessèchent. Un ioniseur ou un morceau de tissu humide placé sous le récipient peuvent être utilisés à cet effet.
- La nourriture devrait être répartie sur toute la surface du sol et non disposée en un seul bloc.

- Lors du transport et durant la période d'essai, il convient d'éviter de heurter ou de déranger physiquement de quelque autre manière les récipients d'essai, car cela risque d'accroître le tassement du sol et de compromettre l'interaction entre les collemboles.

3. Autres espèces de collemboles

D'autres espèces de collemboles peuvent être choisies pour procéder à des essais conformes à la présente méthode d'essai, comme par exemple *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, ou encore *Mesaphorura macrochaeta*. Un certain nombre de conditions préalables sont toutefois réunies avant d'utiliser ces autres espèces:

- Elles sont clairement identifiées;
 - Les raisons du choix de l'espèce retenue sont fournies;
 - Il faut veiller à ce que la biologie de la reproduction soit incluse dans la phase d'essai, de sorte qu'elle sera potentiellement ciblée durant l'exposition;
 - Leur cycle de vie est connu: âge de maturation, durée de développement des œufs, et stades de développement susceptibles d'être soumis à l'exposition;
 - Le substrat d'essai et la quantité de nourriture disponible garantissent des conditions optimales de croissance et de reproduction;
 - La variabilité est suffisamment faible pour permettre une estimation précise et exacte de la toxicité.
-

*Appendice 4***Extraction et comptage des animaux****1. Deux méthodes d'extraction peuvent être appliquées.**

- 1.a. Première méthode: Un extracteur à gradient de température contrôlé reposant sur les principes énoncés par MacFadyen peut être utilisé (1). La chaleur émanant d'un dispositif de chauffage situé sur la partie supérieure de la boîte d'extraction est régulée par un thermistor placé à la surface de l'échantillon de sol. La température du liquide réfrigéré entourant le récipient de collecte est régulée par un thermistor situé à la surface de la boîte de collecte (placée sous l'échantillon de sol). Les thermistors sont reliés à une unité de contrôle programmable qui élève la température selon un schéma préétabli. Les animaux sont collectés dans la boîte de collecte réfrigérée (2 °C) dont le fond contient une couche constituée de plâtre de Paris et de charbon de bois. L'extraction débute à 25 °C et la température est ensuite automatiquement augmentée de 5 °C toutes les 12 h sur une durée totale de 48 heures. Après 12 h à 40 °C l'extraction est achevée.
- 1.b. Seconde méthode: Au terme de la période d'incubation expérimentale le nombre de collemboles juvéniles présents est évalué par flottation. À cet effet, l'essai est réalisé dans des récipients d'un volume d'environ 250 ml. Environ 200 ml d'eau distillée sont ajoutés à la fin de l'essai. Le sol est remué doucement à l'aide d'un pinceau fin en vue de permettre aux collemboles de remonter à la surface de l'eau. Une petite quantité, environ 0,5 ml, de teinture photographique noire Kentmere peut être ajoutée à l'eau pour faciliter le comptage en augmentant le contraste entre l'eau et les collemboles blancs. Cette teinture n'est pas toxique pour les collemboles.

2. Comptage:

le comptage des animaux peut être effectué à l'œil nu ou à l'aide d'un microscope optique après avoir placé une grille sur le récipient de flottation, ou encore en photographiant la surface de chaque récipient puis en comptant ultérieurement les collemboles sur des agrandissements ou sur des projections de diapositives. Le comptage peut également être réalisé à l'aide de techniques de traitement numérique de l'image (12). Toutes ces techniques sont validées.

Appendice 5

Détermination de la capacité maximale de rétention d'eau du sol

La méthode suivante de détermination de la capacité maximale de rétention d'eau du sol a fait ses preuves. Elle est décrite à l'annexe C de la norme ISO DIS 11268-2 (Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*). Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction).

Prélevez une quantité déterminée (5 g, par exemple) du sol expérimental servant de substrat à l'aide d'un instrument approprié (tarière, etc.). Couvrez le fond de la tarière avec un morceau de papier filtre humide et placez-la sur un support dans un bain d'eau. La tarière est progressivement submergée jusqu'à ce que le niveau d'eau dépasse le sommet de la carotte de sol. Laissez la tarière dans l'eau durant environ trois heures. Comme l'eau absorbée par les capillaires du sol ne peut pas être retenue en totalité, laissez l'échantillon de sol dégorger durant deux heures, en plaçant le tube sur un lit de sable quartzique fin très humide contenu dans un récipient fermé (pour empêcher le séchage). Pesez l'échantillon et séchez-le à 105 °C jusqu'à ce qu'il atteigne une masse constante. La capacité de rétention d'eau (CRE) est calculée comme suit:

$$\text{CRE (en \% de masse sèche)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

où:

S = masse du substrat saturé en eau + masse de la tarière + masse du papier filtre

T = tare (masse de la tarière + masse du papier filtre)

D = masse sèche du substrat

*Appendice 6***Détermination du pH du sol**

La méthode de détermination du pH d'un sol, décrite ci-dessous s'appuie sur la norme ISO 10390: Qualité du sol — Détermination du pH.

On laisse sécher une quantité définie de sol à température ambiante durant au moins 12 heures. On prépare une suspension du sol (contenant au moins 5 g de sol) dans cinq fois son volume d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M de qualité analytique ou d'une solution de chlorure de calcium (CaCl₂) 0,01 M de qualité analytique. On agite vigoureusement la suspension durant cinq minutes et on la laisse sédimenter durant au moins deux heures, mais pas plus de 24 heures. On mesure ensuite le pH de la phase liquide à l'aide d'un pH-mètre, étalonné avant chaque mesure à l'aide d'une série appropriée de solutions tampons (pH 4,0 et 7,0, par exemple).

C.40. ESSAI DE TOXICITÉ SUR LE CYCLE DE VIE DES CHIRONOMES DANS UN SYSTÈME EAU-SÉDIMENT CHARGÉ OU EAU CHARGÉE-SÉDIMENT

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 233 (2010) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle est conçue pour évaluer les effets d'une exposition vie entière à des substances chimiques chez *Chironomus* sp., un diptère d'eau douce, en couvrant toute la durée de vie de la première génération (génération P) et la première partie de la vie de la deuxième génération (génération F1). Elle prolonge les méthodes d'essai C.28 (1) ou C.27 (15) existantes, dans lesquelles l'exposition s'effectue respectivement à l'aide d'un système eau chargée-sédiment ou d'un système eau-sédiment chargé. Cette méthode d'essai s'appuie sur des protocoles d'essais de toxicité sur *Chironomus riparius* et *Chironomus dilutus* [anciennement dénommé *C. tentans* (2)], mis au point en Europe et en Amérique du Nord (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) puis soumis à des essais interlaboratoires (1) (7) (10) (11) (12). Il est également possible d'utiliser d'autres espèces de chironomes pour lesquelles il existe une littérature conséquente, telles que *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). La durée totale d'exposition est d'environ 44 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, et d'environ 100 jours pour *C. dilutus*.
2. La présente méthode d'essai décrit des scénarios d'exposition dans l'eau et le sédiment respectivement. Le choix du mode d'exposition dépend de la finalité de l'essai. Le mode d'exposition qui consiste à charger la colonne d'eau vise à simuler des pertes par dispersion lors de l'épandage de pesticides et couvre le pic de concentration initial dans les eaux de surface. Le chargement de la colonne d'eau s'applique également à d'autres types d'exposition (notamment déversements de substances chimiques), mais non aux processus d'accumulation dans le sédiment d'une durée supérieure à celle de l'essai. Dans ce dernier cas, mais aussi lorsque le ruissellement est la principale voie d'entrée des pesticides dans les masses d'eau, il peut être préférable de charger le sédiment. Si d'autres modes d'exposition sont envisagés, le protocole d'essai peut facilement être adapté. Par exemple, si la répartition de la substance chimique d'essai entre la phase aqueuse et la couche de sédiment ne présente pas d'intérêt, et qu'il est nécessaire de limiter au maximum l'adsorption sur le sédiment, on peut envisager d'avoir recours à un sédiment de substitution artificiel (tel que du sable quartzique).
3. En général, les substances chimiques à tester sur des organismes vivant dans les sédiments subsistent longtemps dans le sédiment. Ces organismes peuvent être exposés par diverses voies. L'importance relative de chaque voie d'exposition et le temps pris par chacune d'entre elles pour contribuer à l'effet toxique global dépendent des propriétés physico-chimiques de la substance. Dans le cas de substances chimiques fortement adsorbantes ou de substances liées par covalence au sédiment, l'ingestion d'aliments contaminés peut se révéler une voie d'exposition significative. Afin de ne pas sous-estimer la toxicité des substances chimiques fortement lipophiles, on envisagera d'ajouter de la nourriture au sédiment avant l'application de la substance d'essai (voir paragraphe 31). Il est donc possible d'inclure toutes les voies d'exposition et tous les stades du cycle de vie.
4. Les effets mesurés sont le nombre total d'adultes émergés (pour la 1^{ère} et la 2^{ème} génération), la vitesse de développement (pour la 1^{ère} et la 2^{ème} génération), le sex-ratio des adultes totalement émergés et vivants (pour la 1^{ère} et la 2^{ème} génération), le nombre d'amas cylindriques d'œufs par femelle (1^{ère} génération uniquement) et le taux de fertilité des amas d'œufs (1^{ère} génération uniquement).
5. L'utilisation d'un sédiment reconstitué est vivement recommandée en raison de ses avantages par rapport aux sédiments naturels:
 - la variabilité expérimentale est réduite car le sédiment reconstitué forme une "matrice normalisée" reproductible; en outre, il n'est plus nécessaire de trouver des sources de sédiments non contaminés et non pollués;
 - les essais peuvent être effectués à n'importe quel moment de l'année, la variabilité saisonnière n'intervenant plus, et il n'est pas nécessaire de traiter préalablement le sédiment pour éliminer la faune indigène;
 - le coût est réduit par rapport à la collecte sur le terrain d'une quantité suffisante de sédiments pour les essais en routine;
 - les sédiments reconstitués permettent de comparer la toxicité des substances chimiques entre les différentes études (3).
6. Les définitions utilisées figurent à l'Appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des chironomes au premier stade larvaire sont exposés à une gamme de concentrations de la substance chimique d'essai dans un système sédiment-eau. L'essai débute par l'introduction de larves du premier stade (1^{ère} génération) dans des béciers expérimentaux contenant du sédiment chargé. Il est également possible d'injecter la substance chimique d'essai dans l'eau après l'introduction des larves. L'émergence des chironomes, le délai d'émergence et le sex-ratio des moucheron complètement émergés et vivants sont évalués. Les adultes émergés sont transférés dans des cages d'élevage pour faciliter l'essaimage, l'accouplement et la ponte. Le nombre d'amas d'œufs et leur fertilité sont évalués. Ces amas d'œufs produisent les larves du premier stade de la 2^{ème} génération. Ces larves sont placées dans des béciers expérimentaux fraîchement préparés (les récipients sont chargés de la même façon que pour la 1^{ère} génération) afin de déterminer la viabilité de la 2^{ème} génération via l'évaluation de l'émergence des chironomes, du délai d'émergence et du sex-ratio des moucheron complètement émergés et vivants (on trouvera à l'Appendice 5 une présentation schématique de l'essai sur le cycle de vie). Toutes les données sont analysées, soit en utilisant un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x % de l'effet mesuré, soit en ayant recours à un test d'hypothèse pour déterminer une concentration sans effet observé (CSEO). Cette dernière méthode nécessite une comparaison des réponses au traitement avec les réponses témoins adéquates à l'aide de tests statistiques. Il convient de noter que dans le système eau chargée, en cas d'utilisation de substances chimiques se dégradant rapidement, les dernières phases du cycle de vie de chaque génération (par exemple la phase pupale) peuvent être exposées à un niveau de concentration bien plus faible dans l'eau sus-jacente que les larves du premier stade. Si cela pose problème et qu'un niveau d'exposition similaire est nécessaire pour chaque phase du cycle de vie, on peut alors envisager de modifier la méthode d'essai comme suit:

- expériences parallèles avec chargement du système à différentes phases du cycle de vie, ou
- chargement répété (ou renouvellement de l'eau sus-jacente) du système expérimental au cours des deux phases de l'essai (1^{ère} et 2^{ème} génération), les intervalles de chargement (renouvellement) devant être ajustés en fonction des caractéristiques du devenir de la substance chimique d'essai.

De telles modifications sont envisageables uniquement dans le système eau chargée, et non dans le système sédiment chargé.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

8. Il est nécessaire de connaître l'hydrosolubilité de la substance chimique d'essai, sa pression de vapeur et son $\log K_{oc}$, son coefficient de partage mesuré ou calculé dans le sédiment, et sa stabilité dans l'eau et le sédiment. Il convient de disposer, pour quantifier la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, l'eau interstitielle et le sédiment, d'une méthode d'analyse fiable dont la précision et le seuil de détection sont connus. Il est également utile de connaître la formule structurale et la pureté de la substance chimique d'essai ainsi que son devenir chimique (par exemple dissipation, dégradation abiotique et biotique, etc.). Des conseils pour tester les substances chimiques se prêtant difficilement à l'essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont fournis à la référence (16).

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

9. Il est possible de tester régulièrement des substances chimiques de référence afin de s'assurer que la sensibilité de la population du laboratoire n'a pas évolué. Comme pour les daphnies, il est suffisant d'effectuer un test de toxicité aiguë de 48 heures (tel que celui décrit dans la référence (17)). Toutefois, dans l'attente qu'une ligne directrice validée soit disponible pour la toxicité aiguë, il peut être envisagé de réaliser un essai de toxicité chronique selon la méthode C.28 de la présente annexe. Parmi les toxiques de référence ayant fait leurs preuves dans des essais interlaboratoires et des études de validation, citons le lindane, la trifluraline, le pentachlorophénol, le chlorure de cadmium et le chlorure de potassium. (1) (3) (6) (7) (18).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. Pour que l'essai soit valable, les conditions suivantes doivent être remplies:
- l'émergence moyenne dans le système témoin est d'au moins 70 % à la fin de la période d'exposition pour les deux générations (1) (7);
 - pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, 85 % du total des moucheron adultes émergés du système témoin pour les deux générations doivent apparaître entre 12 et 23 jours après l'introduction des larves de premier stade dans les récipients; pour *C. dilutus*, une période de 20 à 65 jours est acceptable;

- le sex-ratio moyen des adultes totalement émergés et vivants (proportion de femelles ou de mâles) dans le système témoin pour les deux générations est d'au moins 0,4, mais ne dépasse pas 0,6;
- pour chaque cage d'élevage, le nombre d'amas d'œufs dans les cultures témoin de la 1^{ère} génération est d'au moins 0,6 par femelle introduite dans la cage d'élevage;
- la fraction des amas d'œufs fertiles dans chaque cage d'élevage des témoins de la 1^{ère} génération est d'au moins 0,6;
- à l'issue de la période d'exposition pour les deux générations, le pH et la concentration d'oxygène dissous sont mesurés dans chaque récipient. La concentration d'oxygène doit atteindre au moins 60 % de la valeur de saturation en air (VSA ⁽¹⁾), et le pH de l'eau sus-jacente doit être compris entre 6 et 9 dans tous les récipients expérimentaux;
- la température de l'eau ne varie pas de plus de $\pm 1,0$ °C.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Récipients expérimentaux et cages d'élevage

11. Les larves sont exposées dans des béciers en verre de 600 ml, mesurant environ 8,5 cm de diamètre (voir Appendice 5). D'autres récipients peuvent être utilisés à condition que la profondeur de l'eau sus-jacente et celle du sédiment puissent être suffisantes. Le sédiment doit offrir une superficie de 2 à 3 cm² par larve. Le rapport de l'épaisseur de la couche de sédiment à celle de la couche d'eau sus-jacente doit être à peu près égal à 1/4. Il convient d'utiliser des cages d'élevage (de 30 cm minimum pour chacune des trois dimensions) dont le dessus et au moins un côté sont recouverts d'une gaze (maillage d'environ 1 mm) (voir Appendice 5). Dans chaque cage, on dispose pour la ponte un cristalliseur de 2 l contenant un système expérimental eau-sédiment. Pour le cristalliseur également, le rapport de l'épaisseur de la couche de sédiment à celle de l'eau sus-jacente doit être à peu près égal à 1/4. Après avoir collecté les amas d'œufs dans le cristalliseur, on les transfère sur une plaque de microtitration à 12 puits (un amas par puits contenant au moins 2,5 ml d'eau prélevée dans le cristalliseur chargé), sur laquelle on place ensuite un couvercle afin d'éviter une trop forte évaporation. D'autres récipients peuvent également convenir pour recevoir les amas d'œufs. À l'exception des plaques de microtitration, tous les récipients et les autres appareils qui entreront en contact avec le système d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte (polytétrafluoroéthylène, par exemple).

Sélection des espèces

12. *Chironomus riparius* est l'espèce qui convient le mieux. *C. yoshimatsui* convient également. *C. dilutus* peut aussi être utilisé, mais il est plus difficile à manipuler et nécessite une période d'essai plus longue. La méthode de culture de *C. riparius* est détaillée à l'Appendice 2. On dispose également d'informations sur les conditions de culture de *C. dilutus* (5) et *C. yoshimatsui* (14). L'identification des espèces est à confirmer avant l'essai, mais n'est pas requise avant chaque essai si les organismes ont été cultivés sur place.

Sédiment

13. Il est préférable d'employer un sédiment reconstitué (également dénommé sédiment artificiel ou synthétique). Néanmoins, si l'on opte pour un sédiment naturel, il convient de le caractériser, au moins quant au pH et à la teneur en carbone organique (la détermination d'autres paramètres, tels que le rapport C/N et la granulométrie est aussi recommandée), et de s'assurer qu'il n'est pas contaminé et n'abrite pas d'autres organismes qui pourraient entrer en compétition avec les larves de chironomes ou les consommer. Avant d'utiliser un sédiment naturel dans un essai, il est également recommandé de le maintenir durant sept jours dans des conditions identiques à celles de l'essai. Il est recommandé d'utiliser le sédiment reconstitué suivant, tel que décrit en (1) (20) (21):
 - a. 4-5 % (poids sec) de tourbe, avec un pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0; il importe d'utiliser une tourbe en poudre, finement broyée (dimension des particules ≤ 1 mm) et séchée uniquement à l'air;
 - b. 20 % (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %);

(¹) À 20 °C et à la pression atmosphérique standard, la VSA de l'eau douce est de 9,1 mg/l (60 % représentant 5,46 mg/l)

- c. 75-76 % (poids sec) de sable quartzique (composé en majorité de sable fin, plus de 50 % des particules mesurant entre 50 et 200 μm);
 - d. Ajouter de l'eau désionisée jusqu'à ce que la teneur en humidité du mélange final soit comprise entre 30 et 50 %;
 - e. Ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure (CaCO_3) afin d'ajuster le pH du mélange final de sédiments à $7,0 \pm 0,5$;
 - f. Il convient d'obtenir 2 % ($\pm 0,5$ %) de carbone organique dans le mélange final en y ajoutant les quantités appropriées de tourbe et de sable, comme indiqué en (a) et en (c).
14. Les sources de tourbe, d'argile kaolinique et de sable doivent être connues. On vérifiera que les composants du sédiment ne sont pas contaminés par des substances chimiques (métaux lourds, composés organochlorés, composés organophosphorés, etc.). Un exemple de préparation de sédiment reconstitué est décrit à l'Appendice 3. Les composants du sédiment peuvent aussi être mélangés à l'état sec, à condition de démontrer qu'ils ne se séparent pas après l'ajout de l'eau sus-jacente (flottement de particules de tourbe, par exemple) et que la tourbe ou le sédiment sont suffisamment conditionnés.

Eau

15. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable selon les critères spécifiés aux annexes 2 et 4 convient à l'essai. Toute eau appropriée, naturelle (eau superficielle ou souterraine), reconstituée (voir Appendice 2) ou eau du robinet déchlorée, est acceptable comme eau de culture et d'essai, si les chironomes y survivent sur toute la durée de la culture et de l'essai sans manifester de signes de stress. Au début de l'essai, le pH de l'eau d'essai se situera entre 6 et 9 et sa dureté totale ne dépassera pas 400 mg/l en CaCO_3 . Néanmoins, si l'on suspecte une interaction entre les ions de dureté et la substance chimique d'essai, il faut utiliser une eau moins dure (auquel cas le milieu Elendt M4 ne pourra pas être utilisé). Le même type d'eau doit être utilisé tout au long de l'étude. Les caractéristiques de qualité de l'eau énumérées à l'Appendice 4 sont à mesurer au moins deux fois par an ou chaque fois qu'elles sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées.

Solutions-mères — eau chargée

16. a. Les concentrations expérimentales sont calculées en fonction des concentrations dans la colonne d'eau surmontant le sédiment. Les solutions d'essai sont généralement préparées aux concentrations choisies par dilution d'une solution-mère. Il est préférable de préparer les solutions-mères en dissolvant la substance chimique d'essai dans l'eau d'essai. Dans certains cas, il sera nécessaire d'utiliser des solvants ou des dispersants pour obtenir une solution-mère à la concentration voulue. Parmi les solvants appropriés, on peut citer l'acétone, l'éther monométhyle d'éthylène-glycol, l'éther diméthyle d'éthylène-glycol, le diméthylformamide et le triéthylène-glycol. Parmi les dispersants appropriés, citons le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 % et le HCO-40. La concentration de l'agent solubilisant dans le milieu d'essai final doit être minimale ($\leq 0,1$ ml/l) et identique dans tous les traitements. En cas d'utilisation d'un agent solubilisant, celui-ci ne doit avoir aucun effet significatif sur la survie des chironomes, ce qui pourra être démontré par la comparaison d'un témoin solvant avec un témoin négatif (eau). Il faut cependant s'efforcer, dans toute la mesure du possible, d'éviter d'utiliser ces produits.

Solutions-mères — sédiment chargé

16. b. On prépare généralement les sédiments chargés à la concentration souhaitée en ajoutant directement une solution de la substance chimique d'essai au sédiment. Une solution-mère de la substance d'essai dissoute dans de l'eau désionisée est mélangée au sédiment reconstitué à l'aide d'un laminoir, d'un mélangeur d'aliments ou mélangée à la main. Si la substance chimique d'essai est peu soluble dans l'eau, elle peut être dissoute dans un volume aussi faible que possible d'un solvant organique adéquat (hexane, acétone ou chloroforme, par exemple). Cette solution est ensuite mélangée à 10 g de sable quartzique fin par récipient expérimental. Il faut attendre que le solvant s'évapore jusqu'à être totalement éliminé du sable; le sable est ensuite mélangé avec la quantité appropriée de sédiment. Seuls des agents très volatils peuvent être utilisés pour solubiliser, disperser ou émulsifier la substance chimique d'essai. On n'oubliera pas de tenir compte de

la quantité de sable apportée avec le mélange de substance d'essai et de sable lors de la préparation du sédiment (ce dernier sera préparé avec moins de sable). Il faudra veiller à mélanger complètement la substance d'essai au sédiment et à l'y répartir uniformément. Si nécessaire, on analysera des sous-échantillons afin de déterminer le degré d'homogénéité.

PROTOCOLE D'ESSAI

17. Le protocole d'essai définit le nombre et l'espacement des concentrations expérimentales, le nombre de récipients par concentration, le nombre de larves par récipient, et le nombre de cristallisoirs et de cages d'élevage. La marche à suivre pour établir la CE_x et la CSEO et pour réaliser un essai limite est décrite ci-dessous.

Conduite d'une analyse de régression

18. L'essai doit couvrir la concentration efficace (CE_x) et la gamme de concentrations auxquelles la substance chimique d'essai produit un effet intéressant, de façon à ce que l'effet observé ne soit pas extrapolé hors des limites des données générées. On évitera d'extrapoler des résultats très en dessous de la concentration la plus faible ou au-dessus de la concentration la plus forte. Il pourra être utile de réaliser un essai préliminaire de détermination des concentrations d'essai, conformément à la méthode d'essai C.27 ou C.28, de façon à définir la gamme des concentrations à utiliser.
19. Pour estimer la CE_x , un minimum de cinq concentrations et huit réplicats par concentration sont nécessaires. Pour chaque concentration, deux cages d'élevage seront utilisées (A et B). Les huit réplicats sont scindés en deux groupes de quatre réplicats (un groupe par cage). Ce regroupement des réplicats est nécessaire en raison du nombre de moucheron à atteindre dans les cages pour obtenir des évaluations fiables de leur reproduction. La 2^{ème} génération compte aussi huit réplicats, obtenus à partir des populations exposées dans les cages d'élevage. Le facteur séparant les concentrations ne doit pas excéder deux (une exception peut être faite si la courbe dose-effet présente une pente faible). Le nombre de réplicats par traitement peut être ramené à six (trois pour chaque cage d'élevage) si le nombre de concentrations expérimentales entraînant différents effets est augmenté. L'augmentation du nombre d'expériences identiques ou la diminution des écarts entre les concentrations expérimentales tend à réduire les intervalles de confiance autour de la CE_x .

Procédure d'estimation d'une CSEO

20. Pour estimer la CSEO, cinq concentrations expérimentales et au moins huit réplicats par concentration (quatre pour chaque cage d'élevage, A et B) seront nécessaires, le facteur séparant les concentrations n'excédant pas deux. Le nombre de réplicats doit être suffisant pour fournir une puissance statistique permettant de détecter une différence de 20 % avec le témoin, au seuil de signification statistique de 5 % ($\alpha = 0,05$). Pour la vitesse de développement, la fécondité et la fertilité, il est généralement utile d'effectuer une analyse de variance (ANOVA), suivie d'un test de Dunnett ou d'un test de Williams (22-25). S'agissant du taux d'émergence et du sex-ratio, le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haentzel peuvent être appropriés.

Essai limite

21. La conduite d'un essai limite peut être envisagée (sur une concentration expérimentale et un ou plusieurs témoins) si l'essai préliminaire facultatif de détermination des concentrations d'essai n'a permis d'observer aucun effet à une concentration maximale. L'essai limite a pour objet d'indiquer si des effets toxiques de la substance chimique d'essai sont décelés à des niveaux supérieurs aux concentrations limites étudiées. Les quantités recommandées sont 100 mg/l pour l'eau et 1 000 mg/kg (poids sec) pour le sédiment. Huit réplicats au moins sont généralement nécessaires pour le traitement et le témoin. Une puissance statistique suffisante pour détecter une différence de 20 % avec le témoin au seuil de signification statistique de 5 % ($\alpha = 0,05$) devrait être démontrée. Pour les mesures métriques (par exemple, la vitesse de développement), le test t constitue une méthode statistique appropriée si les données répondent aux critères de ce test (normalité, variances homogènes). Un test t de variance inégale ou bien un test non paramétrique tel que le test de Wilcoxon-Mann-Whitney peuvent être employés lorsque ces conditions ne sont pas satisfaites. S'agissant du taux d'émergence, le test exact de Fisher est approprié.

PROCÉDURE

Conditions d'exposition*Préparation du système eau-sédiment (eau chargée)*

- 22.a. Un sédiment reconstitué (voir paragraphes 13-14 et Appendice 3) est introduit dans chaque récipient expérimental et dans le cristallisateur de façon à former une couche d'au moins 1,5 cm (qui peut être un peu moins épaisse dans le cristallisateur) et d'au plus 3 cm. L'eau (voir paragraphe 15) est ensuite versée de manière à ce que le rapport de l'épaisseur de la couche de sédiment à celle de la couche d'eau ne dépasse pas 1/4. Une fois la préparation des récipients expérimentaux achevée, le système sédiment-eau doit être soumis à une légère aération pendant environ sept jours avant l'introduction des chironomes au premier stade larvaire de la 1^{ère} ou de la 2^{ème} génération (voir paragraphe 14 et Appendice 3). Le système sédiment-eau des cristallisoirs n'est pas aéré au cours de l'essai, car il n'a pas à assurer la survie des larves (avant l'éclosion, les amas d'œufs sont déjà collectés). Afin d'éviter la séparation des ingrédients du sédiment et la remise en suspension des particules fines lors du remplissage de la colonne d'eau, on peut recouvrir le sédiment d'un disque en plastique durant cette opération et retirer le disque juste après. D'autres dispositifs peuvent aussi convenir.

Préparation du système eau-sédiment (sédiment chargé)

- 22.b. On dépose les sédiments chargés, préparés comme indiqué au paragraphe 16b, au fond des récipients et du cristallisateur avant d'y verser l'eau sus-jacente, de façon à obtenir un rapport volumique sédiment-eau de 1/4. La profondeur de la couche de sédiment doit être comprise entre 1,5 et 3 cm (elle peut être légèrement inférieure dans le cristallisateur). Afin d'éviter la séparation des ingrédients du sédiment et la remise en suspension des particules fines lors du remplissage de la colonne d'eau, on peut recouvrir le sédiment d'un disque en plastique durant cette opération et retirer le disque juste après. D'autres dispositifs peuvent aussi convenir. Une fois préparé le sédiment chargé surmonté d'une couche d'eau, il est souhaitable de laisser la substance d'essai se répartir entre la phase aqueuse et le sédiment (4) (5) (7) (18), de préférence dans les mêmes conditions de température et d'aération que durant l'essai. La durée d'équilibrage appropriée dépend du sédiment et de la substance chimique; elle peut être de l'ordre de quelques heures à quelques jours, et dans de rares cas atteindre cinq semaines. Il ne faut pas attendre que l'équilibre soit atteint car de nombreuses substances auraient le temps de se dégrader, mais une période d'équilibrage de 48 heures est recommandée. Toutefois, s'il est connu que la demi-vie de la substance chimique dans le sédiment est longue (voir paragraphe 8), la durée d'équilibrage peut être allongée. Au terme de cette période d'équilibrage, on mesure la concentration de la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, l'eau interstitielle et le sédiment, au moins pour la concentration la plus élevée et une concentration plus faible (voir paragraphe 38). Ces déterminations analytiques de la substance chimique d'essai permettent de calculer le bilan massique et d'exprimer les résultats en fonction des concentrations mesurées.
23. Les récipients expérimentaux sont couverts (par des plaques de verre, par exemple). Si nécessaire, on remplace les volumes d'eau évaporée durant l'étude avec de l'eau distillée ou désionisée afin d'empêcher l'accumulation de sels. Les cristallisoirs placés dans les cages d'élevage ne sont pas couverts. Il est possible, mais pas indispensable, de remplacer l'eau perdue au cours de la durée de l'essai, puisque les amas d'œufs n'y sont en contact avec l'eau que pendant un jour environ, et que les cristallisoirs ne sont utilisés que pendant une courte phase de l'essai.

Introduction des organismes expérimentaux

24. Quatre à cinq jours avant l'introduction des larves du premier stade de la 1^{ère} génération, les amas d'œufs sont prélevés dans la culture et placés dans de petits récipients contenant du milieu de culture. Il est possible d'utiliser un milieu plus ancien issu de la culture-mère ou un milieu fraîchement préparé. Dans les deux cas, on ajoutera au milieu de culture une petite quantité de nourriture, par exemple quelques gouttelettes de filtrat d'une suspension de paillettes pour poissons finement broyées (voir Appendice 2). Seuls des amas d'œufs fraîchement pondus peuvent être utilisés. Normalement, les larves commencent à éclore quelques jours après la ponte (2 à 3 jours pour *C. riparius* à 20 °C, et 1 à 4 jours pour *C. dilutus* à 23 °C et *C. yoshimatsui* à 25 °C) et le développement des larves se déroule en quatre stades, chacun d'une durée de 4 à 8 jours. L'essai doit être réalisé avec des chironomes au premier stade larvaire (maximum 48 h après éclosion). Il est possible de vérifier le stade de développement des larves d'après la largeur de la capsule céphalique (7).

25. Vingt larves du premier stade de la première génération, choisies au hasard, sont déposées à l'aide d'une pipette émuissée dans chaque récipient contenant le système sédiment-eau. L'aération de l'eau est interrompue pendant 24 heures à compter de l'introduction des larves de premier stade dans les récipients expérimentaux (voir paragraphe 32). Selon le protocole expérimental suivi (voir paragraphes 19 et 20), le nombre de larves utilisées par concentration sera d'au moins 120 (6 réplicats par concentration) pour la détermination de la CE_x et 160 pour la CSEO (8 réplicats par concentration). Dans le protocole d'essai avec sédiment chargé, l'exposition débute lors de l'introduction des larves.

Chargement de l'eau sus-jacente

26. Vingt-quatre heures après l'introduction des chironomes au premier stade larvaire de la 1^{ère} génération dans les récipients expérimentaux, la substance d'essai est ajoutée à la colonne d'eau sus-jacente qui est de nouveau soumise à une légère aération (pour les modifications possibles du protocole d'essai, voir paragraphe 7). De faibles volumes des solutions-mères de la substance chimique d'essai sont injectés à l'aide d'une pipette sous la surface de l'eau. Ensuite, on mélange doucement l'eau sus-jacente en prenant soin de ne pas remuer le sédiment. Dans le protocole d'essai avec eau chargée, l'exposition débute avec l'ajout de la substance dans l'eau (c'est à dire un jour après l'introduction des larves).

Collecte des adultes émergés

27. Les moucheron émergés de la 1^{ère} génération sont collectés au moins une fois, mais de préférence deux fois, par jour (voir paragraphe 36) dans les récipients expérimentaux à l'aide d'un aspirateur, d'un extracteur ou d'un autre dispositif similaire (voir Appendice 5). Il convient de prendre toutes les précautions nécessaires pour ne pas endommager les adultes. Les moucheron prélevés dans les quatre récipients expérimentaux ayant reçu le même traitement sont transférés dans la cage d'élevage qui leur a été attribuée préalablement. Le jour où apparaissent les premiers moucheron (mâles), on charge les cristallisoirs en injectant à l'aide d'une pipette un faible volume de la solution-mère de substance d'essai sous la surface de l'eau (protocole avec eau chargée). Ensuite, on mélange doucement l'eau sus-jacente en prenant soin de ne pas remuer le sédiment. La valeur nominale de la concentration de substance chimique d'essai est la même dans le cristallisoir que dans les récipients de traitement associés à cette cage d'élevage précise. Dans le protocole avec sédiment chargé, les cristallisoirs sont préparés vers le 11^{ème} jour après le début de l'exposition (c'est-à-dire à compter de l'introduction de la 1^{ère} génération de larves), de façon à ce que l'équilibrage soit achevé environ 48 heures avant la ponte des premiers amas d'œufs.
28. Les amas d'œufs sont collectés dans les cristallisoirs de la cage d'élevage à l'aide de pinces ou d'une pipette émuissée. Chaque amas est placé dans un récipient contenant un milieu de culture provenant du cristallisoir d'origine de l'amas (par exemple l'un des 12 puits d'une plaque de microtitration avec au moins 2,5 ml de milieu). Les récipients contenant les amas sont fermés par un couvercle afin d'éviter une évaporation importante. Les amas sont gardés en observation pendant 6 jours au minimum après la ponte, afin que l'on puisse les classer comme fertiles ou stériles.

Pour démarrer la 2^{ème} génération, on choisit dans chaque cage d'élevage trois amas d'œufs fertiles au minimum, mais de préférence six, que l'on laisse éclore en présence d'un peu de nourriture. Ces amas devront avoir été produits lors du pic de ponte, qui intervient normalement autour du 19^{ème} jour d'essai dans les récipients témoins. Dans l'idéal, tous les traitements sur la 2^{ème} génération démarrent le même jour, mais en raison des effets liés aux substances chimiques d'essai sur le développement des larves, cela n'est pas toujours possible. Dans ce cas, mieux vaut lancer les traitements aux concentrations plus élevées après les traitements plus faibles et le témoin (solvant).

- 29.a. Dans le protocole avec eau chargée, le système sédiment-eau destiné à la 2^{ème} génération se prépare en ajoutant la substance chimique d'essai dans la colonne d'eau sus-jacente environ 1 heure avant d'introduire les larves de premier stade dans les récipients expérimentaux. De faibles volumes des solutions contenant la substance d'essai sont injectés sous la surface de la colonne d'eau à l'aide d'une pipette. Ensuite, on mélange doucement l'eau sus-jacente en prenant soin de ne pas remuer le sédiment. Une fois la substance ajoutée, on procède à une légère aération.
- 29.b. Dans le protocole avec sédiment chargé, les récipients d'exposition contenant le système sédiment-eau pour la 2^{ème} génération sont préparés de la même façon que ceux de la 1^{ère} génération.
30. Vingt larves de premier stade (48 heures maximum après éclosion) de la 2^{ème} génération, choisies au hasard, sont déposées à l'aide d'une pipette émuissée dans chaque récipient expérimental contenant le système

eau-sédiment chargé. L'aération de l'eau doit être interrompue pendant au moins 24 heures à compter de l'introduction des larves de premier stade dans les récipients expérimentaux. Selon le protocole expérimental suivi (voir paragraphes 19 et 20), le nombre de larves utilisées par concentration sera d'au moins 120 (6 réplicats par concentration) pour la détermination de la CE_x et 160 pour la CSEO (8 réplicats par concentration).

Nourriture

31. Les larves ont besoin d'être nourries dans les récipients expérimentaux, de préférence quotidiennement ou au moins trois fois par semaine. Durant les dix premiers jours, chaque jeune larve reçoit quotidiennement 0,25 à 0,5 mg (0,35-0,5 mg pour *C. yoshimatsui*) de nourriture pour poissons (en suspension dans l'eau ou finement broyée, par exemple Tetra-Min ou Tetra-phyll; voir les détails à l'Appendice 2). Il peut être nécessaire d'augmenter légèrement cette quantité pour les larves plus âgées: 0,5 — 1,0 mg par larve et par jour devrait suffire pour le reste de l'essai. On diminue la ration alimentaire de tous les organismes traités et témoins si l'on constate le développement de champignons ou en cas de mortalité parmi les organismes témoins. Si la croissance fongique ne peut être enrayée, l'essai est à recommencer.

La pertinence toxicologique de l'exposition par ingestion est généralement plus grande pour les substances chimiques possédant une forte affinité pour le carbone organique ou les substances formant des liaisons de covalence avec le sédiment. Ainsi, lors d'essais sur des substances présentant de telles propriétés, la quantité de nourriture nécessaire à la survie et à la croissance naturelle des larves peut être incorporée au sédiment reconstitué avant la période de stabilisation, en fonction de la réglementation imposée. Afin d'éviter de détériorer la qualité de l'eau, la nourriture pour poissons est remplacée par une ration végétale, par exemple 0,5 % (poids sec) de feuilles finement broyées d'ortie (*Urtica dioeca*), de mûrier (*Morus alba*), de trèfle blanc (*Trifolium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*) ou d'un autre matériel végétal (*Cerophyl* ou α -cellulose). Incorporer toute la ration alimentaire d'origine organique au sédiment avant d'ajouter la substance d'essai n'est pas sans conséquence sur la qualité et les performances biologiques de l'eau (21), et ne constitue pas non plus une méthode normalisée; toutefois de récentes études indiquent que cette méthode fonctionne (19) (26). Les moucheron adultes de la cage d'élevage n'ont en principe pas besoin d'être nourris, mais la fécondité et la fertilité augmentent si l'on propose aux adultes émergés un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucre saturée (34).

Conditions d'incubation

32. L'eau sus-jacente des récipients expérimentaux est soumise à une légère aération, mise en route 24 heures après l'introduction des larves du premier stade des deux générations, et maintenue jusqu'à la fin de l'essai (il faut veiller à ce que la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 60 % de la VSA). L'air est insufflé à l'aide d'une pipette Pasteur en verre dont l'extrémité est fixée 2 à 3 cm au-dessus de la couche de sédiment et délivre quelques bulles par seconde. Si la substance chimique d'essai est volatile, on pourra éventuellement supprimer l'aération du système sédiment-eau, à condition de respecter le critère de validité de 60 % de la VSA (voir paragraphe 10). D'autres indications sont données à la référence (16).
33. L'essai sur *C. riparius* est mené à une température constante de 20 °C (± 2 °C). Pour *C. dilutus* et *C. yoshimatsui*, les températures recommandées sont respectivement de 23 °C et 25 °C (± 2 °C). La photopériode est de 16 heures et l'intensité lumineuse comprise entre 500 et 1 000 lux. Une phase supplémentaire d'une heure créant l'aube et le crépuscule peut être prévue pour les cages d'élevage.

Temps d'exposition

34. Protocole avec eau chargée: la période d'exposition de la 1^{ère} génération commence lorsque la substance d'essai est injectée dans l'eau sus-jacente des récipients expérimentaux (c'est-à-dire un jour après l'introduction des larves; voir au paragraphe 7 les modifications possibles du protocole d'exposition). L'exposition de la 2^{ème} génération de larves débute immédiatement, car elles sont introduites dans un système sédiment-eau déjà chargé. Pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, le temps d'exposition maximal est de 27 jours pour la 1^{ère} génération, et de 28 jours pour la 2^{ème} génération (les larves de la 1^{ère} génération passent une journée dans les récipients sans exposition). Compte tenu du chevauchement des deux expositions, la durée totale de l'essai est d'environ 44 jours. Pour *C. dilutus*, les durées maximales d'exposition sont de 64 et 65 jours respectivement pour la 1^{ère} et la 2^{ème} génération. Au total, l'essai dure environ 100 jours.

Protocole avec sédiment chargé: l'exposition débute avec l'introduction des larves et dure au maximum 28 jours pour les deux générations de *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, et 65 jours au maximum pour les deux générations de *C. dilutus*.

Observations

Émergence

35. La durée du développement et le nombre total de mouchérons mâles et femelles adultes totalement émergés et vivants sont à déterminer pour les deux générations. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses et leur corps fin.
36. Au moins trois fois par semaine, on vérifie que les larves des récipients expérimentaux des deux générations ne manifestent aucun comportement anormal (sortie du sédiment, nage inhabituelle, par exemple) par rapport aux témoins. Au cours de la période d'émergence, qui débute environ 12 jours après l'introduction des larves pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* (20 jours après pour *C. dilutus*), les mouchérons émergés sont dénombrés et leur sexe est identifié au moins une fois, mais de préférence deux fois par jour (tôt le matin et en fin d'après-midi). Une fois identifiés, les mouchérons de la 1^{ère} génération sont retirés avec soin des récipients et transférés dans une cage d'élevage. Les mouchérons de la 2^{ème} génération sont retirés et tués après identification. Les amas d'œufs déposés dans les récipients expérimentaux de la 1^{ère} génération doivent être collectés individuellement et transférés avec au moins 2,5 ml d'eau de formation dans des plaques de microtitration à 12 puits (ou tout autre récipient adapté) fermées par un couvercle afin d'éviter une évaporation importante. Le nombre de larves mortes et de pupes visibles n'ayant pas émergé doit également être consigné. L'Appendice 5 présente des exemples de cage d'élevage, de récipient expérimental et d'extracteur.

Reproduction

37. On évalue les effets sur la reproduction en déterminant le nombre d'amas d'œufs produits par la 1^{ère} génération de mouchérons et la fertilité de ces amas. Une fois par jour, les amas d'œufs sont collectés dans le cristallisateur de chaque cage d'élevage, et transférés avec au moins 2,5 ml d'eau de formation dans des plaques de microtitration à 12 puits (un amas par puits) ou d'autres récipients adaptés, fermés d'un couvercle afin d'éviter une évaporation importante. Les caractéristiques suivantes doivent être consignées par écrit pour chaque amas d'œufs: jour de ponte, taille (normale, soit $1,0 \pm 0,3$ cm, ou petite, généralement $\leq 0,5$ cm), structure (normale = en forme de croissant avec cordon d'œufs spiralé, ou anormale, par exemple avec cordon non spiralé) et fertilité (fertile ou stérile). Sur une période de six jours après sa ponte, la fertilité de chaque amas d'œufs est évaluée. Un amas est considéré comme fertile lorsqu'au moins un tiers des œufs éclot. Le nombre total de femelles transférées dans la cage d'élevage sert à calculer le nombre d'amas d'œufs par femelle, et le nombre d'amas fertiles par femelle. Si nécessaire, le nombre d'œufs par amas peut être estimé de manière non destructive par la méthode des anneaux (expliquée dans les références 32 et 33).

Mesures analytiques

Concentration de la substance chimique d'essai

38. Il est recommandé d'analyser, au minimum, des échantillons de l'eau sus-jacente, de l'eau interstitielle et du sédiment au début de l'exposition (en cas d'eau chargée, de préférence une heure après l'application) et à la fin de l'essai, et ce pour la concentration la plus élevée et pour une concentration plus faible. Cette recommandation s'applique aux récipients des deux générations. Dans les cristallisoirs de la cage d'élevage, seule l'eau sus-jacente est analysée, car c'est avec elle que les amas d'œufs entrent en contact (pour le protocole avec sédiment chargé, une confirmation analytique de la concentration sédimentaire peut être envisagée). Si cela est jugé nécessaire, d'autres mesures concernant le sédiment, l'eau interstitielle et l'eau sus-jacente peuvent être effectuées au cours de l'essai. La concentration de la substance d'essai nous renseigne sur le comportement et la répartition de la substance d'essai dans le système eau-sédiment. Des échantillons de sédiment et d'eau interstitielle devant être prélevés au début et au cours de l'essai (voir paragraphe 39), on prévoira des récipients expérimentaux supplémentaires afin de réaliser les déterminations analytiques. Il n'est pas forcément nécessaire d'analyser le sédiment dans le protocole avec eau chargée si la répartition de la substance chimique d'essai entre l'eau et le sédiment a été clairement déterminée par une étude eau/sédiment menée dans des conditions comparables (par exemple, rapport sédiment/eau, type d'application, teneur en carbone organique du sédiment), ou si les concentrations mesurées dans l'eau sus-jacente restent comprises entre 80 et 120 % des valeurs nominales ou mesurées initialement.
39. Lorsqu'on effectue des mesures intermédiaires (par exemple au 7^{ème} et/ou 14^{ème} jour) et si l'analyse requiert des échantillons volumineux qui ne peuvent être prélevés des récipients sans influencer le système expérimental, les analyses seront pratiquées sur des échantillons provenant de récipients expérimentaux supplémentaires traités de la même façon (y compris par la présence des organismes d'expérience), mais non utilisés pour les observations biologiques.

40. Pour isoler l'eau interstitielle, il est recommandé de centrifuger les échantillons à 10 000 g et à 4 °C durant 30 minutes. Cependant, s'il est démontré que la substance chimique d'essai n'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Avec des échantillons trop petits, il arrive que les concentrations dans l'eau interstitielle soient impossibles à analyser.

Paramètres physico-chimiques

41. Le pH, l'oxygène dissous dans l'eau d'essai et la température de l'eau dans les récipients expérimentaux et les cristallisoirs sont mesurés de façon appropriée (voir paragraphe 10). La dureté de l'eau et sa teneur en ammoniac sont mesurées dans les récipients témoins ainsi que dans un récipient d'essai et un cristallisoir à la concentration la plus élevée, au début et à la fin de l'essai.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

42. Cet essai sur le cycle de vie a pour objet de déterminer l'effet de la substance chimique d'essai sur la reproduction et, pour deux générations, sur la vitesse de développement et le nombre total de mouches mâles et femelles vivants complètement émergés. Pour déterminer le taux d'émergence, il faut rassembler les données concernant les mâles et les femelles. S'il n'existe pas de différence de sensibilité statistiquement significative entre les deux sexes en matière de vitesse de développement, les résultats mâles et femelles pourront être mis en commun à des fins d'analyse statistique.
43. Il est d'usage de calculer les concentrations efficaces, exprimées en concentrations dans l'eau sus-jacente (pour l'eau chargée) ou dans le sédiment (pour le sédiment chargé), en fonction des concentrations mesurées au début de l'exposition (voir paragraphe 38). Ainsi, en ce qui concerne l'eau chargée, on effectue habituellement pour chaque traitement une moyenne des concentrations initialement mesurées dans l'eau sus-jacente des récipients des deux générations et de celles des cristallisoirs. En ce qui concerne les sédiments chargés, on effectue habituellement pour chaque traitement une moyenne des concentrations initialement mesurées dans les sédiments des récipients des deux générations (et éventuellement de celles des cristallisoirs).
44. Pour calculer une estimation ponctuelle, c'est-à-dire une CE_x , les statistiques par récipient et par cage d'élevage peuvent être utilisées comme répliquats vrais. Pour calculer un intervalle de confiance pour une CE_x quelconque, il faut tenir compte de la variabilité entre les récipients, ou démontrer que celle-ci est négligeable. Si le modèle est ajusté par la méthode des moindres carrés, il convient de transformer les statistiques par récipient afin d'accroître l'homogénéité de la variance. Toutefois, les valeurs de la CE_x sont à calculer après que les résultats ont été transformés à nouveau de façon à recouvrer la valeur d'origine.
45. Si l'analyse statistique vise à déterminer la CSEO par un test d'hypothèse, il est nécessaire de prendre en compte la variabilité entre les récipients, ce que garantissent les méthodes d'analyse de la variance (procédures de Williams et Dunnett par exemple). Le test de Williams est approprié lorsque la relation dose-effet est supposée être monotone en théorie, tandis que le test de Dunnett convient si l'hypothèse de la monotonie ne tient pas. En revanche, des tests plus robustes (27) peuvent être utilisés au cas où les hypothèses habituelles de l'analyse de variance (ANOVA) ne se vérifient pas (31).

Taux d'émergence

46. Les données relatives au taux d'émergence sont des données quantales, qui peuvent être analysées par le test de Cochran-Armitage appliqué de façon régressive si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Dans le cas contraire, un test exact de Fisher ou un test de Mantel-Haentzel avec des valeurs de p corrigées selon Bonferroni-Holm peuvent être employés. S'il s'avère que la variabilité entre répliquats à la même concentration est supérieure à ce qu'une distribution binomiale indiquerait (variation souvent qualifiée d'"extra-binomiale"), on appliquera un test plus robuste (Cochran-Armitage ou test exact de Fisher) comme proposé à la référence (27).

La somme des moucheron (mâles et femelles) vivants émergés par récipient, n_e , est déterminée et divisée par le nombre de larves introduites, n_a :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

Où:

TE = Taux d'émergence

n_e = nombre de moucheron vivants émergés par récipient

n_a = nombre de larves introduites par récipient (normalement 20)

Lorsque n_e est supérieur à n_a (c'est-à-dire lorsqu'involontairement, un nombre de larves plus important que prévu a été introduit), n_a doit être augmenté pour être égal à n_e .

47. Une autre approche plus appropriée aux échantillons de grande taille, lorsque la variance est extra-binomiale, consiste à traiter le taux d'émergence comme une réponse continue et à appliquer une méthode cohérente avec ces données du TE . On considère ici qu'un échantillon est de grande taille lorsque le nombre de moucheron émergés et le nombre de chironomes non émergés sont tous deux supérieurs à cinq par (récipient de) répliat.
48. Avant d'appliquer l'analyse de variance (ANOVA), il faut d'abord transformer les valeurs du TE par arcsinus-racine carrée ou selon Tukey-Freeman, afin d'obtenir une distribution proche de la normale et d'égaliser les variances. Le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haentzel peuvent être employés lorsqu'on utilise les fréquences absolues. La transformation arcsinus-racine carrée consiste à calculer le sinus inverse ($\sin^{-1}$) de la racine carrée du TE .
49. Pour les taux d'émergence, les valeurs de la CE_x sont calculées au moyen d'une analyse de régression [modèles probit, logit ou Weibull (28), par exemple]. Si l'analyse de régression échoue (par exemple, lorsqu'il y a moins de deux réponses partielles), on fait appel à d'autres méthodes non paramétriques telles que la moyenne mobile ou l'interpolation simple.

Vitesse de développement

50. La période moyenne de développement correspond au temps moyen écoulé entre l'introduction des larves (jour 0 de l'essai) et l'émergence de la cohorte expérimentale de moucheron (pour calculer la période réelle de développement, il faut tenir compte de l'âge des larves au moment de l'introduction). La vitesse de développement est l'inverse de la période de développement (unité: 1/jour) et correspond à la portion de développement larvaire qui s'effectue par jour. Pour évaluer la toxicité dans les sédiments, il est préférable de choisir la vitesse de développement car sa variance est plus faible et ses valeurs sont plus homogènes et plus proches d'une distribution normale, en comparaison avec la période de développement. C'est pourquoi des tests paramétriques plus puissants conviennent mieux à la vitesse de développement qu'à la période de développement. Si la vitesse de développement est traitée comme une réponse continue, les valeurs de la CE_x peuvent être estimées par une analyse de régression [voir (29) (30)]. Les méthodes d'analyse de la variance (ANOVA), telles que les essais de Williams ou Dunnett, permettent de déterminer une CSEO pour la vitesse moyenne de développement. Les moucheron mâles émergeant plus tôt que les femelles, et présentant donc une vitesse de développement plus rapide, il est pertinent de calculer la vitesse de développement de chacun des sexes, en plus de celle de l'ensemble des moucheron.
51. Pour les tests statistiques, les moucheron observés le jour x sont considérés comme ayant émergé au milieu de l'intervalle de temps compris entre le jour x et le jour $x - 1$ (1 = longueur de l'intervalle d'observation, habituellement 1 jour). La vitesse de développement moyenne par récipient ($\bar{x}$) est calculée comme suit:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i X_i}{n_e}$$

Où:

$\bar{x}$: vitesse de développement moyenne par récipient

i : indice de l'intervalle d'observation

m : nombre maximal d'intervalles d'observation

f_i : nombre de moucheron émergés durant l'intervalle d'observation i

n_e : nombre total de moucheron émergés à la fin de l'expérience (Σf_i)

x_i : vitesse de développement des moucheron émergés durant l'intervalle i

$$x_i = 1 / \text{jour}_i - \frac{l_i}{2}$$

Où:

jour_i : jour d'observation (nombre de jours depuis l'introduction des larves)

l_i : longueur de l'intervalle d'observation i (exprimée en jours, habituellement 1 jour)

Sex ratio

52. Les données relatives au sex-ratio sont des données quantales qui doivent donc être évaluées au moyen d'un test exact de Fisher ou d'autres méthodes appropriées. Le sex-ratio naturel de *C. riparius* est de un, c'est-à-dire que le nombre de mâles est égal au nombre de femelles. Le sex-ratio doit être calculé de la même manière pour les deux générations. Le nombre maximum de moucheron par récipient (soit 20) étant trop faible pour permettre des analyses statistiques significatives, on additionnera le nombre total de moucheron complètement émergés et vivants de chaque sexe dans tous les récipients d'un même traitement. Ces données brutes sont comparées au témoin (solvant) ou aux résultats des témoins groupés dans un tableau à double entrée (2×2).

Reproduction

53. La reproduction, tout comme la fécondité, est calculée comme le nombre d'amas d'œufs par femelle. Plus précisément, le nombre total d'amas d'œufs produits dans une cage d'élevage est divisé par le nombre total de femelles vivantes et en bonne santé introduites dans cette cage. Il est possible de déterminer une CSEO pour la fécondité en utilisant des méthodes d'analyse de variance (ANOVA) telles que le test de Williams ou de Dunnett.
54. La fertilité des amas d'œufs sert à quantifier le nombre d'amas fertiles par femelle. Le nombre total d'amas fertiles produits dans une cage d'élevage est divisé par le nombre total de femelles vivantes et en bonne santé introduites dans cette cage. Il est possible de déterminer une CSEO pour la fertilité en utilisant des méthodes d'analyse de variance (ANOVA) telles que le test de Williams ou de Dunnett.

Rapport d'essai

55. Le rapport d'essai doit fournir les informations suivantes:

Substance d'essai

- état physique et propriétés physico-chimiques [par exemple, hydrosolubilité, pression de vapeur, $\log K_{oc}$, coefficient de partage dans le sol (ou dans le sédiment s'il est connu), stabilité dans l'eau et dans le sédiment, etc.];
- identification chimique (nom courant, nom chimique, formule structurale, numéro CAS, etc.), pureté et méthode analytique de dosage de la substance d'essai.

Espèces d'essai:

- organismes utilisés pour l'essai: espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage;
- informations sur la manipulation des amas d'œufs et des larves;

- informations sur la manipulation des adultes émergés de la 1^{ère} génération à l'aide d'un extracteur ou autre appareil (voir Appendice 5);
- âge des organismes d'essai au moment de leur introduction dans les récipients expérimentaux de la 1^{ère} et de la 2^{ème} générations.

Conditions de l'essai:

- sédiment utilisé, c'est-à-dire naturel ou reconstitué (artificiel);
- pour les sédiments naturels: localisation et description du site de prélèvement avec, si possible, son historique de contamination; caractéristiques du sédiment: pH, teneur en carbone organique, rapport C/N et granulométrie (s'il y a lieu);
- pour les sédiments reconstitués: préparation, ingrédients et caractéristiques (teneur en carbone organique, pH, humidité, etc. mesurés au début de l'essai);
- préparation de l'eau d'essai (si l'eau est reconstituée) et caractéristiques (concentration d'oxygène, pH, dureté, etc. mesurés au début de l'essai);
- profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente dans les récipients expérimentaux et les cristallisoirs;
- volume d'eau sus-jacente et d'eau interstitielle; poids du sédiment humide avec et sans eau interstitielle dans les récipients expérimentaux et les cristallisoirs;
- récipients expérimentaux (matériau et dimension);
- cristallisoirs (matériau et dimension);
- cages d'élevage (matériau et dimension);
- méthode de préparation des solutions-mères et concentrations d'essai pour les récipients expérimentaux et les cristallisoirs;
- application de la substance d'essai dans les récipients d'essai et les cristallisoirs: concentrations d'essai, nombre de réplicats et solvants, si nécessaire;
- conditions d'incubation des récipients d'essai: température, cycle et intensité de lumière, aération (nombre de bulles par seconde);
- conditions d'incubation pour les cages d'élevage et les cristallisoirs: température, cycle et intensité de lumière;
- conditions d'incubation pour les amas d'œufs dans les plaques de microtitration (ou autres récipients): température, cycle et intensité de lumière;
- informations détaillées sur la nourriture, notamment: type, préparation, quantité et régime d'administration.

Résultats:

- concentrations d'essai nominales, concentrations d'essai mesurées et résultats de toutes les analyses conduites pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans les récipients expérimentaux et les cristallisoirs;
- qualité de l'eau dans les récipients expérimentaux et les cristallisoirs: pH, température, oxygène dissous, dureté et teneur en ammoniac;
- remplacement de l'eau d'essai évaporée dans les récipients expérimentaux, le cas échéant;
- nombre de moucheron mâles et femelles émergés par récipient et par jour pour la 1^{ère} et la 2^{ème} générations;
- sex-ratio des moucheron entièrement émergés et vivants par traitement pour la 1^{ère} et la 2^{ème} générations;
- nombre de larves non émergées sous la forme de moucheron par récipient pour la 1^{ère} et la 2^{ème} génération;
- pourcentage/fraction d'émergence par réplicat et concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucheron mâles et femelles) pour la 1^{ère} et la 2^{ème} génération;
- vitesse moyenne de développement des moucheron entièrement émergés et vivants par réplicat et par concentration d'essai (résultats séparés pour les moucheron mâles et femelles, ainsi que résultats regroupés) pour la 1^{ère} et la 2^{ème} génération;

- nombre d'amas d'œufs déposés dans les cristallisoirs par cage d'élevage et par jour;
- caractéristiques de chaque amas d'œufs (taille, forme et fertilité);
- fécondité — nombre total d'amas d'œufs sur nombre total de femelles introduites dans la cage d'élevage;
- fertilité — nombre total d'amas fertiles sur nombre total de femelles introduites dans la cage d'élevage;
- estimation des effets toxiques observés, par exemple CE_x (et intervalles de confiance associés), CSEO et méthodes statistiques employées pour la déterminer;
- discussion des résultats, notamment influence éventuelle sur les résultats de l'essai d'écarts par rapport à cette ligne directrice.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Chapitre C.28 de la présente annexe, Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau chargée-sédiment.
- (2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). *Entomologica Scandinavica*, 30: 311-322.
- (3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, Document de l'atelier sur l'évaluation de la toxicité des sédiments (WOSTA) tenu aux Pays-Bas.
- (5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards. Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (6) Environnement Canada (1997), Essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*) dans les sédiments, Méthode d'essai biologique, Rapport SPE 1/RM/32, Décembre 1997.
- (7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Deuxième édition, EPA 600/R-99/064. Mars 2000, Révision de la première édition (datant de juin 1994).
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.
- (10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. et R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.
- (11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 2662-2674.
- (12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, *Ecotoxicology*, 16: 221-230.
- (13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, *Jp. J. Sanit. Zool.*, 48: 345-350.
- (14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), *Jp. J. Sanit. Zool.*, 37: 47-57.
- (15) Chapitre C.27 de la présente annexe, Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment chargé.

- (16) OCDE (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Publications de l'OCDE sur l'environnement, la santé et la sécurité, Série de l'OCDE sur les essais et l'évaluations n° 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OCDE, Paris.
- (17) Weltje, L., Ruffli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, *Integr. Environ. Assess. Management*.
- (18) Environnement Canada. (1995), Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité au moyen de sédiments de contrôle dopés avec un produit toxique de référence. Rapport SPE 1/RM/30, Septembre 1995.
- (19) Oetken, M., Nentwig, G., Löffler, D., Ternes, T. et J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 353-361.
- (20) Suedel, B.C. et J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1163-1175.
- (21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, *Chemosphere*, 31: 3291-3303.
- (22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50: 1096-1121.
- (23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, 20: 482-491.
- (24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
- (25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
- (26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. *J Soils Sediments*, 9: 94-102.
- (27) Rao, J.N.K. et A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, 48: 577-585.
- (28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, *Water Res.*, 18: 213-221.
- (29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 1485-1494.
- (30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66: 298-312.
- (31) OCDE (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement, Série sur les essais et l'évaluation, Document d'orientation de l'OCDE n° 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OCDE, Paris.
- (32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. et G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1165-1176.
- (33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) — baseline experiments for future multi-generation studies, *J. Environ. Sci. Health Part A*, 42: 1-9.
- (34) OCDE (2010), *Validation report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Publication prochaine dans la série sur les essais et l'évaluation, OCDE, Paris.

*Appendice 1***Définitions**

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente méthode d'essai:

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Sédiment reconstitué, artificiel ou synthétique: mélange de matériaux utilisés pour reproduire au mieux les composants physiques d'un sédiment naturel.

Eau sus-jacente: eau surmontant le sédiment dans le récipient expérimental.

Eau interstitielle, ou eau des pores: eau qui occupe l'espace entre le sédiment et les particules de sol.

Eau chargée: eau d'essai à laquelle a été ajoutée la substance d'essai.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Appendice 2

Recommandations pour la culture de *Chironomus riparius*

1. Les larves de *Chironomus* peuvent être élevées dans des cristallisoirs ou de grands récipients. Du sable quartzique fin est déposé en couche mince (environ 5 à 10 mm d'épaisseur) au fond du récipient. Le Kieselguhr (par exemple l'art. 8117 de Merck) convient aussi comme substrat (une couche encore plus mince de quelques millimètres à peine suffit). Une eau de qualité appropriée, profonde de plusieurs centimètres, vient ensuite recouvrir le substrat. En cas d'évaporation, le niveau d'eau doit toujours être ramené à sa hauteur initiale, afin de prévenir toute dessiccation. L'eau peut être remplacée si nécessaire. Une légère aération est fournie. Les récipients d'élevage des larves doivent être placés dans des cages appropriées, afin d'empêcher la fuite des adultes émergeant. La cage sera suffisamment grande pour permettre aux adultes émergés d'essaimer, sans quoi la copulation risque de ne pas avoir lieu (dimensions minimales: 30 × 30 × 30 cm).
2. Les cages sont gardées à température ambiante, ou à 20 ± 2 °C si elles sont placées dans une chambre à ambiance constante, avec une photopériode de 16 heures de lumière (intensité: environ 1 000 lux) et 8 heures d'obscurité. Une humidité relative de l'air inférieure à 60 % serait susceptible d'empêcher la reproduction.

Eau de dilution

3. Toute eau naturelle ou reconstituée appropriée peut être utilisée. De l'eau de puits, de l'eau du robinet déchlorée et un milieu artificiel (Elendt "M4" ou "M7", voir ci-après) sont souvent utilisés. L'eau est aérée avant l'emploi. Si nécessaire, on peut renouveler l'eau de culture en versant ou en siphonnant soigneusement l'eau usée des récipients expérimentaux, sans détruire les tubes larvaires.

Alimentation des larves

4. Les larves de *Chironomus* reçoivent des paillettes pour poissons (Tetra Min®, Tetra Phyll® ou une autre marque déposée équivalente), à raison d'environ 250 mg par récipient et par jour. Cette nourriture peut être administrée sous la forme d'une poudre moulue à sec ou d'une suspension dans l'eau: 1,0 g de paillettes ajoutées à 20 ml d'eau de dilution et agitées de façon à obtenir un mélange homogène. Cette préparation peut être administrée à raison d'environ 5 ml par récipient et par jour (agiter avant emploi). Les larves plus âgées peuvent en recevoir plus.
5. La nourriture est ajustée en fonction de la qualité de l'eau. Si le milieu de culture devient trouble, il convient de réduire la ration. Les quantités de nourriture données sont soigneusement notées. Une insuffisance de nourriture fera émigrer les larves vers la colonne d'eau, tandis qu'un excès de nourriture intensifiera l'activité microbienne et abaissera la concentration d'oxygène. Ces deux conditions sont susceptibles de ralentir la croissance des organismes.
6. Certaines cellules d'algues vertes (*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*, par exemple) peuvent aussi être ajoutées lors de la préparation de nouveaux récipients de culture.

Alimentation des adultes émergents

7. Certains expérimentateurs ont suggéré de nourrir les adultes émergés au moyen d'un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucrose saturée.

Émergence

8. À 20 ± 2 °C, les adultes commencent à émerger des récipients d'élevage des larves après environ 13 à 15 jours. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses et leur corps fin.

Amas d'œufs

9. Dès que des adultes sont présents dans la cage d'élevage, il faut vérifier trois fois par semaine, dans tous les récipients d'élevage de larves, si des amas d'œufs gélatineux ont été déposés. Si tel est le cas, les amas d'œufs doivent être soigneusement enlevés et transférés dans un petit récipient contenant un échantillon de l'eau d'élevage. Les amas d'œufs servent à préparer un nouveau récipient de culture (2 à 4 amas d'œufs par récipient, par exemple) ou à pratiquer des essais de toxicité.
10. Les larves du premier stade devraient éclore après 2-3 jours.

Préparation de nouveaux récipients de culture

11. Une fois que les cultures ont été lancées, il devrait être possible de préparer un nouveau récipient de culture de larves, une fois par semaine ou moins souvent, suivant les besoins de l'essai, et de retirer les récipients plus anciens après l'émergence des moucheron adultes. Ce système permet d'obtenir régulièrement un contingent d'adultes, avec une organisation minimale.

Préparation des solutions d'essai "M4" et "M7"

12. Elendt (1990) a décrit le milieu "M4". Le milieu "M7" est préparé comme le milieu "M4", sauf pour les substances indiquées au tableau 1, dont les concentrations sont quatre fois plus faibles dans le milieu "M7" que dans le milieu "M4". La solution d'essai ne doit pas être préparée selon les instructions d'Elendt et Bias (1990), car les concentrations de $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 et K_2HPO_4 indiquées pour la préparation des solutions-mères ne conviennent pas.

Préparation du milieu "M7"

13. Chaque solution-mère (I) est préparée séparément et une solution-mère combinée (II) est préparée à partir de ces solutions-mères (I) (voir tableau 1). Cinquante millilitres de la solution-mère combinée (II), additionnés de la quantité de chaque solution-mère de macronutriments indiquée au tableau 2, sont amenés à 1 litre avec de l'eau désionisée pour composer le milieu "M7". On prépare une solution-mère de vitamines en ajoutant trois vitamines à de l'eau désionisée, comme indiqué au tableau 3, et l'on verse 0,1 ml de la solution-mère combinée de vitamines au milieu "M7" final, peu avant l'emploi (la solution-mère de vitamines est stockée congelée par petites aliquotes). Le milieu est aéré et stabilisé.

Tableau 1

Solutions-mères d'éléments en traces pour les milieux M4 et M7

Solutions-mères (I)	Quantité (mg) pour former une solution de 1 litre avec de l'eau désionisée	Pour préparer la solution-mère (II): mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions-mères (I) et compléter à un litre avec de l'eau désionisée		Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004

Solutions-mères (l)	Quantité (mg) pour former une solution de 1 litre avec de l'eau désionisée	Pour préparer la solution-mère (II): mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions-mères (I) et compléter à un litre avec de l'eau désionisée		Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ · 6H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ · 7H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ Ces substances sont dosées différemment dans M4 et M7, comme indiqué plus haut.

⁽²⁾ Ces solutions sont préparées séparément, puis mélangées et autoclavées immédiatement après.

Tableau 2

Solutions-mères de macronutriments pour les milieux M4 et M7

	Quantité pour former une solution de 1 litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantités de solutions-mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions expérimentales M4 et M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

Tableau 3

Solution-mère de vitamines pour les milieux M4 et M7

Les trois solutions de vitamines sont mélangées de façon à former une solution-mère de vitamines.

	Quantité pour former une solution de 1 litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantités de solutions-mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions expérimentales M4 et M7 (mg/l)
Hydrochlorure de thiamine	750	0,1	0,075
Cyanocobalamine (B12)	10	0,1	0,0010
Biotine	7,5	0,1	0,00075

RÉFÉRENCES

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Édité par M. Streloke et H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, *Protoplasma*, 154: 25-33.

Elendt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, *Water Research*, 24: 1157-1167.

Appendice 3

Préparation du sédiment reconstitué

COMPOSITION DU SÉDIMENT

Le sédiment est reconstitué comme suit:

Ingrédient	Caractéristiques	% du sédiment poids sec
Tourbe	Tourbe à sphaigne, pH aussi proche que possible de 5,5-6,0, pas de résidus de plantes visibles, finement broyée (particules ≤ 1 mm) et séchée à l'air	4 - 5
Sable quartzique	Granulométrie: plus de 50 % des particules mesurent entre 50 et 200 μm	75 - 76
Argile kaolinique	Taux de kaolinite ≥ 30 %	20
Carbone organique	Ajusté par l'addition de tourbe et de sable	2 ($\pm 0,5$)
Carbonate de calcium	CaCO_3 , pulvérisé, chimiquement pur	0,05 - 0,1
Eau	Conductivité ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$	30 - 50

PRÉPARATION

La tourbe est séchée à l'air et broyée en poudre fine. Une suspension de la quantité requise de poudre de tourbe dans de l'eau désionisée est préparée à l'aide d'un homogénéisateur à haute performance. Le pH de cette suspension est ajusté à $5,5 \pm 0,5$ avec du CaCO_3 . On conditionne la suspension durant au moins deux jours en l'agitant doucement à 20 ± 2 °C, afin de stabiliser le pH et d'établir une flore microbienne stable. On vérifie à nouveau le pH, qui doit atteindre $6,0 \pm 0,5$. Puis la suspension de tourbe est mélangée avec les autres ingrédients (sable et argile kaolinique) et de l'eau désionisée pour former un sédiment homogène dont la teneur en eau est comprise entre 30 et 50 % du poids sec du sédiment. Le pH du mélange final est à nouveau mesuré et ajusté à 6,5-7,5 avec du CaCO_3 , si nécessaire. On prélève des échantillons de sédiment afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Il est ensuite recommandé, avant d'utiliser le sédiment reconstitué dans l'essai de toxicité sur les chironomes, de le conditionner durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui régneront durant l'essai subséquent.

STOCKAGE

Les ingrédients secs destinés à la préparation du sédiment artificiel peuvent être entreposés dans un endroit sec et frais, à température ambiante. Le sédiment reconstitué (humide) n'est pas stocké avant son utilisation dans l'essai. Il est utilisé immédiatement après la période de conditionnement de sept jours qui achève sa préparation.

RÉFÉRENCES

OCDE (1984), *Ver de terre, essais de toxicité aiguë*, Ligne directrice N° 207, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. et B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) in artificial media, *Ecotox. Environ. Safety*, 39: 10-20.

Appendice 4

Caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable

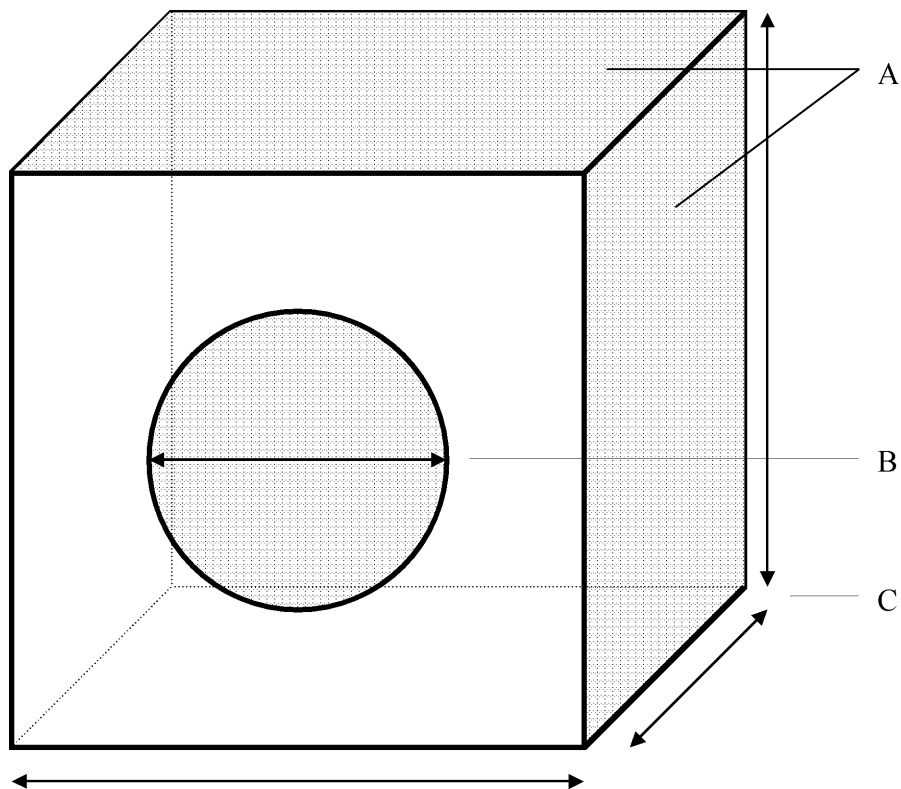
CONSTITUANT	CONCENTRATIONS
Particules	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Dureté en CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux plus biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

(*) Néanmoins, il est à noter que si l'on suspecte une interaction entre les ions de dureté et la substance chimique d'essai, il conviendra d'utiliser une eau moins dure (auquel cas le milieu Elendt M4 ne pourra pas être utilisé).

Appendice 5

Conseils pour la réalisation de l'essai

Exemple de cage d'élevage:

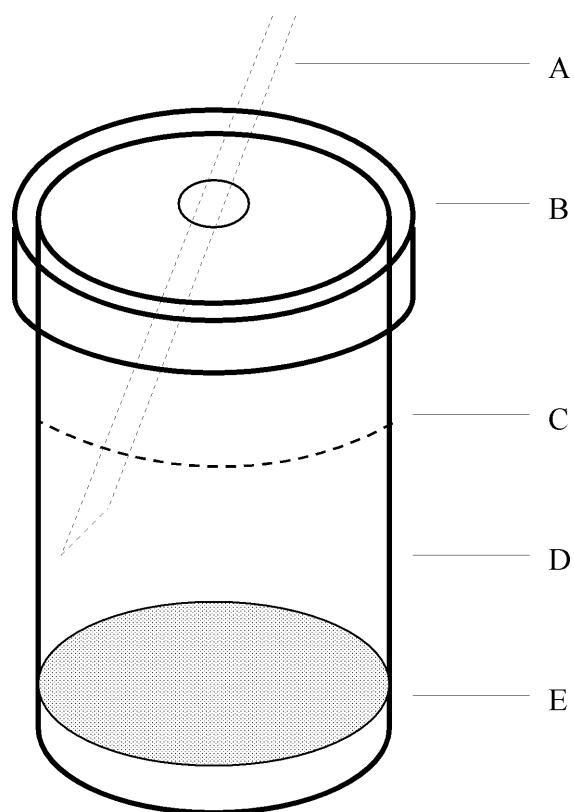


A: gaze sur le dessus et au moins un côté de la cage (maillage environ 1 mm)

B: ouverture permettant d'introduire les adultes émergés à l'intérieur de la cage et de retirer les amas d'œufs des cristallisoirs (non représentés sur ce schéma)

C: taille minimale de la cage d'élevage: 30 cm de longueur, 30 cm de hauteur et 30 cm de profondeur

Exemple de récipient expérimental:



A: pipette Pasteur permettant d'aérer l'eau sus-jacente

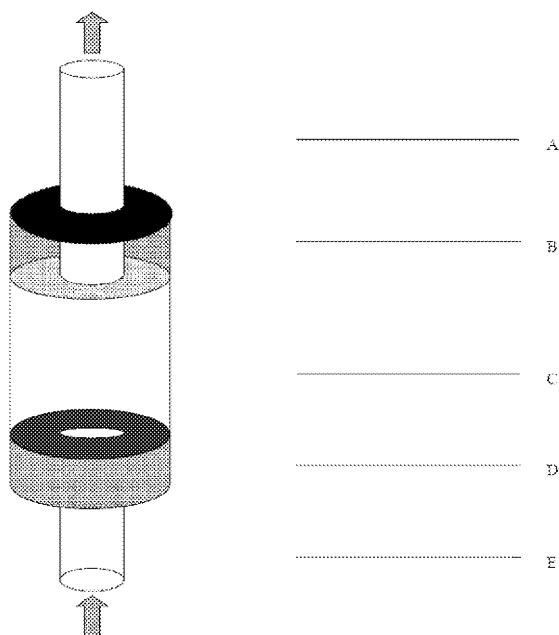
B: couvercle en verre empêchant les moucheron de s'échapper

C: surface de la couche d'eau

D: récipient expérimental (bêcher en verre d'une contenance minimum de 600 ml)

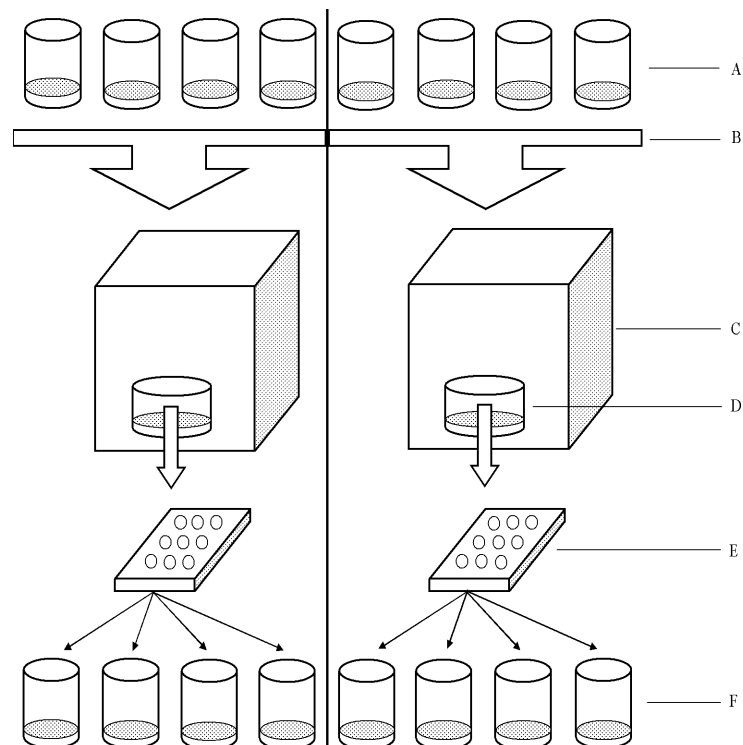
E: couche de sédiment

Exemple d'extracteur pour la capture des moucheron adultes (les flèches indiquent la direction du flux d'air):



- A: tube de verre (diamètre interne environ 5 mm) relié à une pompe à amorçage automatique
- B: bouchon en caoutchouc vulcanisé, transpercé d'un tube de verre (A). Face intérieure, l'ouverture du tube de verre (A) est recouverte de coton et d'une gaze (maillage environ 1 mm²) pour empêcher d'endommager les moucheron lorsqu'ils sont aspirés dans l'extracteur
- C: conteneur transparent (en plastique ou verre, longueur 15 cm environ) pour les moucheron capturés
- D: bouchon en caoutchouc vulcanisé, transpercé d'un tube (E). Pour libérer les moucheron dans la cage d'élevage, retirer le bouchon D du conteneur C
- E: tube (de plastique ou de verre, diamètre intérieur environ 8 mm) pour collecter les moucheron dans le récipient expérimental

Présentation schématique d'un essai sur le cycle de vie:



A: 1^{ère} génération — récipients expérimentaux contenant un système sédiment-eau, huit répliquats, 20 larves de premier stade par récipient

B: quatre récipients expérimentaux pour chaque cage d'élevage, A et B

C: cages d'élevage (A et B) pour l'essaimage, l'accouplement et la ponte

D: cristallisoirs pour le dépôt des amas d'œufs

E: plaques de microtitration, un puits par amas d'œufs

F: 2^{ème} génération — récipients expérimentaux contenant un système sédiment-eau, huit répliquats, 20 larves de premier stade par récipient

C.41. ESSAI DE DÉVELOPPEMENT SEXUEL DES POISSONS

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 234 (2011) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Elle découle d'une décision de 1998 visant à réviser les méthodes d'essai existantes ou à en élaborer de nouvelles concernant les essais de dépistage et les essais plus poussés de perturbateurs endocriniens potentiels. L'essai de développement sexuel des poissons (EDSP) a été identifié comme une méthode d'essai prometteuse couvrant un stade de la vie sensible chez les poissons et réceptif à la fois aux œstrogènes et aux androgènes. De 2006 à 2010, cette méthode d'essai a fait l'objet d'un programme de validation inter-laboratoires qui a permis la validation du medaka japonais (*Oryzias latipes*), du poisson-zèbre (*Danio rerio*) et de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) et la validation partielle du tête-de-boule (*Pimephales promelas*) (41) (42) (43). Ce protocole inclut le medaka japonais, le poisson-zèbre et l'épinoche. Il vient, en principe, enrichir la ligne directrice 210 de l'OCDE: Poisson, Essai de Toxicité aux Premiers Stades de la Vie (1), avec une exposition maintenue jusqu'à la différenciation sexuelle des poissons, soit pendant les quelque 60 jours qui suivent l'éclosion pour le medaka japonais, l'épinoche et le poisson-zèbre (la période d'exposition peut être plus courte ou plus longue pour d'autres espèces validées ultérieurement), et avec l'ajout des effets observés sur le système endocrinien. L'EDSP évalue les effets aux premiers stades de la vie et les effets néfastes possibles de perturbateurs endocriniens potentiels (œstrogènes, androgènes et inhibiteurs de la stéroïdogenèse, par exemple) sur le développement sexuel. La combinaison des deux principaux effets observés sur le système endocrinien, la concentration de vitellogénine (VTG) et le ratio mâles/femelles phénotypique, permet à l'essai d'indiquer le mode d'action de la substance chimique d'essai. Étant donné que les évolutions du ratio mâles/femelles sont caractéristiques d'une population donnée, l'EDSP peut être utilisé pour l'évaluation des dangers et des risques. Cependant, si le test est utilisé à des fins d'évaluation des dangers et des risques, l'épinoche ne devrait pas être utilisée car les données de validation disponibles à ce jour ont montré que chez cette espèce les altérations du ratio mâles/femelles phénotypiques sont atypiques.
2. Ce protocole s'appuie sur l'exposition de poissons exposés via de l'eau à des substances chimiques durant la période sexuelle labile, au cours de laquelle les poissons peuvent être extrêmement sensibles aux effets des perturbateurs endocriniens qui interfèrent dans le développement sexuel. Deux effets principaux sont mesurés pour indiquer les aberrations du développement liées au système endocrinien, les concentrations de VTG et les ratios mâles/femelles déterminés via l'histologie gonadique. L'histopathologie gonadique (évaluation et classement par stade des ovocytes et des cellules spermatogénétiques) est optionnelle. De plus, le sexe génétique est déterminé si possible (chez le medaka japonais et l'épinoche, par exemple). La présence d'un marqueur du sexe génétique présente un avantage considérable car elle permet d'améliorer la puissance statistique des effets mesurés sur le ratio mâles/femelles et permet la détection du changement de sexe phénotypique chez chaque individu. Les autres effets apicaux à mesurer sont le taux d'éclosion, la survie, la longueur et le poids corporel. On pourrait envisager d'adapter cette méthode d'essai à d'autres espèces que celles mentionnées précédemment à condition que ces autres espèces fassent l'objet d'une validation équivalente à celle effectuée pour le medaka japonais, l'épinoche et le poisson-zèbre, que les poissons témoins soient sexuellement différenciés à la fin de l'essai, que les niveaux de VTG soient suffisamment élevés pour que l'on puisse détecter des variations significatives dues à la substance, et que la sensibilité du système expérimental soit établie par le biais de perturbateurs endocriniens de référence [(anti)-œstrogènes, (anti)-androgènes, inhibiteurs de l'aromatase, etc.]. De plus, il convient que tout rapport de validation faisant référence à des données de l'EDSP utilisant d'autres espèces soit examiné par l'OCDE, et que le résultat de la validation soit considéré comme satisfaisant.

Remarques préliminaires et limites de l'essai

3. La VTG est normalement produite par le foie des femelles vertébrées ovipares en réponse à la circulation d'œstrogènes endogènes (2). Il s'agit d'un précurseur des protéines du vitellus, produit par le foie puis acheminé par le sang vers les ovaires, où il est capté et modifié par les ovocytes en croissance. La synthèse de la VTG est très limitée, quoique détectable, chez les poissons immatures et les poissons mâles adultes car la circulation des œstrogènes n'y est pas suffisante. Néanmoins, le foie peut synthétiser et sécréter la VTG en réponse à une stimulation œstrogénique exogène (3) (4) (5).
4. La mesure de la VTG sert à détecter les substances chimiques ayant des modes d'action œstrogéniques, anti-œstrogéniques, et androgéniques, ainsi que les substances qui interfèrent dans la stéroïdogenèse, telles que les inhibiteurs de l'aromatase. Cette détection peut se faire par la mesure de l'induction de VTG chez les poissons mâles; elle a fait l'objet de nombreuses publications scientifiques dans des revues à comité de lecture. L'induction de VTG a également été démontrée suite à une exposition à des androgènes aromatisables (6) (7). La diminution du taux d'œstrogènes circulants chez les femelles sous l'effet, par exemple, de l'inhibition de l'aromatase, l'enzyme permettant de convertir l'androgène endogène en œstrogène naturel (17 β -œstradiol), engendre une diminution du niveau de VTG utilisée pour détecter les substances dont les propriétés inhibent l'aromatase ou, plus largement, les inhibiteurs de la stéroïdogenèse (33). La pertinence biologique de la réponse

donnée par la VTG suite à l'inhibition des œstrogènes/de l'aromatase est établie et a été abondamment étudiée (8) (9). Néanmoins la production de VTG chez les femelles peut également être affectée par une toxicité générale et des modes d'action toxiques non- endocriniens.

5. Plusieurs méthodes de mesure ont été développées avec succès et normalisées en vue d'essais de routine pour quantifier la VTG dans le sang, le foie, des échantillons d'homogénats de l'ensemble du corps ou de tête-queue prélevés individuellement sur des poissons. C'est le cas du poisson-zèbre, de l'épinoche, du medaka japonais, du tête-de-boule, une espèce partiellement validée, pour lesquels les méthodes ELISA (procédé immunochimique d'absorption enzymatique) utilisant l'immunochimie pour la quantification de la VTG sont disponibles (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Chez le medaka japonais et le poisson-zèbre, il existe une bonne corrélation entre les concentrations de VTG mesurées dans le plasma sanguin, le foie et les échantillons d'homogénats bien que les homogénats aient tendance à donner des valeurs légèrement inférieures au plasma (17) (18) (19). Les procédures recommandées pour les prélèvements effectués en vue du dosage de la VTG sont décrites dans l'Appendice 5.
6. L'évolution du ratio mâles/femelles constitue un indicateur de changement de sexe. En principe, les œstrogènes, les anti-œstrogènes, les androgènes, les anti-androgènes et les inhibiteurs de la stéroïdogenèse peuvent affecter le ratio mâles/femelles des poissons en développement (20). On a pu constater que ce changement de sexe était partiellement réversible chez le poisson-zèbre (21) suite à l'exposition à des substances de type œstrogénique, tandis qu'un changement de sexe suite à l'exposition à des substances chimiques de type androgénique est permanente (30). Le sexe est défini comme féminin, masculin, hermaphrodite (ovocytes et cellules spermatogénétiques dans une seule et même gonade) ou indifférencié chez chaque poisson via l'examen histologique des gonades. Des recommandations sont fournies dans l'Appendice 7 et dans le document d'orientation de l'OCDE Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads (22).
7. Le sexe génétique est examiné via des marqueurs génétiques lorsqu'ils existent dans une espèce de poissons donnée. Chez le medaka japonais, les gènes féminins XX ou masculins XY peuvent être détectés par réaction en chaîne par polymérase (PCR), ou le gène lié à Y du domaine DM (DMY) peut être analysé (DMY négatif ou positif) tel que décrit dans les documents de référence (23) (24). Pour l'épinoche, il existe une méthode de PCR équivalente pour la détermination du sexe génétique, décrite dans l'Appendice 10. Lorsque le sexe génétique peut être individuellement mis en relation avec le sexe phénotypique, l'essai est renforcé et le sexe génétique est donc être déterminé dans des espèces ayant des marqueurs du sexe génétique abondamment étudiés.
8. Les deux principaux effets mesurés sur le système endocrinien, la VTG et le ratio mâles/femelles, peuvent, s'ils sont combinés, démontrer le mode d'action de la substance chimique sur le système endocrinien (tableau 1). Le ratio mâles/femelles est un biomarqueur pertinent en terme de population (25) (26), et pour des modes d'action bien définis, les résultats de l'EDSP peuvent être utilisés pour évaluer les dangers et les risques si cela est jugé opportun par l'agence réglementaire. Ces modes d'action sont actuellement ceux des œstrogènes, androgènes et inhibiteurs de la stéroïdogenèse.

Tableau 1

réaction des effets mesurés sur le système endocrinien à différents modes d'action de substances chimiques:

↑ = **augmentation**, ↓ = **diminution**, — = **non recherché**

Modes d'action	VTG ♂	VTG ♀	ratio mâles/femelles	Références
Agoniste faible des œstrogènes	↑	↑	↑♀ ou ↑indifférenciés	(27) (40)
Agoniste fort des œstrogènes	↑	↑	↑♀ ou ↑indifférenciés, néant ♂	(28) (40)
Antagoniste des œstrogènes	—	—	↑♀ ou ↑indifférenciés	(29)
Agoniste des androgènes	↓ ou -	↓ ou -	↑ ♂, néant ♀	(28) (30)
Antagoniste des androgènes	—	—	↑♀ ↑hermaphrodites	(31)
Inhibiteur de l'aromatase	↓	↓	↓♀	(33)

9. L'EDSP ne couvrant pas le stade de la reproduction des poissons, il convient d'évaluer les substances chimiques susceptibles d'affecter la reproduction à des concentrations plus faibles que le développement sexuel dans un essai qui couvre la reproduction.
10. Certains termes techniques utilisés dans la présente méthode d'essai sont définis dans l'Appendice 1.
11. L'essai *in vivo* de développement sexuel des poissons vise à détecter les substances chimiques ayant des propriétés androgéniques et œstrogéniques ainsi que des propriétés anti-androgéniques, anti-œstrogéniques et inhibitrices de la stéroïdogenèse. Les phases de validation (1 et 2) de l'EDSP couvraient les œstrogènes, les androgènes et les inhibiteurs de la stéroïdogenèse. Les effets des antagonistes des œstrogènes et des androgènes dans le cadre de l'EDSP sont illustrés dans le tableau 1, mais ces modes d'action font actuellement l'objet d'une littérature moins abondante

PRINCIPE DE L'ESSAI

12. Dans cet essai, les poissons sont exposés, de l'œuf nouvellement fécondé à l'achèvement de la différenciation sexuelle, à au moins trois concentrations de la substance chimique d'essai dissoute dans de l'eau. L'essai se déroule dans des conditions dynamiques à moins que la substance chimique d'essai ne le permette pas pour des raisons de disponibilité ou de nature (solubilité limitée, par exemple). Au début de l'essai, les œufs nouvellement fécondés (avant division du blastodisque) sont placés dans les enceintes d'essai. Le taux de charge des enceintes est décrit pour chaque espèce au paragraphe 27. Pour les espèces validées, à savoir le medaka japonais, l'épinoche et le poisson-zèbre, l'essai est terminé 60 jours après l'éclosion. À la fin de l'essai, tous les poissons sont euthanasiés sans cruauté. Un prélèvement biologique (plasma sanguin, foie ou homogénat tête-queue) est effectué sur chaque poisson pour l'analyse de la VTG, et la partie restante est fixée pour l'évaluation histologique des gonades visant à déterminer le sexe phénotypique; l'histopathologie (classement par stade des gonades, gravité de l'hermaphrodisme, par exemple) est optionnelle. Un prélèvement biologique (nageoire anale ou dorsale) pour la détermination du sexe génétique est effectué sur les espèces possédant les biomarqueurs adéquats (Appendices 9 et 10).
13. L'Appendice 2 donne une vue d'ensemble des conditions d'essai pertinentes spécifiques aux espèces validées: le medaka japonais, l'épinoche et le poisson-zèbre.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

14. Il convient que les résultats d'un essai de toxicité aiguë ou d'un autre essai de toxicité à court terme [méthode d'essai C.14 (34) et ligne directrice 210 de l'OCDE (1), par exemple], mené de préférence avec l'espèce sélectionnée pour l'essai en question, soient disponibles. Cela suppose que l'hydrosolubilité et la pression de vapeur de la substance d'essai soient connues et qu'une méthode analytique fiable de quantification de la substance chimique dans les enceintes d'essai, avec une précision et une limite de détection connues et consignées par écrit, soit disponible.
15. D'autres informations sont utiles, telles que la formule développée, la pureté de la substance chimique, la stabilité dans l'eau et à la lumière, le pKa, le P_{oc} et les résultats d'un essai de biodégradabilité facile (méthode d'essai C.4) (35).

Critères de validité de l'essai

16. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables, les conditions sont les suivantes:
 - La concentration d'oxygène dissous est maintenue à 60 pour cent au moins de la valeur de la saturation en air (VSA) pendant toute la durée de l'essai.
 - À aucun moment, durant toute la période d'exposition, la température de l'eau ne diffère de plus de $\pm 1,5^\circ \text{C}$ entre les enceintes, et elle demeure dans la plage de température indiquée pour l'espèce étudiée (Appendice 2).
 - Une méthode validée d'analyse de la substance d'exposition avec une limite de détection bien en-deçà de la plus faible concentration nominale est disponible et les données disponibles démontrent que les concentrations de substance chimique d'essai en solution ont été correctement maintenues dans un intervalle de $\pm 20\%$ autour des valeurs moyennes mesurées.

- Le taux global de survie des œufs fécondés dans les témoins et, le cas échéant, dans les témoins contenant le solvant, est supérieur ou égal aux limites définies à l'Appendice 2.
- Les critères de validité relatifs à la croissance et aux proportions de chaque sexe à la fin de l'essai sont basés sur les données issues des groupes témoins (témoin contenant à la fois le solvant et l'eau, à moins qu'ils présentent des différences significatives, puis uniquement le solvant):

		Medaka japonais	Poisson-zèbre	Épinoche
Croissance	Poids frais de poissons à sec	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Longueur (longueur standard)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Ratio mâles/femelles		30-70 %	30-70 %	30-70 %

- L'utilisation d'un solvant ne devrait pas avoir d'effet statistique significatif sur la survie, d'effets perturbateurs sur le système endocrinien ni d'autres effets néfastes sur les premiers stades de la vie comme le révèle un témoin solvant.

Si l'on observe une déviation par rapport aux critères de validité de l'essai, les conséquences sont analysées en fonction de la fiabilité des données d'essai, et ces analyses sont consignées dans le rapport d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Enceintes d'essai

- On peut utiliser tout récipient en verre, en acier inoxydable ou en matériau chimiquement inerte. Il convient que les enceintes soient suffisamment grandes pour être en conformité avec les critères de charge donnés ci-dessous. Il est souhaitable de disposer les enceintes expérimentales selon un schéma aléatoire par bloc, chaque traitement étant présent dans chaque bloc, plutôt que de les disposer de façon aléatoire. On protège les enceintes de toute perturbation non voulue.

Choix des espèces de poisson

- L'Appendice 2 regroupe les espèces de poissons recommandées pour cet essai. Les procédures d'inclusion de nouvelles espèces sont décrites dans le paragraphe 2.

Soins des poissons géniteurs

- Les moyens de maintenir les poissons géniteurs dans des conditions satisfaisantes sont détaillés dans la ligne directrice 210 de l'OCDE (1). Les poissons géniteurs sont nourris une ou deux fois par jour avec des aliments appropriés.

Manipulation des embryons et des larves

- Au départ, les embryons et les larves peuvent être exposés à l'intérieur de la cuve principale dans des récipients plus petits en verre ou en acier inoxydable avec des côtés ou des extrémités en treillis permettant à la solution d'essai de traverser le récipient. On peut créer un écoulement non turbulent à travers ces petits récipients en les suspendant à un bras disposé de façon à déplacer le récipient verticalement mais en gardant toujours les organismes submergés.
- Quand on utilise des récipients, des grillages ou des treillis pour maintenir les œufs à l'intérieur de la cuve principale, ces dispositifs sont enlevés après l'éclosion des larves, sauf si ces treillis ont pour objectif d'éviter aux poissons de s'enfuir. Si l'on doit transférer les larves, on ne les expose pas à l'air et il ne faut pas utiliser un filet pour enlever les poissons des récipients contenant les œufs. Le moment de ce transfert varie selon les espèces et il se peut que le transfert ne soit pas nécessaire.

Eau

22. Pour les essais, on peut utiliser toute eau dans laquelle les espèces étudiées (témoins) ont un taux de survie au moins aussi bon que dans l'eau décrite dans l'Appendice 3. Il convient que sa qualité demeure constante pendant la durée de l'essai. On prélève et analyse régulièrement des échantillons afin de s'assurer que l'eau de dilution n'influencera pas indûment le résultat des essais (par exemple par réaction avec la substance d'essai) ou n'influencera pas négativement la performance des géniteurs. Le carbone organique total, la conductivité, le pH et les matières en suspension sont dosés par exemple tous les trois mois dans le cas d'une eau de dilution de qualité relativement constante. Les métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple), les anions et cations principaux (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , par exemple) et les pesticides sont dosés si la qualité de l'eau est discutable. L'analyse chimique et la collecte d'eau sont détaillées dans le paragraphe 34.

Solutions d'essai

23. Il convient d'utiliser un système dynamique si cela est possible d'un point de vue pratique. Les essais en dynamique nécessitent un système qui délivre et dilue de façon continue une solution-mère de la substance chimique d'essai (par exemple une pompe doseuse, un dilueur proportionnel, un système de saturation) afin de distribuer une série de concentrations vers les enceintes d'essai. Pendant l'essai, on vérifie à intervalles réguliers les débits des solutions-mères et de l'eau de dilution; ceux-ci ne doivent pas varier de plus de 10 % pendant toute la durée de l'essai. Un débit équivalent à au moins cinq fois le volume de l'enceinte d'essai par 24 heures s'est révélé adéquat (1). Il faut veiller à éviter l'utilisation de tubes en plastique ou d'autres types de matériel pouvant contenir des substances biologiquement actives ou adsorber la substance chimique d'essai.
24. La solution-mère est préparée, de préférence, sans l'utilisation de solvants par simple mélange ou agitation de la substance chimique d'essai dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (secouement ou ultrasons, par exemple). Si la substance chimique d'essai est difficile à dissoudre dans l'eau, les procédures décrites dans le document d'orientation de l'OCDE intitulé *Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures* (36) sont suivies. L'utilisation de solvants est à éviter mais peut, dans certains cas, s'avérer nécessaire afin d'obtenir la concentration de solution-mère souhaitée. Le document (36) donne des exemples de solvants appropriés.
25. Les conditions d'essai semi-statiques sont à éviter à moins qu'elles soient justifiées par des arguments irréfutables associés à la substance chimique d'essai (stabilité, disponibilité en quantité limitée, coût ou danger élevé, par exemple). Pour la technique semi-statique, on peut utiliser deux méthodes différentes de renouvellement du milieu. Soit on prépare de nouvelles solutions d'essai dans des récipients propres et on transfère avec précaution les œufs et les larves survivants dans les nouveaux récipients, soit on maintient les organismes d'essai dans les enceintes d'essai tout en changeant quotidiennement une partie (au moins les deux tiers) du milieu d'essai.

DÉROULEMENT DE L'ESSAI**Conditions d'exposition***Collecte des œufs et durée*

26. Pour éviter les biais génétiques, les œufs sont collectés au sein de trois couples ou groupes reproducteurs minimum, mélangés et sélectionnés au hasard pour démarrer l'essai. Pour l'épinoche, une description de la procédure de fertilisation artificielle est fournie dans l'Appendice 11. L'essai démarre aussitôt que possible après que les œufs aient été fécondés, les embryons étant de préférence immergés dans les solutions d'essai avant que la division du blastodisque ne commence ou aussi près que possible après ce stade et pas plus de 12 h après la fécondation. L'essai continue jusqu'à ce que la différenciation sexuelle dans le groupe témoin soit achevée (60 jours après l'éclosion pour le medaka japonais, l'épinoche et le poisson-zèbre).

Charge

27. Au début de l'essai, on utilise au moins 120 œufs fécondés par concentration, répartis dans au moins quatre réplicats (la répartition par racine carrée dans le témoin est acceptée). Les œufs sont répartis au hasard (selon les tableaux statistiques de randomisation) dans les différents traitements. Il convient que le taux de charge (voir Appendice 1 pour la définition) soit suffisamment faible pour que la concentration en oxygène dissous puisse être maintenue sans aération directe à au moins 60 % de la valeur de saturation en air. Pour les essais dynamiques, il est recommandé que le taux de charge ne dépasse pas 0,5 g/l sur 24 heures et 5 g/l à un moment quelconque. Au plus tard 28 jours après la fécondation, le nombre de poissons par réplicat est redistribué de telle sorte que chaque réplicat contienne un nombre égal de poissons dans la mesure du possible. En cas de mortalité due à l'exposition, le nombre de réplicats est dûment réduit de sorte que la densité de poissons entre les niveaux de traitement soit maintenue aussi égale que possible.

Lumière et température

28. La photopériode et la température de l'eau sont adaptées à l'espèce testée (voir les conditions expérimentales dans l'Appendice 2).

Alimentation

29. La nourriture et l'alimentation sont des points critiques, et pour chaque stade de développement, il est primordial de fournir la nourriture appropriée à des intervalles de temps déterminés et dans des quantités suffisantes pour que la croissance soit normale. La nourriture est donnée *ad libitum* tout en minimisant le surplus. Pour que le taux de croissance soit suffisant, les poissons sont nourris au moins deux fois par jour (éventuellement une fois par jour le week-end), à raison d'un intervalle d'au moins trois heures entre chaque repas. La nourriture et les excréments sont retirés quand cela s'avère nécessaire afin d'éviter l'accumulation de déchets. Au fur et à mesure que l'on acquiert de l'expérience, on améliore continuellement la nourriture et les régimes alimentaires afin d'augmenter le taux de survie et d'optimiser la croissance. On s'efforce donc de faire confirmer le régime proposé par des experts reconnus. Les poissons ne sont plus être nourris durant les 24 heures qui précèdent la fin de l'essai. L'Appendice 2 donne des exemples de régimes alimentaires adaptés (voir également le document Fish Toxicity Testing Framework de l'OCDE (39)).

Concentrations de la substance chimique d'essai

30. Les concentrations de la substance chimique d'essai sont espacées tel que décrit à l'Appendice 4. Au moins trois concentrations de la substance d'essai placées dans au moins quatre réplicats sont utilisées. Pour choisir la gamme des concentrations d'essai, on s'inspire de la courbe qui donne la CL_{50} en fonction de la période d'exposition dans les études de toxicité aiguë. Cinq concentrations de la substance d'essai sont recommandées s'il est prévu d'utiliser les données pour l'évaluation des risques.
31. Il n'est pas nécessaire de tester les concentrations supérieures à 10 % de la CL_{50} aiguë chez les adultes ou à 10 mg/l, quelle que soit la plus faible. Il convient que la concentration maximale représente 10 % de la CL_{50} chez les larves/juvéniles.

Témoins

32. Un témoin contenant l'eau de dilution (≥ 4 réplicats) et, si nécessaire, un témoin contenant le solvant (≥ 4 réplicats) sont inclus dans l'essai en plus des concentrations de la substance d'essai. Seuls les solvants pour lesquels on a vérifié qu'ils n'avaient pas d'influence statistique significative sur les effets mesurés durant l'essai sont utilisés dans cet essai.
33. Si un solvant est utilisé, sa concentration finale ne dépasse pas 0,1 ml/l (36) et la concentration est identique dans toutes les enceintes d'essai, sauf le témoin avec l'eau de dilution. Néanmoins, on évitera autant que possible d'utiliser un solvant, sinon on veillera à maintenir les concentrations de solvant à un minimum.

Fréquence des dosages analytiques et des mesures

34. L'analyse chimique de la concentration de la substance chimique d'essai est effectuée avant le démarrage de l'essai afin de vérifier la conformité aux critères de validité. Tous les réplicats sont dosés séparément au début et à la fin de l'essai. Un réplicat par concentration de la substance d'essai est dosé au moins une fois par semaine au cours de l'essai, avec une rotation systématique des réplicats (1, 2, 3, 4, 1, 2 ...). Si les échantillons sont stockés en vue d'un dosage ultérieur, il convient que la méthode de stockage des échantillons ait été validée en amont. Les échantillons sont filtrés (avec par exemple une dimension de pore de 0,45 μm) ou centrifugés afin de s'assurer que seule la substance chimique en solution est dosée analytiquement.
35. Au cours de l'essai, on mesure l'oxygène dissous, le pH, la dureté totale, la conductivité, la salinité (s'il y a lieu) et la température dans toutes les enceintes d'essai. L'oxygène dissous, la salinité (s'il y a lieu) et la température sont mesurés au moins une fois par semaine; le pH, la conductivité et la dureté sont mesurés au minimum au début et à la fin de l'essai. Il est préférable de surveiller la température en continu dans au moins une enceinte.
36. Les résultats sont exprimés à partir des concentrations mesurées. Toutefois, si la concentration de la substance chimique d'essai en solution a été correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % autour de la concentration nominale, les résultats peuvent être calculés à partir des valeurs nominales ou mesurées.

Observations et mesures*Stade du développement embryonnaire*

37. L'exposition démarre aussitôt que possible après la fécondation et avant le début de la division du blastodisque et pas plus de 12 h après la fécondation pour garantir l'exposition dès le début du développement embryonnaire.

Éclosion et survie

38. Il faut observer et dénombrer les éclosions et les survivants au moins une fois par jour. Les embryons, larves et juvéniles morts sont enlevés dès qu'ils sont repérés, du fait qu'ils peuvent se décomposer rapidement et être mis en morceaux par les autres poissons. On fait très attention quand on retire les individus morts afin de ne pas heurter ou léser physiquement les œufs et larves proches qui sont extrêmement délicats et sensibles. Les critères indiquant la mort varient selon le stade de développement:
- pour les œufs: en particulier au début de leur cycle, diminution marquée de la transparence et/ou modification de la coloration, provoquées par la coagulation et/ou la précipitation des protéines et conduisant à un aspect blanc opaque;
 - pour les larves et les juvéniles: immobilité et/ou absence de mouvement respiratoire et/ou absence de battement du cœur et/ou coloration blanche opaque du système nerveux central et/ou absence de réaction à un stimulus mécanique.

Apparence anormale

39. On note le nombre de larves ou de poissons présentant une anomalie corporelle et on décrit l'aspect et la nature de l'anomalie. Il faut savoir que des embryons et larves anormaux surviennent de façon naturelle et que, chez le(s) témoin(s) de certaines espèces, leur proportion peut atteindre plusieurs pour cent. Les animaux anormaux ne sont retirés des récipients d'essai qu'à leur mort. Toutefois, conformément à la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, en cas d'observation de souffrance considérable (effets très graves et mort prévisible de façon fiable), les animaux sont anesthésiés et euthanasiés selon le mode opératoire décrit au paragraphe 44 et comptabilisés en tant de décès pour l'analyse des données.

Comportement anormal

40. Des anomalies telles qu'une hyperventilation, une nage non coordonnée, une immobilité anormale et un comportement alimentaire atypique sont notées lorsqu'elles apparaissent.

Poids

41. À la fin de l'essai, tous les poissons survivants sont euthanasiés (anesthésiés si des prélèvements sanguins doivent être effectués) et pesés individuellement à sec.

Longueur

42. A la fin de l'essai, il est recommandé de mesurer la longueur de chaque individu (longueur standard).
43. Ces observations permettront de disposer pour le rapport d'essai de tout ou une partie des données suivantes:
- mortalité cumulée;
 - nombre de poissons sains à la fin de l'essai;
 - moment du commencement de l'éclosion et de la fin de celle-ci;
 - longueur et poids des animaux survivants;
 - nombre de larves déformées;
 - nombre de poissons présentant un comportement anormal.

Prélèvement sur les poissons

44. Le prélèvement sur les poissons est effectué à la fin de l'essai. Les poissons échantillonnés sont euthanasiés avec, par exemple, du MS-222 (100-500 mg/l tamponnés avec 200 mg/l de NaHCO_3) ou du FA-100 (4-allyl-2-méthoxyphénol: eugénol), et la longueur et le poids frais à sec de chaque individu sont mesurés, ou bien les poissons sont anesthésiés si un prélèvement sanguin doit être effectué (voir paragraphe 49).

Prélèvement pour l'analyse de la VTG et la détermination du sexe via l'évaluation histologique

45. Des prélèvements sont effectués sur tous les poissons, qui sont préparés en vue de l'analyse du sexe et de la VTG. Tous les poissons font l'objet d'une analyse histologique visant à déterminer leur sexe. Pour les dosages de la VTG, un sous-échantillon issu d'au moins 16 poissons de chaque réplicat est accepté. L'analyse de la VTG est effectuée sur un plus grand nombre de poissons si les résultats du sous-échantillon se révèlent imprécis.
46. La procédure de prélèvement pour la détermination de la VTG et du sexe dépend de la méthode d'analyse de la VTG:

Méthode d'analyse de la VTG utilisant un homogénat tête-queue

47. Le poisson est euthanasié. La tête et la queue de chaque poisson sont séparées du reste du corps par incision au scalpel au niveau de la partie antérieure des nageoires pectorales et de la nageoire dorsale (voir Figure 1). La tête et la queue de chaque poisson forment un ensemble qui est pesé, et chaque ensemble tête-queue est numéroté puis congelé dans de l'azote liquide et stocké à une température inférieure ou égale à -70°C pour l'analyse de la VTG. Le reste du corps est numéroté et fixé dans une solution de fixation appropriée pour l'évaluation histologique (22). Cette méthode permet d'évaluer la VTG et l'histopathologie sur chaque individu, et une évolution éventuelle du niveau de VTG peut ainsi être corrélée au sexe phénotypique du poisson ou au sexe génétique (medaka japonais et épinoche) du poisson [pour de plus amples informations, voir le guide d'homogénéisation (Appendice 5) et le guide de quantification de la VTG (Appendice 6)].

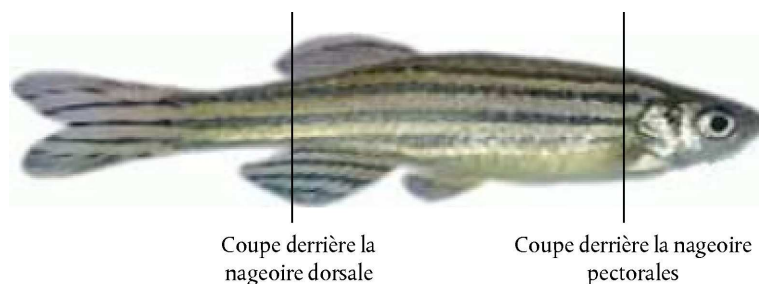
Méthode d'analyse de la VTG utilisant un homogénat hépatique

48. Le poisson est euthanasié. Le foie est extrait par dissection puis stocké à une température inférieure ou égale à -70°C . Les procédures recommandées pour l'excision du foie et le prétraitement figurent dans ligne directrice 229 de l'OCDE (37) ou dans le chapitre C.37 de la présente annexe (38). Les foies sont ensuite homogénéisés séparément tel que décrit dans la ligne directrice 229 de l'OCDE ou le chapitre C.37 de la présente annexe. Le surnageant collecté sert à doser la VTG par le biais d'une technique ELISA homologue [voir exemple de quantification chez le poisson-zèbre à l'Appendice 6 ou dans la ligne directrice 229 de l'OCDE (37) pour le medaka japonais]. En suivant cette démarche, il est également possible d'obtenir des données sur la VTG et l'histologie gonadique de chaque poisson.

Méthode d'analyse de la VTG utilisant le plasma sanguin

49. Les prélèvements sanguins sur les poissons anesthésiés sont effectués par ponction cardiaque, dans la veine caudale ou par sectionnement de la queue, puis centrifugés à une température de 4°C pour la collecte du plasma. Le plasma est stocké à une température inférieure ou égale à -70°C jusqu'à son utilisation. Le poisson est entièrement euthanasié et fixé pour l'histologie. Les échantillons de plasma et les poissons sont numérotés séparément pour corrélérer les niveaux de VTG au sexe des poissons.

Figure 1

Comment couper un poisson pour le dosage de la VTG dans un homogénat tête-queue et l'évaluation histologique de la section médiane.

Détermination du sexe génétique

50. Un prélèvement biologique pour la détermination du sexe génétique est effectué sur chaque poisson appartenant à l'une des espèces possédant les biomarqueurs adéquats. Pour le medaka japonais, la nageoire anale ou la nageoire dorsale est collectée. Le prélèvement tissulaire et la détermination du sexe par réaction en chaîne par polymérase (PCR) sont détaillés dans l'Appendice 9. De la même façon, pour l'épinoche, une description de la procédure d'échantillonnage ainsi que de la méthode PCR pour la détermination du sexe génétique est fournie dans l'Appendice 10.

Dosage de la VTG

51. Le dosage de la VTG est effectué à l'aide d'une méthode analytique quantitative validée. Il convient de disposer d'informations sur la variabilité intra-essai et inter-essais de la méthode utilisée dans un laboratoire donné. La source de variabilité inter-laboratoires et intra-laboratoire dépend (très probablement) des différents stades de développement de la population de poissons. Étant donnée la variabilité du dosage de la VTG, les CSEO basées exclusivement sur cet effet mesuré sont considérées avec une grande prudence. Différentes méthodes permettent d'évaluer la production de VTG dans les espèces de poissons prises en compte dans cet essai. La méthode ELISA (procédé immunochimique d'absorption enzymatique) constitue une méthode de dosage de la VTG à la fois relativement sensible et spécifique. Des anticorps homologues (de la VTG de la même espèce) et surtout des standards homologues sont utilisés.

Détermination du sexe

52. Selon la procédure de prélèvement de la VTG, le corps entier ou la partie centrale restante de chaque poisson est placé(e) sur une cassette de traitement pré-étiquetée et fixé(e) dans une solution de fixation appropriée pour la détermination histologique du sexe (également pour le classement par stade des gonades, optionnel). L'Appendice 7 et le document d'orientation de l'OCDE intitulé *Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads* (22) donnent des orientations sur la fixation et l'inclusion. À l'issue du traitement, les poissons sont placés dans un bloc de paraffine. Les individus sont placés dans ce bloc selon l'axe longitudinal. Au moins six coupes longitudinales (3-5 µm d'épaisseur) dans un plan frontal comprenant le tissu gonadal des deux gonades sont faites sur chaque individu. L'intervalle entre ces coupes est de 50 µm environ pour les mâles et de 250 µm environ pour les femelles. Toutefois, étant donné que chaque bloc contient souvent des mâles et des femelles (si plus d'un individu est inclus dans chaque bloc), l'intervalle entre les coupes effectuées dans ces blocs est de 50 µm environ jusqu'à ce que l'on obtienne au moins six coupes des gonades de chaque mâle. Par la suite, l'intervalle entre les coupes peut être augmenté jusqu'à 250 µm environ pour les femelles. Les coupes sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine puis examinées au microscope optique, l'observation étant axée sur le sexe (masculin, féminin, hermaphrodite ou indifférencié). L'hermaphrodisme est défini comme la présence de plus d'un ovocyte dans les testicules par lot de six coupes analysées ou de cellules spermatogéniques dans les ovaires (oui/non). L'histopathologie et le classement par stade des ovaires et des testicules sont optionnels, mais s'ils sont pratiqués, les résultats font l'objet d'une analyse statistique et d'un rapport. Il est intéressant de noter que certaines espèces de poissons ne possèdent pas, à l'état naturel, de paire de gonades entièrement développée et qu'une seule gonade peut être présente (medaka japonais et parfois poisson-zèbre, par exemple). Toutes ces observations sont consignées par écrit.
53. Chez le medaka japonais, le sexe génétique est déterminé en fonction de la présence ou de l'absence du gène qui détermine le sexe masculin chez le medaka, le DMY, qui est situé sur le chromosome Y. Le sexe génotypique du medaka peut être identifié par séquençage du DMY à partir de l'ADN extrait d'un morceau de nageoire anale ou de nageoire dorsale, par exemple. La présence du DMY indique qu'il s'agit d'un individu de sexe masculin (XY) quel que soit le phénotype, tandis que l'absence de DMY indique qu'il s'agit d'un individu de sexe féminin (XX) quel que soit le phénotype (23). L'Appendice 9 donne des recommandations sur la préparation des tissus et la PCR. La détermination du sexe génétique individuellement chez chaque épinoche est également déterminée par analyse PCR, comme décrit dans l'Appendice 10.
54. La présence d'hermaphrodites (consulter la définition dans l'Appendice 1) est notée.

Caractères sexuels secondaires

55. Les caractères sexuels secondaires sont contrôlés par le système endocrinien chez des espèces telles que le medaka japonais; les observations relatives aux caractéristiques physiques des poissons sont donc notées si possible à la fin de l'exposition. Chez le medaka japonais, la formation de tubercules papillaires sur la partie postérieure de la nageoire anale des femelles est sensible aux androgènes. Le chapitre C.37 de la présente annexe (38) fournit des photos pertinentes des caractères sexuels secondaires de mâles et de femelles androgénisées.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

56. Il importe d'utiliser l'analyse statistique la plus valide pour déterminer l'effet mesuré. Le réplicat est l'unité expérimentale, mais la variabilité entre les réplicats est prise en compte lors de l'analyse statistique. Le diagramme de décision de l'Appendice 8 aide à choisir l'analyse statistique la plus adéquate en fonction des caractéristiques des résultats de l'essai. Le niveau de signification statistique est de 0,05 pour tous les effets mesurés pris en compte.

Proportions de sexe et de sexe génétique

57. Les proportions de sexe sont analysées pour évaluer l'effet significatif (DSEO/CMEQ) de l'exposition via le test de Jonckheere-Terpstra (test des tendances) si la relation dose-réponse est monotone. Si la relation est non monotone, des comparaisons par paires sont effectuées: on utilisera le test de Dunnett si l'on peut obtenir la normalité et une variance homogène. On utilisera le test de Tamhane-Dunnett en cas de variance hétérogène. Sinon, on appliquera fidèlement le test de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni-Holm. Un diagramme de décision statistique des proportions de sexe figure à l'Appendice 8. Les proportions de sexe sont présentées sous forme de tableaux reprenant les proportions de concentration $\pm$ l'écart-type de mâles, de femelles, d'hermaphrodites et d'individus indifférenciés. Il convient de souligner la signification statistique. Des exemples sont présentés dans le rapport de validation de la phase 2 de l'essai de développement sexuel des poissons (42). Le sexe génétique est noté sous forme de pourcentage de changement de sexe phénotypique chez les mâles, les femelles, les hermaphrodites et les individus indifférenciés.

Concentrations de VTG

58. Les concentrations de VTG sont analysées pour évaluer l'effet significatif (DSEO/CMEQ) de l'exposition. Le test de Dunnett est préférable au test t avec correction de Bonferroni. Si l'on applique une correction de Bonferroni, la correction de Bonferroni-Holm est préférable. Il convient d'accepter une transformation logarithmique de la VTG pour atteindre la normalité et une variance homogène. Ensuite, si la relation dose-réponse est cohérente avec la monotonie, le test de Jonckheere-Terpstra est préférable à n'importe lequel des tests précités. Si l'on utilise le test t, ou le test de Dunnett, il n'est pas nécessaire d'utiliser l'ANOVA, qui utilise le mécanisme du test de Fisher, pour poursuivre. On pourra se reporter au diagramme de décision de l'Appendice 8 pour de plus amples informations. Les proportions de sexe sont présentées sous forme de tableaux reprenant les concentrations moyennes $\pm$ l'écart-type de mâles, de femelles, d'hermaphrodites et d'individus indifférenciés séparément. Il convient de souligner la signification statistique des femelles phénotypiques et des mâles phénotypiques. Des exemples sont présentés dans le rapport de validation de la phase 2 de l'essai de développement sexuel des poissons (42).

Concentrations réelles de la substance chimique d'essai

59. Les concentrations réelles de la substance chimique d'essai dans les enceintes sont analysées selon les fréquences décrites au paragraphe 34. Les résultats sont notés dans des tableaux sous forme de concentration moyenne $\pm$ l'écart-type sur la base des réplicats ainsi que de la concentration, l'accent étant mis sur les informations sur le nombre d'échantillons et sur les valeurs de concentration aberrantes par rapport à la concentration moyenne des traitements $\pm$ 20 %. Des exemples figurent dans le rapport de validation de la phase 2 de l'essai de développement sexuel des poissons (42).

Interprétation des résultats

60. Les résultats sont interprétés avec prudence lorsque les concentrations de la substance chimique d'essai mesurées en solutions d'essai atteignent des niveaux proches de la limite de détection de la méthode d'analyse.

Rapport

61. Le rapport de l'essai comprend les informations suivantes:

Substance chimique d'essai

- propriétés physico-chimiques pertinentes; données relatives à l'identification chimique, dont la pureté et la méthode analytique de dosage de la substance chimique d'essai.

Conditions d'essai:

- mode opératoire utilisé (dynamique ou semi-statique); conception de l'essai comprenant les concentrations de la substance d'essai, la méthode de préparation des solutions-mères (dans une annexe), la fréquence de renouvellement (le solvant et sa concentration sont indiqués si ledit solvant est utilisé);
- concentrations nominales de la substance d'essai, valeurs moyennes mesurées, déviations standard de ces moyennes dans les enceintes d'essai et méthode ayant permis de les obtenir (la méthode analytique utilisée est présentée dans une annexe). Données disponibles devant démontrer que les dosages correspondent aux concentrations de la substance chimique d'essai en solution vraie;
- qualité de l'eau dans les enceintes d'essai: pH, dureté, température et concentration d'oxygène dissous.
- Informations détaillées sur l'alimentation (par exemple type d'aliments, provenance, quantité donnée et fréquence) et analyse des contaminants pertinents (PCB, HAP et pesticides organochlorés, par exemple).

Résultats

- données disponibles démontrant que les témoins ont rempli les critères de validité: les données sur le taux d'éclosion sont présentées sous forme de tableaux indiquant le pourcentage par réplicat et par concentration. Les résultats aberrants par rapport aux critères de validité (dans les témoins) sont soulignés. La survie est présentée sous forme de pourcentage par réplicat et par concentration. Les résultats aberrants par rapport aux critères de validité (dans les témoins) sont soulignés.
 - Indication claire des résultats obtenus par rapport aux différents effets observés: survie des embryons et réussite de l'éclosion; anomalies externes; longueur et poids; dosages de la VTG (ng/g d'homogénat, ng/ml de plasma ou ng/mg de foie); données sur l'histologie gonadique, le ratio mâles/femelles et le sexe génétique; fréquence des réactions inhabituelles des poissons et des effets visibles produits par la substance chimique d'essai.
62. Les résultats sont présentés sous forme de valeurs moyennes $\pm$ l'écart-type ou l'erreur-type. Les résultats statistiques sont notés au minimum sous forme de DSEO et de CMEO et d'intervalles de confiance. Le diagramme de décision (Appendice 8) est suivi.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (1992), *Poisson, Essai de Toxicité aux Premiers Stades de la Vie*, Ligne directrice n° 210 pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- (2) Jobling, S., D. Sheahan, J. A. Osborne, P. Matthiessen, and J. P. Sumpter, 1996, "Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals", *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, pp. 194-202.
- (3) Sumpter, J. P. and S. Jobling, 1995, "Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment", *Environmental Health Perspectives* 103, pp. 173-178.
- (4) Tyler, C. R., R. van Aerle, T. H. Hutchinson, S. Maddix, and H. Trip (1999), "An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin", *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, pp. 337-347.
- (5) Holbech, H., L. Andersen, G. I. Petersen, B. Korsgaard, K. L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), "Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 130, pp. 119-131.
- (6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), "Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disruptors", *Fish Physiology and Biochemistry* 28, pp. 319-321.
- (7) Orn, S., H. Holbech, T. H. Madsen, L. Norrgren, and G. I. Petersen (2003), "Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone", *Aquatic Toxicology* 65, pp. 397-411.

- (8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), "Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances", *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 319-326.
- (9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and Z.J. Wang (2007), "Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults", *Comparative Biochemistry and Physiology C- Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 533-541.
- (10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V. Sullivan (1999), "Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds", *Comparative Biochemistry and Physiology C- Toxicology & Pharmacology* 123, pp. 113-125.
- (11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and J.M. Porcher (2002), "Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)", *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 1699-1708.
- (12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), "Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin", *Comparative Biochemistry and Physiology C- Toxicology & Pharmacology* 132, pp. 161-169.
- (13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), "The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption — II — kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction", *Aquatic Toxicology* 70, pp. 311-326.
- (14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), "Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka", *Journal of Health Science* 50, pp. 301-308.
- (15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), "Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin", *Aquatic Toxicology*, 78, pp. 202-206.
- (16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), "Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)", *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, pp. 105.
- (17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S., Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), "Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597*, pp. 48-51.
- (18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), "Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, pp. 621-633.
- (19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), "Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha- ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, pp. 237-243.
- (20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), "Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish", *Sexual Development* 3, pp. 136-151.
- (21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), "An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*", *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, pp. 1088-1098.
- (22) OCDE (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Série sur les essais et l'évaluation N° 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OCDE, Paris.
- (23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), "Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*", *Developmental Dynamics* 231, pp. 518-526.

- (24) Shinomiya,A., H.Otake, K.Togashi, S.Hamaguchi, and M.Sakaizumi (2004), "Field survey of sex- reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations", *Zoological Science* 21, pp. 613-619.
- (25) Kidd,K.A., P.J.Blanchfield, K.H.Mills, V.P.Palace, R.E.Evans, J.M.Lazorchak, and R.W.Flick (2007), "Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, pp. 8897-8901.
- (26) Palace,V.P., R.E.Evans, K.G.Wautier, K.H.Mills, P.J.Blanchfield, B.J.Park, C.L.Baron, and K.A.Kidd (2009), "Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, pp. 1920-1935.
- (27) Panter,G.H., T.H.Hutchinson, K.S.Hurd, J.Bamforth, R.D.Stanley, S.Duffell, A.Hargreaves, S.Gimeno, and C.R.Tyler (2006), "Development of chronic tests for endocrine active chemicals — Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)", *Aquatic Toxicology* 77, pp. 279-290.
- (28) Holbech,H., K.Kinnberg, G.I.Petersen, P.Jackson, K.Hylland, L.Norrgren, and P.Bjerregaard (2006), "Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (EDSP)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 144, pp. 57-66.
- (29) Andersen,L., K.Kinnberg, H.Holbech, B.Korsgaard, and P.Bjerregaard (2004), "Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)", *Fish Physiology and Biochemistry* 30, pp. 257-266.
- (30) Morthorst,J.E., H.Holbech, and P.Bjerregaard (2010), "Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations", *Aquatic Toxicology* 98, pp. 336-343.
- (31) Kiparissis,Y., T.L.Metcalf, G.C.Balch, and C.D.Metcalf (2003), "Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)", *Aquatic Toxicology* 63, pp. 391-403.
- (32) Panter,G.H., T.H.Hutchinson, K.S.Hurd, A.Sherren, R.D.Stanley, and C.R.Tyler (2004), "Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development", *Aquatic Toxicology* 70, pp. 11-21.
- (33) Kinnberg,K., H.Holbech, G.I.Petersen, and P.Bjerregaard (2007), "Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 165-170.
- (34) Chapitre C.14 de la présente annexe: Poisson, essai sur la croissance des juvéniles.
- (35) Chapitre C.4 de la présente annexe: Détermination de la biodégradabilité "facile".
- (36) OCDE (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Série sur les essais et l'évaluation N° 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OCDE, Paris.
- (37) OCDE (2009), *Essai à court terme de reproduction des poissons*, Ligne directrice N° 229 pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- (38) Chapitre C.37 de la présente annexe: Essai de 21 jours sur les poissons: essai de dépistage à court terme de l'activité oestrogénique et androgénique, et de l'inhibition de l'aromatase.
- (39) OCDE (2012), *Fish Toxicity Testing Framework*, Série sur les essais et l'évaluation N° 171, OCDE, Paris.
- (40) Schäfers, C., Teigeler,M., Wenzel,A., Maack,G., Fenske,M., Segner,H (2007), "Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*" *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 70, 9-10 pp 768-779.
- (41) OCDE (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Série sur les essais et l'évaluation N° 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OCDE, Paris.

- (42) OCDE (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Série sur les essais et l'évaluation N° 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OCDE, Paris.
 - (43) OCDE (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Série sur les essais et l'évaluation N° 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OCDE, Paris.
 - (44) Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. JO L 276 du 20.10.2010, p. 33.
-

*Appendice 1***Abréviations et définitions**

Effet apical: ayant des effets au niveau de la population

VSA: valeur de la saturation en air

Biomarqueur: ayant des effets au niveau individuel

Substance chimique: une substance ou un mélange

DMY: gène lié à Y du domaine DM indispensable au développement des caractères masculins chez le medaka japonais

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): essai d'immuno-absorption enzymatique

Poids de poissons: poids frais de poissons (à sec)

EDSP: essai de développement sexuel des poissons

Axe HHG: axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

Hermaphrodite: poisson ayant plus d'un ovocyte dans les testicules par lot de six coupes analysées ou des cellules spermatogéniques dans les ovaires (oui/non)

Taux de charge: poids frais de poissons par unité de volume d'eau

RT-PCR: transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne par polymérase

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Poisson indifférencié: poisson dont les gonades sont dénuées de cellules germinales visibles

VTG: vitellogénine

Appendice 2

Conditions expérimentales de l'EDSP (espèces d'eau douce)

1. Espèces recommandées	Medaka japonais (<i>Oryzias latipes</i>)	Poisson-zèbre (<i>Danio rerio</i>)	Épinoche à trois épines (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
2. Type d'essai	dynamique ou semi-statique	dynamique ou semi-statique	dynamique ou semi-statique
3. Température de l'eau	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Qualité de l'éclairage	Ampoules fluorescentes (à large spectre)	Ampoules fluorescentes (à large spectre)	Ampoules fluorescentes (à large spectre)
5. Intensité de l'éclairage	10-20 µE/m²/s, 540-1 080 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)	10-20 µE/m²/s, 540-1 080 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)	10-20 µE/m²/s, 540-1 080 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)
6. Photopériode	12-16 h de lumière, 8-12 h d'obscurité	12-16 h de lumière, 8-12 h d'obscurité	16 h de lumière, 8 d'obscurité
7. Volume minimum des enceintes	Chaque enceinte peut contenir au moins 7 l d'eau	Chaque enceinte peut contenir au moins 7 l d'eau	Chaque enceinte peut contenir au moins 7 l d'eau
8. Remplacement volumique des solutions d'essai	Minimum 5 fois/jour	Minimum 5 fois/jour	Minimum 5 fois/jour
9. Âge des organismes d'essai au début de l'exposition	Œufs nouvellement fécondés (au stade du blastodisque)	Œufs nouvellement fécondés (au stade du blastodisque)	Œufs nouvellement fécondés
10. Nombre d'œufs par traitement	Minimum 120	Minimum 120	Minimum 120
11. Nombre de traitements	Minimum 3 (plus témoins appropriés)	Minimum 3 (plus témoins appropriés)	Minimum 3 (plus témoins appropriés)
12. Nombre de réplicats par traitement	Minimum 4 (sauf répartition par racine carrée dans les témoins)	Minimum 4 (sauf répartition par racine carrée dans les témoins)	Minimum 4 (sauf répartition par racine carrée dans les témoins)
13. Régime alimentaire	Artémies vivantes, nauplies d'artémies adultes congelées, flocons, etc. Il est recommandé de nourrir les poissons deux fois par jour.	Friture spéciale, artémies vivantes, nauplies d'artémies adultes congelées, flocons, etc. Il est recommandé de nourrir les poissons deux fois par jour.	Artémies vivantes, nauplies d'artémies adultes congelées, flocons, etc. Il est recommandé de nourrir les poissons deux fois par jour.

14. Aération	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 70 % de la valeur de la saturation en air
15. Eau de dilution	Eau de surface, de puits ou reconstituée	Eau de surface, de puits ou reconstituée	Eau de surface, de puits ou reconstituée
16. Durée de l'exposition à la substance chimique d'essai	60 jours après l'éclosion	60 jours après l'éclosion	60 jours après l'éclosion
17. Effets biologiques mesurés	Éclosion réussie, survie, morphologie brute, VTG, histologie gonadique, sexe génétique, ratio mâles/femelles	Éclosion réussie, survie, morphologie brute, VTG, histologie gonadique, ratio mâles/femelles	Éclosion réussie, survie, morphologie brute, VTG, histologie gonadique, ratio mâles/femelles
18. Critères de validité de l'essai pour les lots de réplicats des témoins	Éclosion réussie > 80	Éclosion réussie > 80	Éclosion réussie > 80
	Survie après éclosion ≥ 70 %	Survie après éclosion ≥ 70 %	Survie après éclosion ≥ 70 %
	Croissance (poids frais de poissons à sec) > 150 mg	Croissance (poids frais de poissons à sec) > 75 mg	Croissance (poids frais de poissons à sec) > 120 mg
	Longueur (longueur standard) > 20 mm	Longueur (longueur standard) > 14 mm	Longueur (longueur standard) > 20 mm
	Ratio mâles/femelles 30 %-70 %	Ratio mâles/femelles 30 %-70 %	Ratio mâles/femelles 30 %-70 %

*Appendice 3***Caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable**

CONSTITUANT	CONCENTRATIONS
Particules	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

Appendice 4

Extrait de la méthode d'essai C.14/orientations sur les concentrations de substance d'essai

Colonne (Nombre de concentrations entre 100 et 10 ou entre 10 et 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Une série de trois concentrations successives (ou plus) peut être choisie dans une colonne. Les points intermédiaires entre les concentrations d'une colonne (x) se trouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées sous forme de pourcentage en volume ou en poids (mg/l ou µg/l). Les valeurs peuvent être multipliées ou divisées par la puissance de 10 adéquate. On pourra utiliser la première colonne si le degré de toxicité est très incertain.

Appendice 5

Guide d'homogénéisation de la tête et de la queue des juvéniles des espèces poisson- zèbre, tête-de-boule, épinoche à trois épines et medaka japonais

Cette partie a pour objet de décrire les procédures qui précèdent la quantification de la concentration de VTG. D'autres procédures permettant un dosage similaire de la VTG peuvent être utilisées. La concentration de VTG peut, de manière optionnelle, être déterminée dans le plasma sanguin ou le foie au lieu d'un homogénat tête-queue.

Procédure

1. Les poissons sont anesthésiés puis euthanasiés conformément à la description de l'essai.
2. La tête et la queue des poissons sont coupées conformément à la description de l'essai. **Note importante:** tous les instruments de dissection ainsi que la planche à découper sont rincés et lavés correctement (avec de l'éthanol à 96 %, par exemple) entre chaque manipulation de poisson pour éviter que la vitellogénine des femelles ou des mâles induits ne "pollue" les mâles non-induits.
3. L'ensemble tête-queue de chaque poisson est pesé au mg prêt.
4. Après avoir été pesés, les morceaux sont placés dans des tubes appropriés (Eppendorf de 1,5 ml, par exemple) et stockés à une température de – 80 °C jusqu'à leur homogénéisation ou bien directement homogénéisés sur de la glace avec deux pilons en plastique (d'autres méthodes peuvent être utilisées si elles impliquent de la glace et permettent d'obtenir une masse homogène). **Note importante:** les tubes sont numérotés correctement de façon que la tête et la queue du poisson puissent être reliées à la partie du corps correspondante utilisée pour l'histologie gonadique.
5. Après obtention d'une masse homogène, on ajoute un **tampon d'homogénéisation (*)** glacé représentant 4-10 x la masse pondérale tissulaire (noter la dilution). Continuer à pilonner jusqu'à ce que le mélange soit homogène. **Note importante:** de nouveaux pilons sont utilisés pour chaque poisson.
6. Les échantillons sont posés sur de la glace jusqu'à centrifugation à 50 000 g pendant 30 min. et à une température de 4 °C.
7. Utiliser une pipette pour répartir des portions de 20 à 50 µl (noter la quantité) de surnageant dans **au moins deux** tubes en plongeant l'embout de la pipette sous la couche lipidique située à la surface et en aspirant doucement le surnageant sans fraction lipidique ni culot.
8. Les tubes sont stockés à une température de – 80 °C jusqu'à leur utilisation.

(*) *Tampon d'homogénéisation:*

50 mM de Tris-HCl de pH 7,4; 1 % de cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma); 12 ml de Tris-HCl de pH 7,4 + 120 µl de cocktail d'inhibiteurs de protéase (ou de cocktails d'inhibiteurs de protéase équivalents).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Cocktail d'inhibiteurs de protéase: de chez Sigma (pour les tissus mammaliens). Numéro de produit **P 8340**.

Note: Le tampon d'homogénéisation est utilisé le jour de sa fabrication. Placer sur de la glace pendant son utilisation

Appendice 6

Guide de quantification de la vitellogénine dans des homogénats tête-queue de poisson-zèbre (Danio Rerio) (modifié à partir de Holbech et al., 2001). d'autres procédures utilisant des anticorps et des standards homologues peuvent être utilisées.

1. Décongeler les plaques de microtitration (certifiées Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Danemark) recouvertes au préalable de 5 mg/ml d'anti-IgG de lipovitelline de poisson-zèbre puis les laver 3 fois avec un tampon de lavage (*).
2. Diluer en série le standard de vitellogénine de poisson-zèbre ⁽¹⁾ purifié à raison de 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10 et 20 ng/ml dans un tampon de dilution (**) et diluer les échantillons au moins 200 fois (pour éviter l'effet de matrice) dans le tampon de dilution puis les poser sur les plaques. Dupliquer un contrôle d'essai. Verser 150 µl dans chaque puits. Dupliquer les standards et tripliquer les échantillons. Faire incuber pendant une nuit à 4 °C sur un agitateur.
3. Laver 5 fois les plaques avec le tampon de lavage (*).
4. Diluer HPR associé à une chaîne de dextrane (AMDEX A/S, Danemark, par exemple) et les anticorps conjugués dans le tampon de lavage; la dilution réelle diffère selon le lot et l'âge. Verser 150 µl dans chaque puits et mettre les plaques en incubation pendant 1 heure à température ambiante sur un shaker.
5. Laver 5 fois les plaques avec le tampon de lavage (*), et nettoyer soigneusement le fond des plaques avec de l'éthanol.
6. Verser 150 µl de TMB plus (***) dans chaque puits. Protéger les plaques de la lumière avec du papier aluminium puis observer le changement de couleur sur un shaker.
7. Une fois la courbe d'étalonnage obtenue, stopper l'activité enzymatique en versant 150 µl 0,2 M de H₂SO₄ dans chaque puits.
8. Mesurer l'absorbance à hauteur de 450 nm (sur un lecteur de plaque de dispositifs moléculaires Thermomax). Analyser les données sur le logiciel associé (Softmax, par exemple).

(*) Tampon de lavage:

Stock de PBS (****)	500,0 ml
Sérum d'albumine bovine	5,0 g
Tween 20	5,0 ml

Rééquilibrer le pH à 7,3 et verser dans 5 l d'eau filtrée sur membrane millipore. Stocker à 4 °C.

(**) Tampon de dilution:

Stock de PBS (****)	100,0 ml
Sérum d'albumine bovine	3,0 g
Tween 20	1,0 ml

Rééquilibrer le pH à 7,3 et verser dans 1 l d'eau filtrée sur membrane millipore. Stocker à 4 °C.

⁽¹⁾ Battelle AP4.6.04 [1,18 mg/ml (AAA)], purifié conformément à: Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: 385-398.

(***) Le TMB plus est un substrat “prêt à l'emploi” produit par KemEnTec (Danemark). Il est photosensible. Stocker à 4 °C.

(****) Stock de PBS

NaCl	160,0 g

KH ₂ PO ₄	4,0 g

Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	26,6 g

KCl	4,0 g

Rééquilibrer le pH à 6,8 et verser dans 2 l d'eau filtrée sur membrane millipore. Stocker à température ambiante

*Appendice 7***Guide de préparation des coupes tissulaires pour la détermination du sexe et le classement par stade des gonades**

Cette partie a pour objet de décrire les procédures qui précèdent l'évaluation des coupes histologiques. D'autres procédures similaires de détermination du sexe et de classement par stade des gonades peuvent être utilisées.

À quelques exceptions près, ces procédures sont similaires pour le medaka japonais et le poisson-zèbre.

Euthanasie, autopsie et fixation des tissus*Objectifs:*

1. Euthanasier les poissons sans les faire souffrir.
2. Obtenir les poids corporels et les mesures nécessaires.
3. Évaluer les caractères sexuels secondaires.
4. Disséquer les tissus pour l'analyse de la VTG.
5. Fixer les gonades.

Procédures:

1. Les poissons sont euthanasiés immédiatement avant l'autopsie. Par conséquent, à moins que les prosecteurs soient nombreux, les poissons ne sont pas sacrifiés en nombre simultanément.
2. Transférer un poisson de l'enceinte d'essai vers la zone d'autopsie du conteneur de transport avec l'épuisette.
3. Placer le poisson dans la solution euthanasique. Retirer le poisson de la solution lorsqu'il ne respire plus et qu'il ne répond plus aux stimuli extérieurs.
4. Mesurer le poids frais du poisson.
5. Pour la préparation des tissus à l'analyse de la VTG, le poisson peut être placé sur un carreau de liège sur la plateforme élevée d'un microscope à dissection.
 - a. Chez le poisson-zèbre, couper la tête juste derrière la nageoire pectorale et la queue juste derrière la nageoire dorsale.
 - b. Chez le medaka japonais, ouvrir l'abdomen en pratiquant soigneusement une incision le long de la ligne médiane allant de l'attache pectorale à un point situé juste au-dessus de l'anus. Exciser délicatement le foie à l'aide de pincettes et de ciseaux.
6. Placer les spécimens pour l'analyse de la VTG dans des tubes Eppendorf et les congeler immédiatement dans de l'azote liquide.
7. Placer la carcasse avec les gonades dans une cassette à tissus en plastique pré-étiquetée qui sera transférée dans un liquide fixateur de Davidson ou de Bouin. Le volume de fixateur est supérieur ou égal à 10 fois le volume approximatif des tissus. Agiter doucement le conteneur avec le fixateur pendant cinq secondes pour évacuer les bulles d'air de la cassette.
8.
 - a. Laisser les tissus dans le fixateur de Davidson pendant une nuit puis les transférer dans des conteneurs individuels de formol tamponné à 10 % le lendemain. Agiter doucement les conteneurs avec les cassettes pendant 5 secondes pour que le formol pénètre bien dans les cassettes.
 - b. Laisser les tissus dans le fixateur de Bouin pendant 24 h puis les transférer dans de l'éthanol à 70 %.

Traitement des tissus*Objectifs:*

1. Déshydrater les tissus pour une bonne pénétration de la paraffine.
2. Imprégner les tissus de paraffine pour maintenir l'intégrité des tissus et créer une surface ferme pour la microtomie.

Procédures:

3. Retirer les cassettes étiquetées contenant les tissus du formol/de l'éthanol puis placer les cassettes dans le(s) panier(s) de traitement. Charger le panier dans l'appareil de traitement.
4. Sélectionner le programme de traitement.
5. À la fin du cycle de traitement, le(s) panier(s) peut/peuvent être transféré(s) vers la station d'inclusion.

Inclusion*Objectif:*

Placer correctement le spécimen dans la paraffine solidifiée pour la microtomie.

Procédures:

1. Retirer le(s) panier(s) des cassettes de l'appareil puis immerger le(s) panier(s) dans l'enceinte- avant, remplie de paraffine, de la console thermique de la station d'inclusion, ou déplacer les cassettes vers un réchauffeur de paraffine séparé.
2. Retirer la première cassette à inclure de l'enceinte-avant de la console thermique ou du réchauffeur de paraffine. Retirer et mettre au rebut le couvercle de la cassette puis vérifier l'étiquette de la cassette par rapport aux données enregistrées sur les animaux afin de corriger les écarts éventuels avant inclusion.
3. Sélectionner un moule d'inclusion aux dimensions adéquates.
4. Placer le moule sous le bec verseur de la console de distribution et le remplir de paraffine fondue.
5. Retirer le spécimen de la cassette et le placer dans le moule rempli de paraffine fondue. Répéter cette opération avec 4-8 spécimens pour chaque moule de paraffine. Marquer la position de chaque poisson en plaçant le poisson n° 1 à 180 degrés des poissons 2-4/8.
6. Recouvrir le spécimen d'une couche de paraffine supplémentaire.
7. Placer le moule et le fond de la cassette sur la plaque froide de la console cryogénique.
8. Une fois la paraffine solidifiée, démouler le bloc (à savoir la paraffine durcie contenant les tissus et le fond de la cassette).

Microtomie*Objectif:*

Réalisation et montage de coupes histologiques en vue de leur coloration.

Procédures:

1. La première phase de la microtomie, appelée "facing" se déroule ainsi:
 - a. Placer le bloc de paraffine dans le porte-bloc du microtome.
 - b. Avancer le porte-bloc en faisant tourner la roue du microtome et effectuer des coupes épaisses à la surface du bloc de paraffine jusqu'à ce que la lame atteigne les tissus inclus.

- c. Régler l'épaisseur de coupe du microtome sur 3-5 microns. Avancer le porte- bloc et réaliser de nombreuses coupes dans le bloc pour supprimer les éventuels phénomènes parasites provoqués à la surface de coupe du tissu lors de la préparation.
 - d. Retirer le bloc du porte-bloc et le placer à l'envers sur de la glace pour détremper le tissu.
2. La phase suivante de la microtomie correspond à la réalisation des coupes finales et à la confection des lames. La procédure est la suivante:
- a. Si le bloc a été placé sur de la glace, retirer le bloc de la glace puis le replacer dans le porte-bloc du microtome.
 - b. L'épaisseur de coupe étant réglée sur 3-5 microns, avancer le porte-bloc en faisant tourner la roue du microtome. Confectionner un "ruban" de coupes comptant au moins une coupe acceptable comprenant les gonades. (Si nécessaire, pendant la réalisation des coupes, retirer le bloc du porte-bloc, le placer sur de la glace pour détremper le tissu puis le replacer dans le porte- bloc).
 - c. Déplier les coupes par flottaison à la surface du bain-marie. Essayer d'obtenir au moins une coupe sans plis et sans bulles d'air emprisonnées en dessous.
 - d. Immerger une lame sous la meilleure coupe puis sortir celle-ci de l'eau à l'aide de la lame. Ce procédé est appelé "montage" de la coupe sur la lame ou "confection des lames".
 - e. Préparer trois coupes pour un ensemble de poissons. Effectuer la deuxième et la troisième coupe à 50 microns d'intervalle de la première. Si les poissons ne sont pas inclus avec leurs gonades dans le même niveau de coupe, effectuer plus de coupes pour s'assurer qu'au moins six coupes comprenant les gonades sont obtenues de chaque poisson.
 - f. Noter sur la lame, à l'aide d'un marqueur spécial, le numéro du bloc à partir duquel la lame a été confectionnée.
 - g. Placer la lame sur un support pour coloration de lames.
 - h. Retirer le bloc du porte-bloc puis le placer à l'envers pour stockage.

Coloration, application des lamelles et étiquetage des lames

Objectifs:

- Coloration des coupes en vue de l'analyse histopathologique
- Coloration et montage étanche permanents des tissus
- Identification permanente des coupes colorées de manière à assurer une traçabilité parfaite.

Procédures:

1. Coloration

- a. Laisser sécher les lames à l'air libre toute une nuit avant leur coloration.
- b. Colorer les coupes à l'hématoxyline-éosine.

2. Application des lamelles

- a. Les lamelles peuvent être appliquées manuellement ou automatiquement.
- b. Tremper une lame dans du xylène ou du TissueClear®, puis retirer délicatement l'excès de xylène/TissueClear® de la lame.
- c. Appliquer 0,1 ml environ de medium de montage près du bord de la lame à l'opposé du bord dépoli ou sur la lamelle.
- d. Appliquer la lamelle sur la lame en l'inclinant légèrement.

3. Étiquetage des lames

e. Chaque étiquette contient les informations suivantes:

- i. Nom du laboratoire
 - ii. Espèce
 - iii. Spécimen n°/lame n°
 - iv. Groupe de traitement chimique
 - v. Date
-

Diagramme de décision statistique pour l'analyse de la vitellogénine

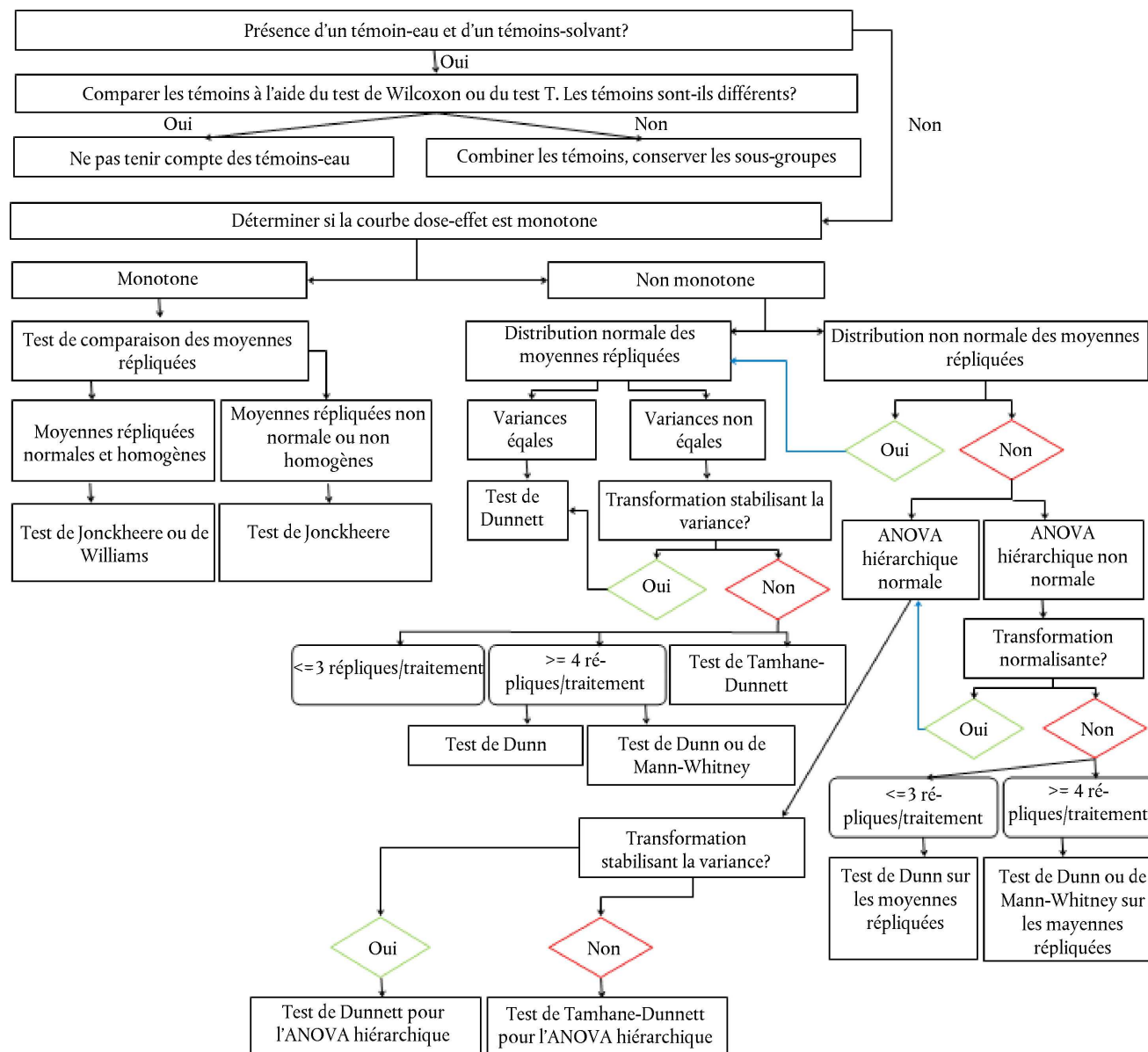
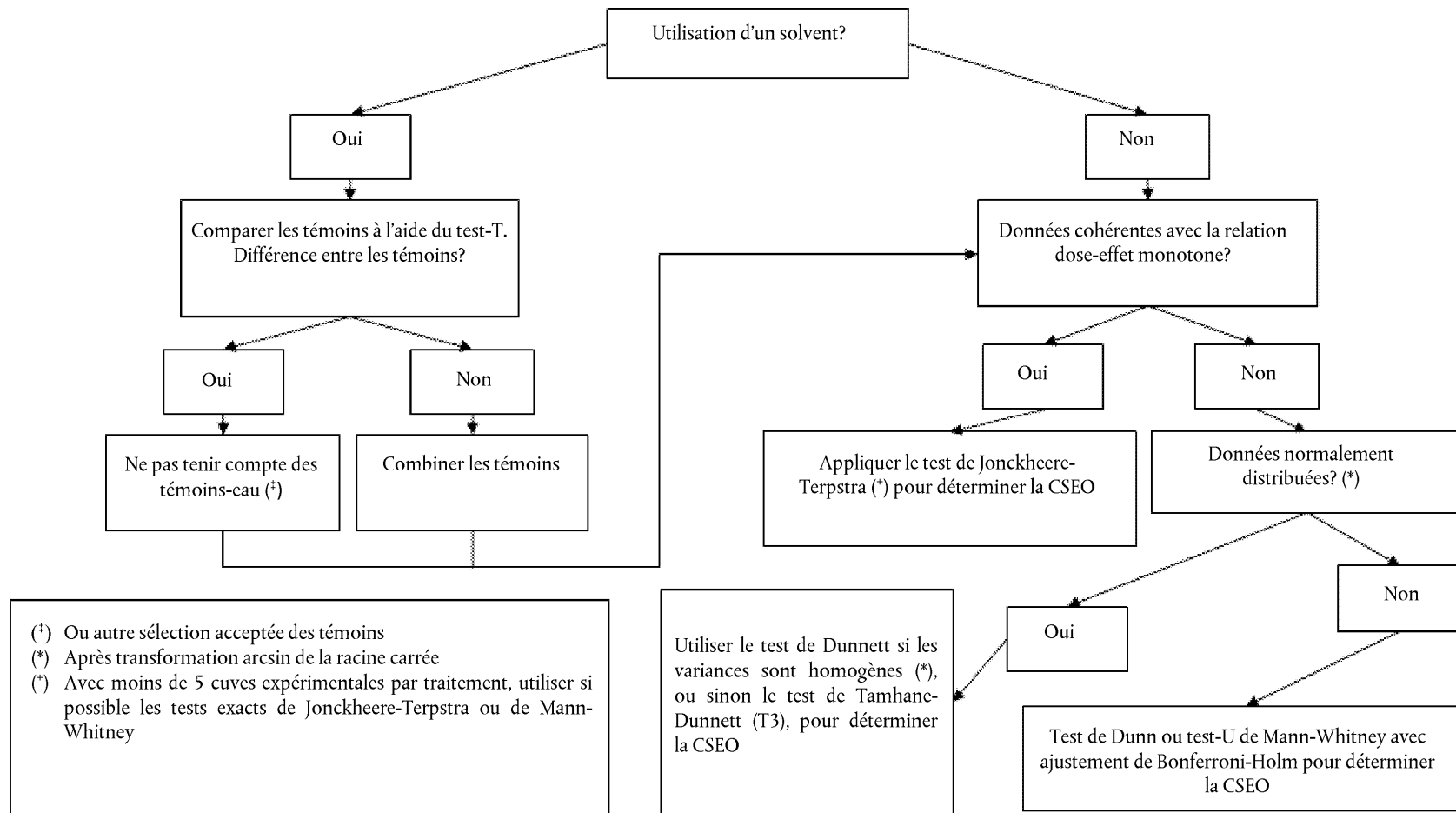


Diagramme de décision statistique pour l'analyse du ratio mâles/femelles



Appendice 9

Recommandation pour le prélèvement tissulaire pour la détermination du sexe génétique par réaction en chaîne par polymérase (PCR)**Prélèvement, préparation et stockage des tissus avant détermination du sexe génétique par réaction en chaîne par polymérase (PCR) chez le medaka (préparé par le laboratoire pour les organismes aquatiques de Bayer CropScience AG)**

1. Couper la nageoire anale ou dorsale de chaque poisson à l'aide de ciseaux à fine lame et la placer dans un tube rempli de 100 µl de tampon d'extraction 1 (la préparation du tampon est détaillée ci-dessous). Nettoyer les ciseaux après chaque poisson dans un bécher rempli d'eau distillée puis les sécher avec du papier absorbant.
2. Homogénéiser les nageoires avec un pilon de micro-tube en teflon pour lyser les cellules. Pour chaque tube, utiliser un pilon neuf pour éviter toute contamination. Placer les pilons une nuit dans 0,5 M de NaOH, les rincer 5 minutes dans de l'eau distillée puis les conserver dans de l'éthanol ou en milieu stérile après passage en autoclave jusqu'à utilisation.
3. Il est également possible de stocker les nageoires sans tampon d'extraction 1 sur de la glace carbonique puis dans un réfrigérateur à une température de -80°C pour éviter toute dégradation de l'ADN. Néanmoins, l'extraction se fait mieux si l'on extrait l'ADN simultanément (pour la manipulation, voir ci-dessus; décongeler les échantillons sur de la glace après conservation à une température de -80°C avant de remplir les tubes de tampon).
4. Après avoir homogénéisé tous les tubes, les mettre au bain-marie puis les porter à ébullition pendant 15 minutes à une température de 100°C .
5. Remplir chaque tube de 100 µl de tampon d'extraction 2 (la préparation du tampon est détaillée ci-dessous) à l'aide d'une pipette. Conserver les échantillons à température ambiante pendant 15 minutes et, pendant ce temps, les remuer délicatement de temps en temps avec la main.
6. Remettre ensuite tous les tubes au bain-marie puis les porter de nouveau à ébullition pendant 15 minutes à une température de 100°C .
7. En attendant l'analyse plus approfondie, congeler les tubes à -20°C .

Préparation des tampons:

Tampon 1 utilisé pour la réaction PCR:

500 mg de N-Lauroylsarcosine (Merck KGaA, Darmstadt, GE, par exemple)

2 ml 5M de NaCl

ajouter 100 ml d'eau distillée

→ autoclaver

Tampon 2 utilisé pour la réaction PCR:

20 g de Chelex (Biorad, Munich, GE, par exemple)

Gonfler dans 100 ml d'eau distillée

→ autoclaver

Détermination du sexe génétique (par PCR) chez le medaka (préparé par le laboratoire pour les organismes aquatiques de Bayer CropScience AG et Biozentrum de l'université de Würzburg)

Décongeler les tubes préparés et congelés (tel que décrit dans la partie précédente) sur de la glace. Ensuite, centrifuger les tubes avec une centrifugeuse Eppendorf (30 sec à vitesse maximale, à température ambiante). Pour la PCR, utiliser le surnageant clair séparé du précipité. Veiller absolument à ce qu'aucune trace de Chelex (situé dans le précipité) ne soit transférée vers la réaction PCR, car cela provoquerait des interférences avec l'activité de la Taq polymérase. Utiliser directement le surnageant ou le congeler (à -20°C) puis le faire de nouveau décongeler suivant plusieurs cycles sans effet négatif sur l'ADN pour les analyses ultérieures.

1. Préparation du "mélange réactif" (25 µl par échantillon):

	Volume	Concentration finale
Modèle d'ADN	0,5µl-2µl	
tampon 10x pour PCR avec MgCl ₂	2,5µl	1x
Nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4µl (5mM)	200µM
Amorce sens (10 µM) (voir ci-dessous 3-5)	0,5µl	200nM
Amorce anti-sens (10 µM) (voir ci-dessous 3-5)	0,5µl	200nM
DMSO	1,25µl	5 %
Eau (classe PCR)	jusqu'à 25 µl	
Taq E- Polymérase	0,3µl	1,5U

Tampon 10x pour PCR avec MgCl₂: 670 mM de Tris/HCl (pH 8,8 à 25 °C), 160 mM de (NH₄)₂SO₄, 25 mM de MgCl₂, 0,1 % de Tween 20

Pour chaque PCR (voir ci-dessous 3-5), on a besoin de l'amorce spéciale comme nouvelle combinaison de "mélange réactif" et du volume adéquat nécessaire de modèle d'ADN pour chaque échantillon (voir ci-dessus). Les volumes respectifs seront transférés dans de nouveaux tubes à l'aide de pipettes. Les tubes seront ensuite fermés, agités (10 s environ) et centrifugés (10 s à température ambiante). À ce moment, les programmes de PCR respectifs pourront être initiés. De plus, un témoin positif (échantillon d'ADN servant d'exemple, dont l'activité est connue et les résultats sont clairs) et un témoin négatif (1 µl d'eau distillée) seront utilisés dans chaque programme de PCR.

2. Préparation du gel d'agarose (1 %) — Pendant le fonctionnement des programmes de PCR:

- Dissoudre 3 g d'agarose dans 300 ml de solution tampon TAE 1 × (gel d'agarose 1 %)
- Porter cette solution à ébullition aux micro-ondes (2-3 min environ)
- Transférer la solution chaude dans un moule spécial posé sur de la glace
- Au bout de 20 minutes environ, le gel d'agarose est prêt à l'emploi
- Stocker le gel d'agarose dans la solution tampon TAE 1 × jusqu'à la fin des programmes de PCR

3. Programme de PCR pour actines:

Cette réaction PCR vise à démontrer que l'ADN présent dans l'échantillon n'est pas détérioré.

- Amorce spécifique:

"M act 1(upper/forward)" → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

"M act 2(lower/reverse)" → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

- Programme:

5 min à 95 °C

Cycle (35 fois):

Dénaturation → 45 sec à 95 °C

Hybridation → 45 sec à 56 °C

Élongation → 1 min à 68 °C

15 min à 68 °C

4. Programme de PCR pour gènes X et Y:

Les échantillons dont l'ADN est intact seront utilisés dans ce programme de PCR pour détecter les gènes X et Y. L'ADN des mâles comporte une double bande et l'ADN des femelles une seule bande (après coloration et électrophorèse sur gel d'agarose). Si l'on utilise ce programme, on intégrera un témoin positif pour les mâles (échantillon XY) et un pour les femelles (échantillon XX).

— Amorce spécifique:

“PG 17.5” (upper/forward) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

“PG 17.6” (lower/reverse) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Programme:

5 min à 95 °C

Cycle (40 fois):

Dénaturation → 45 sec à 95 °C

Hybridation → 45 sec à 55 °C

Élongation → 1 min 30 sec à 68 °C

15 min à 68 °C

5. Programme de PCR pour gènes Y servant de “témoin” pour le programme de PCR pour gènes X et Y:

Ce programme permet de vérifier les résultats du “programme de PCR pour gènes X et Y”. Les “échantillons mâles” doivent comporter une bande et les “échantillons femelles” ne doivent en comporter aucune (après coloration et électrophorèse sur gel d'agarose).

— Amorce spécifique:

“DMTYa (upper/forward)” → GGC CGG GTC CCC GGG TG

“DMTYd (lower/reverse)” → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Programme:

5 min à 95 °C

Cycle (40 fois):

Dénaturation → 45 sec à 95 °C

Hybridation → 45 sec à 56 °C

Élongation → 1 min à 68 °C

15 min à 68 °C

6. Coloration des échantillons de PCR:

Solution de coloration:

50 % de glycérol

100 mM d'EDTA

1 % de SDS

0,25 % de bleu de bromophénol

0,25 % de xylène cyanol

Verser 1 µl de cette solution dans chaque tube à l'aide d'une pipette.

7. Début de l'électrophorèse sur gel d'agarose:

— Transférer la préparation de gel d'agarose 1 % dans une enceinte d'électrophorèse sur gel remplie de tampon TAE 1x

— Verser 10-15 µl de chaque échantillon de PCR coloré dans une fente de gel d'agarose à l'aide d'une pipette

- Verser 5-15 µl de 1kb-“Ladder” (Invitrogène) dans une fente séparée à l'aide d'une pipette
- Commencer l'électrophorèse avec 200 V
- Arrêter au bout de 30-45 min

8. *Détermination des bandes:*

- Nettoyer le gel d'agarose avec de l'eau distillée.
 - Transférer le gel d'agarose dans du bromure d'éthidium pendant 15-30 min —
 - Photographier le gel d'agarose exposé à des rayonnements ultra-violets
 - Analyser les échantillons en les comparant à la bande/aux bandes témoin(s) positive(s) et à l'échelle
-

Appendice 10

Guide de prélèvement tissulaire pour la détermination du sexe génétique par réaction en chaîne par polymérase chez l'épinoche**Prélèvement tissulaire et extraction de l'ADN**

L'ADN peut être extrait au moyen d'une variété de réactifs disponibles dans le commerce, et en utilisant des procédés d'extraction manuelle ou automatique. Le protocole utilisé au laboratoire CEFAS de Weymouth est décrit ci-dessous, et des méthodes alternatives ont été ajoutées dans certains cas.

1. Au moyen de ciseaux fins, un petit morceau tissulaire (10-20 mg) de la partie dorso-latérale (après prélèvement de la tête et de la queue pour la mesure de la vitellogénine) est prélevé de chaque poisson individuellement. Le tissu est placé dans un tube et soit directement placé dans l'azote liquide (conservation à -80°C), soit rempli par de l'éthanol à 70 % (pour un transport et une conservation à 4°C). Les ciseaux sont nettoyés après chaque dissection de poisson individuellement dans de l'éthanol à 70 %, puis trempés dans de l'eau distillée avant d'être séchés sur du papier absorbant.
2. L'éthanol (en cas de présence) est ôté par aspiration et le tissu est digéré du jour au lendemain avec de la protéinase K dans 400 μl de tampon ATL (Qiagen). Un aliquot (200 μl du produit de cette digestion est transféré dans un S-Block (Qiagen) de 96 puits, et l'ADN extrait dans un format de 96 puits utilisant le BioRobot Universel Qiagen et le kit Qlamp Investigator BioRobot. L'ADN est élué dans 50 μl d'une eau exempte de DNase et de RNase. Dans le cas où il est fait usage de prélèvements tissulaires durs pour extraire l'ADN (tel que le rachis ou la nageoire pectorale) il peut s'avérer nécessaire d'homogénéiser l'échantillon dans le tampon de lyse au moyen d'un lyseur de tissu FastPrep® ou un système équivalent de rupture des tissus.

Alternativement,

- a. L'échantillon tissulaire est digéré du jour au lendemain avec la protéinase K dans 400 μl de tampon de lyse G2 (Qiagen) et l'ADN est extrait de 200 μl du produit de digestion en utilisant soit le kit EZ-1 DNA easy tissue et le Biorobot EZ-1, ou alors le mini kit DNA easy tissue. L'ADN est élué dans un volume de 50 μl .
 - b. Les prélèvements tissulaires sont soumis au réactif DNazol. Les prélèvements sont rapidement lysés dans 1 ml de DNazol pendant 10 min dans un tube de 1,5 ml à l'intérieur d'une centrifugeuse, suivi d'une centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 min afin d'enlever toutes les particules. L'échantillon lysé est ensuite transféré dans un nouveau tube de centrifugation de 1,5 ml contenant 500 μl d'éthanol à 100 %, puis centrifugé à 13 000 rpm pendant 10 min pour précipiter l'ADN. L'éthanol est enlevé et remplacé par 400 μl d'éthanol à 70 %, puis centrifugé à 13 000 rpm pendant 5 min et le culot d'ADN est dissous dans 50 μl d'eau exempte d'ADNase et de RNase. A nouveau, dans le cas où il est fait usage de prélèvements tissulaires durs pour extraire l'ADN (tel que le rachis ou la nageoire pectorale) il peut s'avérer nécessaire d'homogénéiser l'échantillon dans le tampon de lyse au moyen d'un lyseur de tissu FastPrep® ou un système équivalent de rupture des tissus, préalablement à l'extraction d'ADN.
3. L'ADN est stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

Note importante: des gants sont portés lors des manipulations

Analyse par réaction en chaîne de la polymérase (PCR)

Les amplifications ont été réalisées au moyen de 2,5 μl d'extrait d'ADN dans un volume réactionnel de 50 μl et en utilisant le Idh locus primers (comme décrit par Peichel et al, 2004. Current biology 1:1416- 1424):

Amorce sens: 5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'

Amorce antisens: 5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

Il existe un grand nombre de fournisseurs de réactifs appropriés pour l'analyse PCR. La méthode décrite ci-dessous est celle actuellement utilisée au laboratoire CEFAS de Weymouth.

1. Préparation du "mélange réactif" (50 µl par échantillon):

Un mastermix est préparé comme suit. Celui-ci peut être préparé à l'avance et conservé à – 20 °C jusqu'à utilisation. Préparer une quantité de mastermix suffisante pour un contrôle négatif (eau de qualité biologie moléculaire uniquement).

	Volume (concentration du stock)/échantillon	Concentration finale
5xGoTaq® Tampon de réaction	10µl	1x
MgCl ₂	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM chaque)	250 µM chaque
Amorce sens	0,5µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Amorce anti-sens	0,5µl (0,1 nmol/µl)	2,0µM
Eau (qualité biologie moléculaire)	30,75 µl	
GoTaq Polymérase	0,25 µl	1,25U

- Déverser 47,5 µl dans un tube à paroi fine de PCR étiqueté 0,5 ml
- Ajouter 2,5 µl d'ADN purifié dans le tube étiqueté approprié Répéter l'opération pour tous les échantillons et le contrôle négatif;
- Ajouter par-dessus 2 gouttes d'huile minérale Alternativement, utiliser un cycleur thermal à couvercle chauffant
- Fermer les couvercles
- Les échantillons ont été dénaturés dans un cycleur thermal Peltier PTC-225 à 94 +/- 2 °C pendant 5 minutes, suivi de 39 cycles de 94 +/- 2 °C pendant 1 minute, 55 +/- 2 °C pendant 1 minute, 72 +/- 2 °C pendant 1 minute, et une extension finale à 72 +/- 2 °C pendant 10 minutes.

2. Préparation du gel d'agarose (2 %):

Traditionnellement les produits de la PCR sont résolus sur gel d'agarose à 20 % contenant du bromure d'éthidium.

Des systèmes d'électrophorèse capillaires peuvent également être utilisés.

- Peser 2g d'agarose dans 100 ml de tampon TAE 1×
- Chauffer dans un four à micro-onde (environ 2-3 minutes) pour dissoudre l'agarose
- Ajouter 2 gouttes de bromure d'éthidium pour atteindre la concentration finale de 0,5 µg/ml
- Transférer la solution encore chaude dans l'équipement de prise du gel
- Attendre que le gel durcisse.

3. Electrophorèse sur gel:

- Transférer le gel d'agarose dans l'appareil d'électrophorèse et immerger dans le tampon de TAE 1×
- Charger 20 µl de chaque échantillon dans un puits séparé, en ajoutant un marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN de 100pb, Promega) dans un puits à part
- Effectuer l'électrophorèse à 120 V pendant 30-45 minutes.

4. *Visualisation des produits d'amplification*

Si le bromure d'éthidium a été incorporé dans le gel d'agarose comme décrit ci-dessus, les produits d'ADN sont visualisés sous une source d'UV. Alternativement, le gel d'agarose est coloré en couvrant le gel par une solution diluée de bromure d'éthidium (0,5 µg/ml dans de l'eau) pendant 30 minutes avant de pouvoir visualiser

Appendice 11

Guide pour la procédure de fertilisation artificielle chez l'épinoche

Le but de cette section est de décrire la procédure pour obtenir des œufs d'épinoche fertilisés pour leur utilisation dans l'essai de développement sexuel.

Procédures*Recueil de sperme chez les mâles*

1. Un mâle bien coloré de la population est euthanasié.
2. Les testicules sont disséqués de chaque côté du poisson. *Les testicules sont généralement très pigmentés, de forme allongée facilement visibles depuis la ligne médiane latérale du corps.* Utiliser l'une des méthodes suivantes:
3. Utiliser une paire de ciseaux fins, commencer à ouvrir depuis le cloaque et faire une incision de 1- 1,5 cm avec une petite entaille à 45°.
4. Utiliser le scalpel pour faire une petite incision sur le côté du poisson légèrement postérieure au pelvis et ventralement par rapport aux plaques latérales.
5. Les testicules sont enlevés au moyen de forceps fins et placés dans une boîte de pétri.
6. Chaque testicule est recouvert de 100 µl de **solution de Hank** (*) fraîchement préparée.
7. Les testicules sont finement coupés en dés au moyen d'un scalpel ou d'une lame de rasoir. Ceci permet la libération de sperme et donne à la solution de Hank un aspect laiteux.
8. Le fluide contenant le sperme est placé dans un tube; il faut veiller à ne pas introduire de tissu testiculaire lors du pipetage.
9. 800 µl de solution de Hank sont ajoutés dans le tube et bien mélangés.
10. Si nécessaire, le mâle peut être préservé par fixation dans de l'éthanol à 100 % ou un autre produit de fixation. Cela est particulièrement important si l'étude vise à assigner une origine parentale à la descendance.

(*) Solution salée tamponnée de Hank (HBSS):

HBSS est nécessaire pour préserver le sperme dans le cadre d'une fertilisation.

Note importante: Bien que la totalité de la solution-mère requise puisse être préparée à l'avance, le **stock N° 5** et consécutivement la **solution finale** sont **fraîchement** préparés le jour même.

Stock N° 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Eau distillée	100 ml

Stock N° 2

Na ₂ HPO ₄ (anhydre)	0,358 g
KH ₂ PO ₄	0,60 g
Eau distillée	100 ml

Stock N° 3

CaCl ₂	0,72 g
Eau distillée	50 ml

Stock N° 4

MgSO₄ · 7H₂O 1,23 g

Eau distillée 50 ml

Stock N° 5 (fraîchement préparé)

NaHCO₃ 0,35 g

Eau distillée 10 ml

Note: Si vous avez déjà certains de ces sels mais avec un contenu aqueux différent (p.e. 2 H₂O au lieu de la forme anhydre), vous pouvez faire usage de ceux-ci mais il faut au préalable ajuster le poids en fonction du poids moléculaire.

Pour la solution finale de Hank, combiner les stocks de la façon suivante:

Stock 1 1,0 ml

Stock 2 0,1 ml

Stock 3 0,1 ml

Eau distillée 8,6 ml

Stock 4 0,1 ml

Stock 5 0,1 ml

Bien mélanger avant utilisation.

Fertilisation

1. Les femelles gravides, grosses, sont identifiées dans la population choisie; les femelles sont prêtes à être pressées seulement quand les œufs sont visiblement protubérants à partir du cloaque. Les femelles prêtes prennent une posture caractéristique avec la tête haute.
2. Passer doucement un doigt le long du poisson vers la queue pour faciliter l'expulsion d'un paquet d'œufs dans une boîte de Pétri propre. Répéter l'opération de l'autre côté et replacer le poisson dans l'aquarium.
3. Les œufs peuvent être étalés en couche à l'aide d'un pinceau fin. Il est important d'essayer d'exposer un grand nombre d'œufs au sperme, et donc il faut maximiser la surface de l'œuf en contact avec le sperme. Note importante: Garder les œufs humides en posant un tissu imbibé sur eux (il est important que les œufs ne soient pas au contact direct de l'eau car ceci pourrait durcir le chorion prématurément et ainsi empêcher la fertilisation). Il y a des variations importantes du nombre d'œufs qu'une femelle peut produire, mais en moyenne, environ 150 œufs peuvent être obtenus à partir d'une seule femelle gravide.
4. 25 µl de sperme dans le mélange de Hank sont répandus de manière uniforme sur la totalité des œufs à l'aide du pinceau. Les œufs vont rapidement durcir et changer de couleur (en l'espace d'une minute) une fois que la fertilisation a commencé. Si le nombre estimé d'œufs est supérieur à 150, répéter la procédure. Aussi, si les œufs ne durcissent pas après une minute, ajouter un peu plus de sperme. Note importante: l'ajout de sperme n'améliore pas forcément le taux de fertilisation.
5. Les œufs et la solution spermatique sont laissés en contact pour "interagir" pendant au moins 15 minutes et les œufs fertilisés peuvent être placés dans l'aquarium ou à lieu l'exposition à la substance chimique d'essai dans les 90 minutes qui suivent la fertilisation.
6. La procédure est répétée avec une autre femelle jusqu'à ce que le nombre d'œufs collectés soit suffisant.
7. Préserver quelques œufs du dernier lot et fixer ces œufs dans de l'acide acétique à 10 %.

Dénombrement et répartition des œufs dans les aquariums d'essai

1. Les œufs sont répartis également entre chaque groupe de traitement pour éviter tout biais génétique. Chaque lot d'œufs fertilisés est séparé en groupes de taille égale (autant que de groupes de traitement) en utilisant un instrument pointu (i.e. un forceps d'entomologie à large lame ou une boucle d'inoculation). Pour 4 réplicats par traitement, contenant chacun 20 œufs, 80 œufs sont répartis par aquarium d'exposition. Note importante: il est conseillé d'ajouter 20 % d'œufs en plus (i.e. 96 œufs par groupe de traitement) jusqu'à ce que l'on soit sûr d'obtenir des pourcentages de fertilisation de 100 %.
 2. Les œufs d'épinoche sont enclins aux infections fongiques en dehors du nid gardé par le père. A cet égard, le traitement de tous les œufs avec du bleu de méthylène pendant les 5 premiers jours de l'essai est extrêmement important. Une solution mère de bleu de méthylène à 1 mg/ml est ajoutée aux aquariums d'exposition pour donner une concentration finale maximum de 2,125 mg/l. Note importante: les épinoches ne sont pas exposées au bleu de méthylène après éclosion et le système est sans méthylène à partir du 6ème jour.
 3. Les œufs sont inspectés chaque jour et tout œuf mort ou non fertilisé est enregistré come tel. Note importante: Les œufs ne sont jamais hors de l'eau jusqu'à l'éclosion, même pendant un temps très court.
-

C.42 BIODÉGRADABILITÉ DANS L'EAU DE MER**INTRODUCTION GÉNÉRALE**

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 306 (1992) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Quand les premières méthodes d'essai ont été mises au point, on ignorait dans quelle mesure on pouvait appliquer à l'environnement marin les résultats des essais de screening pour la biodégradabilité facile utilisant de l'eau douce et des inocula constitués d'effluents secondaires de station d'épuration ou de boue activée. Il existe dans ce domaine des résultats variables [entre autres (1)].
2. De nombreuses eaux de rejet industriel contenant divers produits chimiques atteignent la mer, soit par déversement direct, soit par le chemin d'estuaires et de rivières dans lesquels les temps de séjour sont faibles comparés à la durée nécessaire à la biodégradation complète d'un grand nombre des produits chimiques présents. C'est à cause de la prise de conscience grandissante de la nécessité de protéger le milieu marin contre des charges croissantes de produits chimiques et de la nécessité d'évaluer la concentration probable des produits chimiques dans la mer, que des méthodes d'essai ont été élaborées afin d'évaluer la biodégradabilité dans l'eau de mer.
3. Les méthodes décrites ici utilisent l'eau de mer naturelle à la fois comme phase aqueuse et comme source de microorganismes. Afin de se conformer aux méthodes de biodégradabilité facile en eau douce, on a étudié l'utilisation d'eau de mer ultrafiltrée et centrifugée, ainsi que l'utilisation de sédiments marins comme inocula. Ces recherches n'ont donné aucun résultat. Le milieu d'essai est donc constitué par de l'eau de mer naturelle prétraitée afin d'en éliminer les grosses particules.
4. Afin de déterminer la biodégradabilité ultime par la méthode du flacon agité, on doit utiliser des concentrations relativement élevées de substance d'essai à cause de la faible sensibilité de la méthode d'analyse du carbone organique dissous (COD). Ceci en retour nécessite d'ajouter à l'eau de mer des substances nutritives minérales (N et P), sinon leur faible concentration limiterait la disparition du COD. Il est également nécessaire d'ajouter des substances nutritives dans la méthode de la fiole fermée à cause de la concentration de la substance d'essai ajoutée.
5. Ces méthodes ne sont donc pas des essais de biodégradabilité facile puisqu'on ne rajoute pas d'inoculum en plus des microorganismes déjà présents dans l'eau de mer. Ces essais ne simulent pas non plus l'environnement marin, puisqu'on y ajoute des substances nutritives et que la concentration de la substance d'essai est beaucoup plus élevée que celle qu'on trouve dans la mer. C'est pourquoi on propose de classer ces méthodes dans une nouvelle section qui s'intitule "Biodégradabilité dans l'eau de mer".

APPLICATION

6. Les résultats des essais qui sont effectués parce que les conditions d'utilisation et de rejet de la substance en question indiquent un cheminement vers la mer, donnent une première indication de sa biodégradabilité dans l'eau de mer. Si le résultat est positif (disparition du COD > 70 %; demande théorique en oxygène DThO > 60 %), on peut conclure qu'il existe une potentialité pour que le produit subisse une biodégradation dans l'environnement marin. Cependant, un résultat négatif ne permet pas d'exclure une telle éventualité, mais indique que des études supplémentaires sont nécessaires, par exemple, en utilisant une concentration de substance d'essai aussi faible que possible.
7. Dans les deux cas, si on désire une valeur plus précise du taux ou du degré de biodégradation dans l'eau de mer, à un endroit particulier, on devra appliquer d'autres méthodes plus complexes et plus sophistiquées, et de là plus coûteuses. On pourrait par exemple effectuer un essai de simulation en utilisant une concentration de la substance d'essai plus proche de la concentration probable dans l'environnement. On pourrait également utiliser une eau de mer non fortifiée, non prétraitée, prélevée sur les lieux à étudier, et la dégradation primaire pourrait être suivie par une analyse chimique spécifique. Pour la biodégradabilité ultime, il serait nécessaire d'utiliser des substances marquées au ^{14}C afin de pouvoir mesurer les taux de disparition du ^{14}C organique soluble et de formation de $^{14}\text{CO}_2$ à des concentrations proches de celles qui règnent dans l'environnement.

CHOIX DES MÉTHODES

8. Le choix de la méthode à utiliser dépend d'un certain nombre de facteurs; le tableau suivant aide à faire ce choix. Alors que les substances chimiques dont la solubilité est inférieure à une valeur équivalente à environ 5 mg/l de C ne peuvent pas être testées par la méthode du flacon agité, au moins en principe, ces substances peu solubles peuvent être testées par la méthode de la fiole fermée.

Tableau

Avantages et inconvénients de la méthode du flacon agité et de la méthode de la fiole fermée

MÉTHODE	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
FLACON AGITÉ	— matériel simple sauf pour l'analyseur de C — une durée de 60 jours n'est pas un problème — pas d'interférence avec la nitrification — peut être adaptée pour les substances volatiles	— nécessite un analyseur de C — les utilisations de 5-40 mg/l de COD peuvent être inhibitrices — la détermination du COD est difficile pour de faibles concentrations dans l'eau de mer (effet chlorure) — le COD est parfois élevé dans l'eau de mer
FIOLE FERMÉE	— matériel simple — détermination finale simple — utilise de faibles concentrations de la substance d'essai (2 mg/l), ce qui réduit les chances d'inhibition — facilement adaptée pour les substances volatiles	— il pourrait être difficile de maintenir l'étanchéité à l'air des flacons — la croissance des bactéries sur les parois peut conduire à des valeurs fausses — les valeurs de la consommation d'O₂ dans le témoin peuvent être élevées, en particulier après 28 j.; pourrait être supprimée en faisant vieillir l'eau de mer — interférence possible avec la consommation d'O₂ par la nitrification

MÉTHODE DU FLACON AGITÉ**INTRODUCTION**

1. Cette méthode est une variante pour l'eau de mer de l'essai de screening modifié décrit au chapitre C.4B de la présente annexe (2). Elle a été mise au point à la suite d'un essai circulaire organisé pour la Commission européenne (CE), par l'Institut Danois de la Qualité de l'Eau (3).
2. De la même façon que pour la méthode de la fiole fermée en milieu marin, qui l'accompagne, les résultats de cet essai ne doivent pas être considérés comme des indicateurs de la biodégradabilité facile, mais ils doivent être utilisés de façon spécifique pour obtenir des informations sur la biodégradabilité des substances en milieu marin.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

3. Une quantité prédéterminée de substance d'essai est dissoute dans le milieu d'essai de façon à obtenir une concentration en carbone organique dissous (COD) comprise entre 5 et 40 mg/l. Si on améliore les limites de sensibilité de l'analyse du carbone organique, il peut être avantageux d'utiliser des concentrations plus faibles de substance d'essai, en particulier dans le cas des substances inhibitrices. La solution de la substance à étudier dans le milieu d'essai est incubée sous agitation dans l'obscurité ou en lumière diffuse, dans des conditions aérobies, à une température donnée (contrôlée à ± 2 °C près) normalement comprise entre 15 et 20 °C. Dans les cas où l'objectif de l'étude est de simuler des situations réelles de l'environnement, les essais peuvent être effectués en dehors de cet intervalle normal de température. La durée d'essai maximale recommandée est d'environ 60 jours. La dégradation est suivie par des mesures du COD (dégradation ultime) et, dans certains cas, par des analyses spécifiques (dégradation primaire).

INFORMATION SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

4. Afin de savoir si on peut appliquer cet essai à une substance particulière, on doit connaître certaines de ses propriétés. La teneur en carbone organique de la substance doit être connue, sa volatilité doit être telle qu'il ne se produise pas de pertes importantes au cours de l'essai, enfin, sa solubilité dans l'eau doit être supérieure à une valeur équivalente à une concentration de 25 à 40 mg/l de C. La substance d'essai ne doit pas non plus s'adsorber de façon importante sur les surfaces de verre. Il est nécessaire de disposer d'informations sur la pureté ou les proportions relatives des principaux constituants de la substance étudiée afin de pouvoir interpréter les résultats obtenus, en particulier quand ceux-ci se situent près du niveau "seuil".

5. Des informations sur la toxicité de la substance d'essai vis à vis des bactéries recueillies, par exemple dans des essais à court terme sur le taux de respiration (4), peuvent s'avérer utiles pour choisir les concentrations d'essai appropriées et elles peuvent être essentielles pour interpréter correctement de faibles valeurs de biodégradation. Cependant, de telles informations ne sont pas toujours suffisantes pour interpréter les résultats obtenus dans l'essai de biodégradation, et la méthode décrite dans le paragraphe 18 est plus adaptée.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

6. On doit utiliser des substances de référence adéquates pour contrôler l'activité microbienne de l'échantillon d'eau de mer. Le benzoate de sodium, l'acétate de sodium et l'aniline peuvent par exemple être utilisés. Les substances de référence doivent se dégrader dans un laps de temps relativement court, sinon il est recommandé de recommencer l'essai en utilisant un autre échantillon d'eau de mer.
7. Dans l'essai circulaire de la CE où les échantillons d'eau de mer étaient prélevés à différents endroits et à différentes périodes de l'année (3), la phase de latence (t_l) et le temps nécessaire après la phase de latence pour atteindre 50 % de dégradation (t_{50}), étaient pour le benzoate de sodium respectivement de 1 à 4 jours et de 1 à 7 jours. Pour l'aniline, les valeurs étaient comprises entre 0 et 10 jours pour la t_l et entre 1 et 10 jours pour la t_{50} .

REPRODUCTIBILITÉ ET SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE

8. La reproductibilité de la méthode a été établie dans l'essai circulaire (3). La concentration la plus faible de la substance d'essai pour laquelle cette méthode peut être utilisée est déterminée dans une large mesure, par la limite de détection de l'analyse du carbone organique (à l'heure actuelle, environ 0,5 mg/l de C) et par la concentration du carbone organique dissous dans l'eau de mer utilisée (habituellement de l'ordre de 3 à 5 mg/l pour l'eau du large). La concentration de base en COD ne doit pas dépasser environ 20 % de la concentration totale en COD après addition de la substance d'essai. Si ceci n'est pas possible, la concentration de base en COD peut parfois être réduite en faisant vieillir l'eau de mer avant l'essai. Si la méthode est utilisée seulement avec une analyse chimique spécifique (qui mesure la dégradation primaire) l'investigateur doit rechercher à l'aide d'informations supplémentaires, si la dégradabilité ultime peut être atteinte. Ces informations additionnelles peuvent être apportées par les résultats d'autres essais de biodégradabilité facile ou intrinsèque.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

9. Matériel courant de laboratoire et:
 - a. Dispositif d'agitation pouvant recevoir des erlenmeyers de 0,5 à 2 litres, soit équipé d'un dispositif de contrôle de la température, soit fonctionnant dans une pièce thermostatée entre 15 et 20 °C à ± 2 °C près;
 - b. Des erlenmeyers de 0,5 à 2 litres à col étroit;
 - c. Un appareil de filtration sur membrane ou une centrifugeuse;
 - d. Des membranes filtrantes d'une porosité de 0,2 à 0,45 μm ;
 - e. Un analyseur de carbone;
 - f. Un équipement pour des analyses spécifiques (facultatif).

Eau de mer

10. Prélever un échantillon d'eau de mer dans un récipient soigneusement nettoyé et le transporter au laboratoire, de préférence dans un intervalle de un à deux jours après le prélèvement. Au cours du transport, ne pas laisser la température de l'échantillon dépasser de façon importante la température qui sera utilisée dans l'essai. Identifier précisément l'endroit du prélèvement, décrire son état de pollution et indiquer les substances nutritives qu'on y trouve. En particulier pour les eaux côtières, inclure dans cette caractérisation un comptage des colonies bactériennes hétérotrophes et la détermination des concentrations en nitrate, ammonium et phosphate dissous.

11. Pour l'échantillon d'eau de mer, fournir les informations suivantes:
- date du prélèvement;
 - profondeur du prélèvement;
 - aspect de l'échantillon — trouble, etc.;
 - température au moment du prélèvement;
 - salinité;
 - COD;
 - délai entre le prélèvement et l'utilisation dans l'essai.
12. Si l'on trouve que le taux de COD de l'échantillon d'eau de mer est élevé (paragraphe 8), il est recommandé de faire vieillir cet échantillon pendant environ une semaine avant son utilisation. Le vieillissement se fait en conservant l'échantillon dans des conditions aérobies à la température de l'essai, dans l'obscurité ou en lumière diffuse. Si nécessaire, les conditions aérobies sont maintenues par une légère agitation. Au cours du vieillissement, la teneur en matière organique facilement dégradable diminue. Dans l'essai circulaire (3), on a trouvé aucune différence entre le potentiel de dégradation d'échantillons d'eau de mer vieillis ou fraîchement recueillis. Avant son utilisation, prétraiter l'eau de mer afin d'en éliminer les grosses particules, par exemple par filtration sur un filtre de nylon ou sur du gros papier filtre (pas de membranes filtrantes ou de filtres GF-C), ou par sédimentation et décantation. On doit mentionner le procédé utilisé. Si l'échantillon est vieilli, effectuer le prétraitement après vieillissement.

Solutions mères des substances nutritives minérales

13. Préparer les solutions-mères suivantes en utilisant des réactifs de qualité pour analyse.

a)	Dihydrogénophosphate monopotassique, KH_2PO_4	8,50 g
	Hydrogénophosphate dipotassique, K_2HPO_4	21,75 g
	Hydrogénophosphate disodique dihydraté, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,30 g
	Chlorure d'ammonium, NH_4Cl	0,50 g
	Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.	
b)	Chlorure de calcium anhydre, CaCl_2	27,50 g
	Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.	
c)	Sulfate de magnésium heptahydraté, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,50 g
	Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.	
d)	Chlorure de fer (III) hexahydraté, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
	Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.	

On peut éviter la précipitation de la solution (d) en ajoutant une goutte d'HCl concentré ou 0,4 g d'acide éthylènediamine-tétraacétique (sel disodique de l'EDTA). S'il se forme un précipité dans une solution-mère, la remplacer par une solution fraîchement préparée.

Préparation du milieu d'essai

14. Ajouter 1 ml de chacune des solutions-mères ci-dessus par litre d'eau de mer prétraitée.

Inoculum

15. Ne pas ajouter d'inoculum spécifique, en plus des micro-organismes déjà présents dans l'eau de mer. Déterminer (facultativement) le nombre d'hétérotrophes formant colonies présents dans le milieu d'essai contenant l'eau de mer (et de préférence également dans les échantillons d'eau de mer du départ) par exemple par comptage sur boîte, en utilisant de l'agar marin. Ceci est particulièrement souhaitable pour les échantillons provenant de zones côtières ou polluées. Contrôler l'activité microbienne hétérotrophe dans l'eau de mer en effectuant un essai avec une substance de référence.

Préparation des flacons

16. S'assurer que toute la verrerie est parfaitement nettoyée, mais pas nécessairement stérile, (par exemple en utilisant de l'acide chlorhydrique alcoolique), qu'elle est rincée et séchée avant utilisation afin d'éviter toute contamination par des résidus d'expériences précédentes. Les flacons doivent également être nettoyés avant un premier usage.
17. Travailler simultanément avec les substances d'essai dans des flacons en double et avec la substance de référence dans un seul récipient. Effectuer un essai témoin en double, sans substance d'essai ni composé de référence, afin de déterminer les blancs analytiques. Dissoudre les substances d'essai dans le milieu d'essai — il est commode de les ajouter à partir de solution mère concentrée — de façon à obtenir des concentrations de départ qui se situent normalement entre 5 et 40 mg/l de COD. La substance de référence est normalement testée à une concentration de départ correspondant à 20 mg/l de COD. Si on utilise des solutions mères de substances d'essai et/ou de référence, s'assurer que la salinité du milieu contenant l'eau de mer n'a pas été modifiée de façon importante.
18. Si des effets toxiques sont attendus ou si l'on ne peut pas les exclure, il peut s'avérer judicieux d'inclure en double, dans la conception de l'essai, une expérience sur l'inhibition. Ajouter les substances d'essai et de référence dans le même récipient, la concentration de la substance de référence étant normalement celle utilisée dans l'essai témoin qui contrôle la procédure (c'est-à-dire 20 mg/l de COD) afin de pouvoir faire des comparaisons.
19. Verser des quantités adéquates de solutions d'essai dans les erlenmeyers (une quantité acceptable va jusqu'à environ la moitié du volume des récipients), puis recouvrir chaque récipient non hermétiquement (par exemple avec une feuille d'aluminium) de façon à permettre les échanges gazeux entre le flacon et l'air environnant. (Des tampons de coton ne sont pas indiqués si on utilise l'analyse du COD). Placer les récipients sur le dispositif d'agitation et agiter de façon continue à vitesse faible (par exemple 100 t/min) tout au long de l'essai. Maintenir la température constante (entre 15 et 20 °C à ± 2 °C près), et protéger les récipients de la lumière afin d'éviter la croissance d'algues. S'assurer que l'air est exempt de matières toxiques.

Témoin physicochimique (facultatif)

20. Si on s'attend à une dégradation abiotique ou à des mécanismes de perte, tels qu'une hydrolyse (problème qui se pose uniquement en cas d'analyse spécifique), une volatilisation ou une adsorption, il est judicieux de réaliser une expérience témoin physicochimique. Celle-ci peut être effectuée en ajoutant dans les récipients contenant la substance d'essai du chlorure de mercure (II) (HgCl_2) ⁽¹⁾ (entre 50 et 100 mg/l) afin de stopper l'activité microbienne. Une diminution importante du COD ou de la concentration d'une substance spécifique dans l'essai témoin physicochimique, indiquent la présence de mécanismes de disparition abiotiques. (Si on utilise du chlorure de mercure, on doit faire attention aux interférences ou à un empoisonnement catalytique dans l'analyse du COD).

Nombre de flacons

21. Dans un essai type, on utilise les récipients suivants:

Flacons 1 et 2	— contiennent la substance d'essai (suspension d'essai);
Flacons 3 et 4	— contiennent seulement l'eau de mer (témoin inoculum);
Flacon 5	— contient la substance de référence (contrôle de la procédure);
Flacon 6	— contient les substances d'essai et de référence (témoin de toxicité) — facultatif;
Flacon 7	— contient la substance d'essai et l'agent stérilisant (témoin stérile abiotique) — facultatif.

Analyse du COD

22. Tout au long de l'essai, à des intervalles de temps appropriés, prélever des échantillons pour l'analyse du COD (Appendice 1). Prélever systématiquement des échantillons au début (jour 0) et à la fin (jour 60) de l'essai. Afin de tracer la courbe de la dégradation en fonction du temps, il est nécessaire de disposer au total, d'au moins cinq échantillons. On ne peut pas établir de calendrier précis pour l'échantillonnage étant donné que le taux de biodégradation varie. Effectuer des déterminations du COD en double pour chaque échantillon.

⁽¹⁾ Le chlorure de mercure (II) (HgCl_2) est une substance très toxique qui doit être manipulée avec certaines précautions. Les déchets aqueux contenant ce produit chimique doivent être éliminés de façon appropriée; ils ne doivent pas être jetés à l'égout.

Prélèvement

23. Le volume requis pour les échantillons dépend de la méthode analytique (analyse spécifique), de l'analyseur de carbone utilisé et de la procédure choisie (filtration sur membrane ou centrifugation) pour le traitement de l'échantillon avant la détermination du carbone (paragraphe 25 et 26). Avant de prélever, s'assurer que le milieu d'essai est bien mélangé et que toute matière adhérant à la paroi du récipient est dissoute ou remise en suspension.
24. Immédiatement après le prélèvement, filtrer sur membrane ou centrifuger. Si nécessaire, conserver les échantillons filtrés ou centrifugés entre 2 et 4 °C pendant au maximum 48 heures ou en dessous de -18 °C sur de plus longues périodes (si on sait que cela n'affectera pas la substance, acidifier à pH 2 avant le stockage).
25. Des membranes filtrantes (0,2 à 0,45 µm), telles que les membranes en polycarbonate, qui ne libèrent pas de carbone ou n'adsorbent pas la substance au cours de la filtration conviennent. Certaines membranes filtrantes sont imprégnées de tensio-actifs pour l'hydrophilisation et elles peuvent libérer des quantités considérables de carbone dissous. Préparer de tels filtres en les faisant bouillir dans de l'eau désionisée pendant trois périodes consécutives d'une heure. Après cette opération, conserver les filtres dans de l'eau désionisée. Jeter les premiers 20 ml de filtrat.
26. Au lieu d'une filtration sur membrane, on peut choisir de centrifuger les échantillons. Centrifuger à 40 000 m. s⁻² (~ 4 000 g) pendant 15 minutes, de préférence dans une centrifugeuse réfrigérée.

Remarque: La différenciation par centrifugation entre le COT et le COD pour de très faibles concentrations semble inopérante, soit parce que toutes les bactéries ne sont pas enlevées, soit parce que du carbone faisant partie du plasma bactérien est redissous. Pour des concentrations d'essai plus élevées (>10 mg/l de C), l'erreur due à la centrifugation semble relativement petite.

Fréquence de prélèvement

27. Si les analyses sont effectuées immédiatement après le prélèvement, déterminer le moment du prélèvement suivant au vu des résultats de la détermination analytique.
28. Si les échantillons sont conservés pour des analyses ultérieures (paragraphe 24) on doit en prélever davantage que cinq. En analysant d'abord les derniers échantillons, puis des échantillons convenablement choisis en revenant par étape "à reculons" vers le début, on peut obtenir une description correcte de la courbe de biodégradation avec un nombre de dosages relativement faible. Si à la fin de l'essai il n'y a eu aucune dégradation, il n'est pas nécessaire d'analyser d'autres échantillons, et dans ce cas, la méthode "à reculons" permet d'économiser une partie considérable des coûts d'analyse.
29. Si sur la courbe de dégradation, on observe un plateau avant le 60^{ème} jour, arrêter l'essai. Si la dégradation a démarré de façon certaine au 60^{ème} jour mais n'a pas atteint de plateau, prolonger l'expérience.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

30. Reporter les résultats analytiques sur la feuille de résultats jointe (Appendice 2), et calculer les valeurs de biodégradation pour les substances d'essai et de référence à partir de l'équation:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

avec:

D_t = dégradation en pourcentage de COD ou disparition d'une substance spécifique au temps t,

C_0 = concentration initiale de COD ou d'une substance spécifique dans le milieu d'essai,

C_t = concentration de COD ou d'une substance spécifique dans le milieu d'essai au temps t,

$C_{bl(0)}$ = concentration initiale de COD ou d'une substance spécifique dans le témoin,

$C_{bl(t)}$ = concentration de COD ou d'une substance spécifique dans le témoin au temps t.

31. Exprimer la dégradation comme le pourcentage de disparition du COD (dégradation ultime) ou d'une substance spécifique (dégradation primaire) au temps t . Calculer les concentrations en COD à 0,1 mg/l près et arrondir les moyennes des valeurs de D_t à l'entier le plus proche.
32. Tracer sur un diagramme la courbe de dégradation en fonction du temps comme sur la figure du paragraphe "Validité et interprétation des résultats". S'il existe suffisamment de données, à partir de cette courbe calculer la phase de latence (t_l) et le temps nécessaire pour atteindre 50 % d'élimination après la fin de la phase de latence (t_{50}).

Rapport d'essai

33. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Substance d'essai:

- état physique et s'il y a lieu, propriétés physicochimiques;
- données relatives à l'identification.

Conditions d'essai:

- lieu du prélèvement et description du site; état de la pollution et nature des substances nutritives (comptage des colonies, nitrate, ammonium, phosphate, s'il y a lieu);
- caractéristiques de l'échantillon (date et profondeur de prélèvement, aspect, température, salinité, COD (facultatif), délai entre le prélèvement et l'utilisation dans l'essai;
- méthode utilisée, s'il y a lieu, pour faire vieillir l'eau de mer;
- méthode utilisée pour le prétraitement (filtration/sédimentation) de l'eau de mer;
- méthode utilisée pour la détermination du COD;
- méthode utilisée pour l'analyse spécifique (facultatif);
- méthode utilisée pour déterminer le nombre de bactéries hétérotrophes dans l'eau de mer (méthode de comptage sur boîte ou autre méthode) (facultatif);
- autres méthodes (facultatif) utilisées pour caractériser l'eau de mer (mesures d'ATP, etc.);

Résultats:

- données analytiques reportées sur une feuille de résultats (Appendice 2);
- on trace la courbe de dégradation en fonction du temps sur un diagramme qui indique la phase de latence (t_l), la pente, et le temps nécessaire (à partir de la fin de la période de latence) pour atteindre 50 % d'élimination (t_{50}). La phase de latence peut être évaluée graphiquement comme sur la figure du paragraphe "Critères de validité et interprétation des résultats" ou plus commodément elle peut être déterminée comme le temps nécessaire pour atteindre 10 % de dégradation;
- le pourcentage de dégradation mesuré après 60 jours ou à la fin de l'essai.

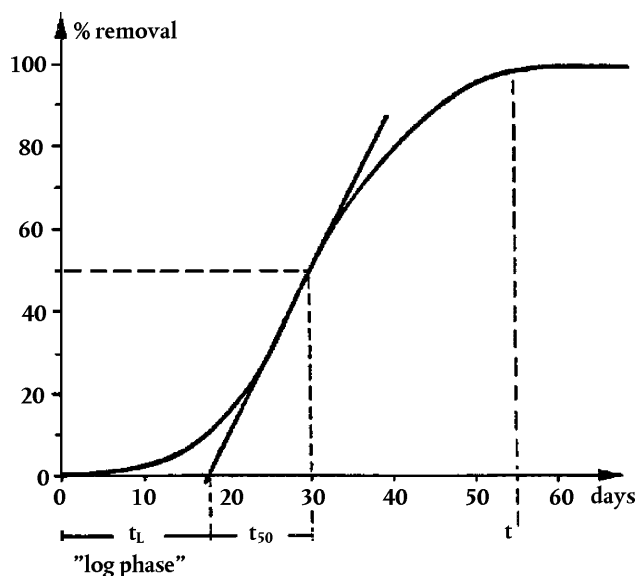
Discussion des résultats.

Critères de validité et interprétation des résultats

34. Les résultats obtenus avec les substances de référence par exemple le benzoate de sodium, l'acétate de sodium ou l'aniline, doivent être comparables à ceux de l'essai circulaire (3) (se reporter au paragraphe 7 sur les "Substances de référence"). Si les résultats obtenus avec les substances de référence sont atypiques, l'essai doit être recommencé avec un autre échantillon d'eau de mer. Bien qu'on ne puisse pas toujours interpréter sans ambiguïté les résultats des essais d'inhibition à cause du COD apporté par la substance d'essai, une réduction importante dans le taux de disparition du COD total par rapport à celui du témoin, contrôlant la procédure, constitue une indication de la présence d'effets toxiques.

35. Du fait de l'utilisation de concentrations d'essai relativement élevées par rapport à celles de la plupart des systèmes naturels (et par conséquent d'un rapport défavorable entre les concentrations des substances d'essai et des autres sources de carbone), on doit considérer cette méthode comme un essai préliminaire qui peut être utilisé pour savoir si une substance est facilement biodégradable ou non. C'est pourquoi un résultat faible ne signifie pas nécessairement que la substance d'essai n'est pas biodégradable en milieu marin, mais il indique que davantage de travaux seront nécessaires pour conclure.

Un exemple d'une expérience de dégradation théorique illustrant une façon d'obtenir les valeurs de t_L (durée de la "phase de latence") et de t_{50} (intervalle de temps, démarrant après t_L , nécessaire pour atteindre 50 % de disparition), est donné ci-après



MÉTHODE DU FLACON FERMÉ

INTRODUCTION

1. Cette méthode est une variante pour l'eau de mer de l'essai en fiole fermée (5) et elle a été mise au point à la suite d'un essai circulaire organisé pour la Commission européenne (CE) par l'Institut Danois de la Qualité de l'Eau (3).
2. De la même façon que pour la méthode du flacon agité en milieu marin, qui l'accompagne, les résultats de cet essai ne doivent pas être considérés comme des indicateurs de la biodégradabilité facile, mais ils doivent être utilisés de façon spécifique pour obtenir des informations sur la biodégradabilité des substances chimiques en milieu marin.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

3. Une quantité prédéterminée de substance d'essai est dissoute dans le milieu d'essai de façon à obtenir une concentration comprise habituellement entre 2 et 10 mg/l de substance (on peut utiliser une ou plusieurs concentrations). La solution est conservée dans un flacon rempli fermé, dans l'obscurité, au bain-marie ou dans une enceinte thermostatée entre 15 et 20 °C à ± 1 °C près. Dans les cas, où l'objectif de l'étude est de simuler des situations réelles de l'environnement, les essais peuvent être effectués en dehors de cet intervalle normal de température, pourvu qu'on dispose de moyens appropriés pour contrôler la température. La dégradation est suivie en analysant l'oxygène sur une période de 28 jours.
4. L'essai circulaire a montré que si on prolonge l'essai au-delà de 28 jours, on obtient, dans la plupart des cas, aucune information utile, à cause de graves interférences. Les valeurs du témoin pour la demande biologique en oxygène (DBO) se sont révélées extrêmement élevées, probablement à cause d'une croissance sur les parois due à un manque d'agitation et à cause de la nitrification. La durée d'essai recommandée est donc de 28 jours, mais si la valeur du témoin pour la DBO reste en dessous d'une limite de 30 % (paragraphe 15 et 40) l'essai peut être prolongé.

INFORMATION SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

5. Afin de savoir si on peut appliquer cet essai à une substance particulière, on doit connaître certaines de ses propriétés. Afin de calculer la demande théorique en oxygène (DThO), on doit connaître la formule générale (voir Appendice 3); sinon on doit déterminer la demande chimique en oxygène (DCO) de la substance afin de l'utiliser comme valeur de référence. L'utilisation de la DCO est moins satisfaisante car certaines substances ne sont pas totalement oxydées lors de cet essai.
6. La solubilité de la substance doit être supérieure ou égale à 2 mg/l, bien qu'en principe, on puisse tester des substances moins solubles (par exemple en utilisant les ultra-sons) ainsi que des substances volatiles. Il est nécessaire de disposer d'informations sur la pureté ou les proportions relatives des principaux constituants de la substance d'essai afin de pouvoir interpréter les résultats obtenus, en particulier quand ceux-ci se situent près du niveau "seuil".
7. Des informations sur la toxicité de la substance d'essai vis à vis des bactéries [recueillies, par exemple dans des essais à court terme sur le taux de respiration (4)], peuvent s'avérer utiles pour choisir les concentrations d'essai appropriées et elles peuvent être essentielles pour interpréter correctement de faibles valeurs de biodégradation. Cependant, de telles informations ne sont pas toujours suffisantes pour interpréter les résultats obtenus dans l'essai de biodégradation, et la méthode décrite dans le paragraphe 27 est plus adaptée.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

8. On doit utiliser des substances de référence adéquates pour contrôler l'activité microbienne de l'échantillon d'eau de mer. L'aniline, l'acétate de sodium ou le benzoate de sodium peuvent (par exemple) être utilisés. On doit observer pour ces composés une dégradation d'au moins 60 % (de leur DThO) dans un laps de temps relativement court, sinon il est recommandé de recommencer l'essai en utilisant un autre échantillon d'eau de mer.
9. Dans l'essai circulaire de la CE où les échantillons d'eau de mer étaient prélevés à différents endroits et à différentes périodes de l'année, la phase de latence (t_l) et le temps nécessaire, après la phase de latence, pour atteindre 50 % de dégradation (t_{50}), étaient pour le benzoate de sodium respectivement de 0 à 2 jours et de 1 à 4 jours. Pour l'aniline, les valeurs étaient comprises entre de 0 et 7 jours pour la t_l et entre 2 et 12 jours pour la t_{50} .

REPRODUCTIBILITÉ

10. La reproductibilité de ces méthodes a été établie dans l'essai circulaire de la CE (3).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

11. Matériel courant de laboratoire et:
 - a) On peut utiliser des flacons pour l'analyse de la DBO d'une contenance de 250 à 300 ml, ou des fioles de 250 ml à col étroit, fermés dans les deux cas par des bouchons de verre;
 - b) Plusieurs récipients de 2, 3 et 4 litres gradués en litres, pour la préparation de l'expérience et pour le remplissage des flacons à DBO;
 - c) Un bain-marie ou une pièce thermostatée pour maintenir les récipients à température constante ($\pm 1^\circ\text{C}$) et à l'abri de la lumière;
 - d) Un équipement pour l'analyse de l'oxygène dissous;
 - e) Des membranes filtrantes d'une porosité de 0,2 à 0,45 μm (facultatif);
 - f) Un équipement pour des analyses spécifiques (facultatif).

Eau de mer

12. Prélever un échantillon d'eau de mer dans un récipient soigneusement nettoyé et le transporter au laboratoire, de préférence dans un intervalle de un à deux jours après le prélèvement. Au cours du transport, ne pas laisser la température de l'échantillon dépasser de façon importante la température qui sera utilisée dans l'essai.
13. Identifier précisément l'endroit du prélèvement, décrire son état de pollution et indiquer les substances nutritives qu'on y trouve. En particulier pour les eaux côtières ou les eaux polluées, inclure dans cette caractérisation un comptage des colonies bactériennes hétérotrophes et la détermination des concentrations en nitrate, ammonium et phosphate dissous.
14. Pour l'échantillon d'eau de mer, fournir les informations suivantes:
 - date du prélèvement;
 - profondeur du prélèvement;
 - aspect de l'échantillon — trouble, etc.;
 - température au moment du prélèvement;
 - salinité;
 - carbone organique dissous (COD);
 - délai entre le prélèvement et l'utilisation dans l'essai.
15. Si l'on trouve que la teneur en COD de l'échantillon est élevée, ou si l'on pense qu'au bout de 28 jours la DBO du témoin représentera plus de 30 % de celle des substances de référence, il est recommandé de faire vieillir l'échantillon pendant environ une semaine avant son utilisation.
16. Le vieillissement se fait en conservant l'échantillon dans des conditions aérobies à la température de l'essai, dans l'obscurité ou en lumière diffuse. Si nécessaire, les conditions aérobies sont maintenues par une légère agitation. Au cours du vieillissement, la teneur en matière organique facilement dégradable diminue. Dans l'essai circulaire (3), on a trouvé aucune différence entre le potentiel de dégradation d'échantillons d'eau de mer vieillis ou fraîchement recueillis.
17. Avant son utilisation, prétraiter l'eau de mer afin d'en éliminer les grosses particules, par exemple par filtration sur un filtre de nylon ou sur du gros papier filtre (pas de membranes filtrantes ou de filtres GF-C), par sédimentation et décantation. On doit mentionner le procédé utilisé. Si l'échantillon est vieilli, effectuer le prétraitement après vieillissement.

Solutions mères des substances nutritives minérales

18. Préparer les solutions-mères suivantes en utilisant des réactifs de qualité pour analyse:

a)	Dihydrogénophosphate monopotassique, KH_2PO_4	8,50 g
	Hydrogénophosphate dipotassique, K_2HPO_4	21,75 g
	Hydrogénophosphate disodique dihydraté, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,30 g
	Chlorure d'ammonium, NH_4Cl	0,50 g
	Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.	
b)	Chlorure de calcium anhydre, CaCl_2	27,50 g
	Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.	

- c) Sulfate de magnésium heptahydraté, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,50 g
Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.
- d) Chlorure de fer (III) hexahydraté, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g
Dissoudre et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.

On peut éviter la précipitation de la solution (d) en ajoutant une goutte d'HCl concentré ou 0,4 g d'acide éthylènediamine-tétraacétique (sel disodique de l'EDTA). S'il se forme un précipité dans une solution-mère, la remplacer par une solution fraîchement préparée.

Préparation du milieu d'essai

19. Ajouter 1 ml de chacune des solutions mères ci-dessus par litre d'eau de mer prétraitée. Saturer le milieu avec de l'air à la température de l'essai, en y faisant barboter de l'air comprimé propre pendant environ 20 minutes. Déterminer la concentration en oxygène dissous à des fins de contrôle. On peut lire sur l'abaque inclus dans cette méthode d'essai (Appendice 4) la concentration de saturation en oxygène dissous en fonction de la salinité et de la température.

Inoculum

20. Ne pas ajouter d'inoculum spécifique, en plus des micro-organismes déjà présents dans l'eau de mer. Déterminer (facultativement) le nombre d'hétérotrophes formant colonies présents dans le milieu d'essai contenant l'eau de mer (et de préférence également dans les échantillons d'eau de mer du départ) par exemple par comptage sur boîte, en utilisant de l'agar marin. Ceci est particulièrement souhaitable pour les échantillons provenant de zones côtières ou polluées. Contrôler l'activité microbienne hétérotrophe dans l'eau de mer en effectuant un essai avec une substance de référence.

Préparation des flacons

21. Toutes les manipulations nécessaires y compris le vieillissement et le prétraitement de l'eau de mer sont réalisées à la température d'essai choisie, comprise entre 15 et 20 °C; toute la verrerie doit être propre mais non stérile.
22. Pour la détermination de la DBO des substances d'essai et de référence préparer des groupes de flacons à DBO dans des séries expérimentales simultanées. Réaliser toutes les analyses dans des récipients en double (témoins, substances de référence et d'essai), c'est-à-dire préparer deux récipients pour chaque détermination. Effectuer au moins quatre analyses aux jours 0, 5, 15 et 28. Pour les analyses d'oxygène, quatre déterminations exigent un total de $3 \times 2 \times 4 = 24$ flacons (témoin, substance d'essai et de référence) et ainsi environ 8 litres de milieu d'essai (pour une seule concentration de la substance d'essai).
23. Préparer les solutions séparées des substances d'essai et de référence dans de grands récipients d'un volume suffisant (paragraphe 11) en ajoutant d'abord les substances d'essai et de référence soit directement, soit à partir d'une solution mère concentrée, dans les récipients partiellement remplis. Ajouter du milieu d'essai supplémentaire jusqu'à obtenir les concentrations finales désirées. Si on utilise des solutions mères de substances d'essai et/ou de référence, s'assurer que la salinité du milieu contenant l'eau de mer n'a pas été modifiée de façon importante.
24. Choisir les concentrations des substances d'essai et de référence en tenant compte de:
- a) la solubilité de l'oxygène dissous dans l'eau de mer pour la température et la salinité choisies pour l'essai (voir l'abaque ci-jointe de l'Appendice 4);
 - b) la valeur de la DBO de l'eau de mer dans le témoin; et
 - c) la valeur attendue pour la biodégradabilité de la substance d'essai.
25. Pour une salinité de 32 pour mille (eau de l'océan), la solubilité de l'oxygène dissous est d'environ 8,1 mg/l à 15 °C et 7,4 mg/l à 20 °C. La consommation en oxygène de l'eau de mer elle-même. (respiration témoin) peut aller jusqu'à 2 mg O_2 /l ou plus, si l'eau de mer n'a pas été vieillie. C'est pourquoi, pour être sûr qu'après l'oxydation de la substance d'essai, il reste une concentration significative en oxygène, on utilise au départ une concentration d'environ 2 à 3 mg/l (selon la DThO) pour les substances qui sont susceptibles d'être complètement dégradées dans les conditions de l'essai (comme les substances de référence). Les substances moins dégradables sont testées à des concentrations supérieures, jusqu'à environ 10 mg/l, dans la mesure où cela n'entraîne pas d'effets toxiques. Il peut s'avérer intéressant d'effectuer en parallèle des essais avec une concentration faible (environ 2 mg/l) et une concentration élevée (environ 10 mg/l) de la substance d'essai.

26. On doit déterminer en parallèle les valeurs témoins pour l'oxygène, dans des récipients qui ne contiennent ni substance d'essai ni substance de référence.
27. Si l'on veut évaluer des effets inhibiteurs, préparer dans différents grands récipients, les séries de solutions suivantes (paragraphe 13):
- a) 2 mg/l d'une substance facilement dégradable, par exemple une des substances de référence proposées;
 - b) x mg/l de substance d'essai (x est habituellement égal à 2);
 - c) 2 mg/l de la substance facilement dégradable plus x mg/l de substance d'essai.

Témoin physicochimique (facultatif)

28. Si on choisit de faire des analyses spécifiques, on peut effectuer une expérience physico-chimique afin de vérifier si la substance d'essai est éliminée par des mécanismes abiotiques tels qu'une hydrolyse ou une adsorption. Un témoin physico-chimique peut être réalisé en ajoutant du chlorure de mercure (II) (HgCl_2) ⁽¹⁾ (à raison de 50 à 100 mg/l) dans des récipients en double contenant la substance d'essai, afin de stopper l'activité microbienne. Une diminution importante de la concentration d'une substance spécifique au cours de l'essai indique l'existence de mécanismes d'élimination abiotiques.

Nombre de flacons à DBO dans un essai type

29. Dans un essai type on utilise les flacons suivants:
- au moins 8 flacons contenant la substance d'essai;
 - au moins 8 flacons contenant uniquement l'eau de mer fortifiée par des substances nutritives;
 - au moins 8 flacons contenant la substance de référence, et si nécessaire
 - 6 flacons contenant les substances d'essai et de référence (témoin de toxicité).

EXÉCUTION DE LA MÉTHODE

30. Après préparation, siphonner immédiatement chaque solution à partir du quart inférieur (pas à partir du fond) du grand récipient approprié afin de remplir les séries respectives de flacons à DBO. Mesurer immédiatement l'oxygène dissous à l'instant zéro (paragraphe 33) ou conserver par précipitation avec MnCl_2 [chlorure de manganèse (II)] et NaOH (hydroxyde de sodium) les témoins du temps zéro en vue d'une analyse chimique ultérieure.
31. Les flacons à DBO restants menés en parallèle sont incubés à la température de l'essai (15 à 20 °C), dans l'obscurité et retirés de la zone d'incubation à intervalles réguliers (par exemple au minimum après 5, 15 et 28 jours) et on mesure leur concentration en oxygène dissous (paragraphe 33).
32. Les échantillons destinés à des analyses spécifiques (facultatives) sont filtrés sur membrane (0,2 à 0,45 μm) ou centrifugés pendant 15 minutes. Si on ne les analyse pas immédiatement, les conserver entre 2 et 4 °C pendant au maximum 48 heures ou à – 18 °C sur de plus longues périodes (si l'on sait que cela n'affectera pas la substance d'essai, acidifier à pH 2 avant stockage).

Détermination de l'oxygène dissous

33. Déterminer la concentration en oxygène dissous en utilisant une méthode chimique ou électrochimique reconnue au niveau national ou international.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

34. Reporter les résultats analytiques sur les feuilles de résultats jointes (Appendice 5).

⁽¹⁾ Le chlorure de mercure (II) (HgCl_2) est une substance très toxique qui doit être manipulée avec certaines précautions. Les déchets aqueux contenant ce produit chimique doivent être éliminés de façon appropriée; ils ne doivent pas être directement jetés à l'égout.

35. Calculer la DBO en faisant la différence entre la perte en oxygène d'une solution témoin et d'une solution contenant la substance d'essai dans les conditions de l'essai. Diviser cette perte nette en oxygène par la concentration de la substance (en poids/volume) afin d'exprimer la DBO en mg de DBO/mg de substance. La dégradation est calculée en divisant la demande biochimique en oxygène soit, de préférence, par la demande théorique en oxygène (DThO) soit par la demande chimique en oxygène (DCO) et elle est exprimée sous forme de pourcentage (voir le paragraphe 36).
36. Pour chaque temps de prélèvement, calculer les valeurs de la biodégradation à la fois pour les substances d'essai et de référence en utilisant l'une ou l'autre des équations suivantes:

$$\% \text{ biodégradation} = \frac{\text{mg O}_2 / \text{mg substance testée}}{\text{mg DThO} / \text{mg substance testée}} \times 100$$

$$\% \text{ biodégradation} = \frac{\text{mg O}_2 / \text{mg substance testée}}{\text{mg DCO} / \text{mg substance testée}} \times 100$$

avec:

DThO = demande théorique en oxygène (calculs en Appendice 3)

DCO = demande chimique en oxygène, déterminée expérimentalement.

Remarque: Il arrive que les deux modes de calcul (pourcentage de la DThO ou pourcentage de la DCO) ne donnent pas les mêmes résultats; il est préférable d'utiliser la DThO, car dans l'essai de la DCO certaines substances ne sont pas complètement oxydées.

37. Tracer sur un diagramme la courbe de dégradation en fonction du temps (voir l'exemple du paragraphe "Validité et interprétation des résultats"). S'il existe suffisamment de données, à partir de cette courbe calculer la phase de latence (t_l) et le temps nécessaire pour atteindre 50 % d'élimination après la fin de la phase de latence (t_{50})
38. Si on réalise une analyse spécifique (facultatif), le pourcentage de dégradation primaire correspond au pourcentage de disparition de la substance spécifique au cours de la période d'essai (corrigé de la valeur obtenue dans les témoins).

Rapport d'essai

39. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Substance d'essai:

- état physique et s'il y a lieu, propriétés physicochimiques;
- données relatives à l'identification.

Conditions d'essai:

- lieu du prélèvement et description du site: état de la pollution et nature des substances nutritives (comptage des colonies, nitrate, ammonium, phosphate, s'il y a lieu);
- caractéristiques de l'échantillon [date et profondeur de prélèvement, aspect, température, salinité, COD (facultatif), délai entre le prélèvement et l'utilisation dans l'essai];
- méthode utilisée, s'il y a lieu, pour faire vieillir l'eau de mer;
- méthode utilisée pour le prétraitement (filtration/sédimentation) de l'eau de mer;
- méthode utilisée pour la détermination de la DCO (si elle est effectuée);
- méthode utilisée pour mesurer l'oxygène;
- procédé de dispersion des substances peu solubles dans les conditions de l'essai;
- méthode utilisée pour déterminer le nombre de bactéries hétérotrophes dans l'eau de mer (méthode de comptage sur boîte ou autre méthode);

- méthode utilisée pour déterminer le COD dans l'eau de mer (facultatif);
- méthode utilisée pour l'analyse spécifique (facultatif);
- autres méthodes facultatives utilisées pour caractériser l'eau de mer (mesures d'ATP, etc.);

Résultats

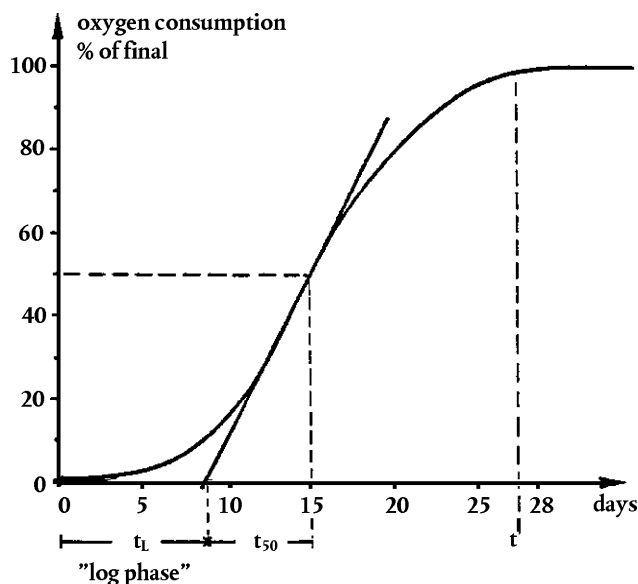
- données analytiques reportées sur une feuille de résultats (comme celle jointe en Appendice 5);
- la courbe de dégradation en fonction du temps représentée sur un diagramme qui indique la phase de latence (t_L), la pente, et le temps nécessaire (à partir de la fin de la période de latence) pour atteindre 50 % de la consommation finale en oxygène due à l'oxydation de la substance d'essai (t_{50}). La phase de latence peut être évaluée graphiquement comme sur la figure jointe, ou plus commodément déterminée comme le temps nécessaire pour atteindre 10 % de dégradation;
- le pourcentage de dégradation mesuré après 28 jours.

Discussion des résultats.

Critères de validité et interprétation des résultats

40. La respiration du témoin ne doit pas dépasser 30 % de l'oxygène consommé dans le récipient d'essai. S'il n'est pas possible de se conformer à ce critère en utilisant de l'eau de mer fraîchement prélevée, celle-ci doit être vieillie (stabilisée) avant utilisation
41. On doit tenir compte du fait que les substances azotées peuvent modifier les résultats.
42. Les résultats obtenus avec les substances de référence, par exemple le benzoate de sodium et l'aniline, doivent être comparables à ceux de l'essai circulaire (3) (paragraphe 9). Si les résultats obtenus avec les substances de référence sont atypiques, l'essai doit être recommencé avec un autre échantillon d'eau de mer.
43. On peut considérer que la substance d'essai inhibe les bactéries (à la concentration utilisée) si la DBO du mélange des substances d'essai et de référence est inférieure à la somme des DBO des solutions séparées des deux substances.
44. Du fait de l'utilisation de concentrations d'essai relativement élevées par rapport à celles de la plupart des systèmes naturels et par conséquent d'un rapport défavorable entre les concentrations de la substance d'essai et des autres sources de carbone, on doit considérer cette méthode comme un essai préliminaire qui peut être utilisé pour savoir si une substance est facilement biodégradable ou non. C'est pourquoi un résultat faible ne signifie pas nécessairement que la substance d'essai n'est pas biodégradable en milieu marin, mais il indique que davantage de travaux seront nécessaires pour conclure.

Un exemple d'une expérience de dégradation théorique illustrant une façon d'évaluer les valeurs de t_L (durée de la "phase de latence") et de t_{50} , intervalle de temps (démarrant après t_L), nécessaire pour atteindre 50 % de la consommation finale en oxygène due à l'oxydation de la substance d'essai, est donné ci-après.



BIBLIOGRAPHIE

- (1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of organic fraction of chemical wastes. *Chemosphere* 10 (6); 561-573.
 - (2) Chapitre C.4-B de la présente annexe: Détermination de la biodégradabilité "facile", Partie III: Essai de screening modifié de l'OCDE.
 - (3) N. Nyholm & P. Kristensen. Screening test methods for assessment of biodegradability of chemical substances in seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, mars 1987, Commission des Communautés européennes (1985).
 - (4) Chapitre C.11 de la présente annexe: Biodégradation — Boues activées: essai d'inhibition de la respiration.
 - (5) Chapitre C.4-E de la présente annexe: Détermination de la biodégradabilité "facile", Partie VI — Essai en fioles fermées.
-

Appendice 1

Détermination du carbone organique dans l'eau de mer**MÉTHODE DU FLACON AGITÉ**

Pour déterminer le carbone organique d'un échantillon aqueux on oxyde les composés organiques de cet échantillon en dioxyde de carbone en utilisant généralement l'une des trois techniques suivantes:

- oxydation-voie humide par persulfate/irradiation-UV;
- oxydation-voie humide par persulfate/température élevée (116-130 °C);
- combustion.

La quantité de CO₂ dégagée est mesurée par spectrométrie infrarouge ou par titrimétrie, ou bien le CO₂ est réduit en méthane qui est dosé par un détecteur à ionisation de flamme (DIF).

La méthode persulfate/UV est communément utilisée pour analyser de l'eau "propre" avec une faible teneur en matière particulaire. Les deux autres méthodes peuvent être appliquées à la plupart des types d'échantillons d'eau, l'oxydation par le persulfate à température élevée se révélant plus adaptée pour les échantillons de faible teneur en carbone organique, tandis que la technique de la combustion s'applique aux échantillons dont la teneur en carbone organique non volatil (CONV) se situe bien au dessus de 1 mg/l de C.

Interférences

Ces trois méthodes dépendent de l'élimination ou de la compensation du carbone inorganique (CI) présent dans l'échantillon. Afin d'éliminer le CI, la méthode la plus fréquemment utilisée consiste à purger l'échantillon acidifié de son CO₂, bien que cette manipulation entraîne également une perte des composés organiques volatils (1). L'élimination complète ou la compensation du CI doit être effectuée pour chaque type d'échantillon, et, selon les échantillons, le carbone organique volatil doit être déterminé, en plus du CONV.

Des concentrations élevées en chlorure entraînent une diminution de l'efficacité de l'oxydation quand on emploie la méthode persulfate/UV (2). Cette interférence peut cependant être éliminée en utilisant un oxydant modifié par l'addition de nitrate de mercure (II). Lors de l'étude d'échantillons contenant des chlorures, il est recommandé d'utiliser un volume d'échantillon le plus grand possible. Avec la méthode par combustion, des concentrations élevées en sel dans les échantillons analysés peuvent entraîner un dépôt de sel sur le catalyseur et une corrosion excessive du tube de combustion. On doit prendre les précautions indiquées dans le manuel du fabricant.

Quand on utilise la méthode persulfate/UV, il peut arriver que les échantillons très troubles ainsi que ceux qui contiennent des particules soient incomplètement oxydés.

Exemple d'une méthode appropriée

Le carbone organique non volatil est déterminé par oxydation au moyen de persulfate/irradiation UV et le CO₂ qui se dégage alors est dosé par spectrométrie infrarouge non dispersive.

Le réactif pour l'oxydation est modifié selon les suggestions données dans (2) et comme décrit dans le manuel du fabricant:

- a) 8,2 g de HgCl₂ et 9,6 g de Hg(NO₃)₂ · H₂O sont dissous dans quelques centaines de millilitres d'eau de dilution contenant une faible concentration en carbone;
- b) 20 g de K₂S₂O₈ sont dissous dans la solution de sel mercurique;
- c) 5 ml de HNO₃ (concentré) sont ajoutés au mélange;
- d) le réactif est dilué jusqu'à un volume final de 1 000 ml.

On supprime l'interférence due au chlorure en utilisant un volume d'échantillon de 40 µl pour 10 % de chlorure et un volume d'échantillon de 200 µl pour 1,9 % de chlorure. Avec cette méthode on peut analyser des échantillons de forte teneur en chlorure et/ou des volumes d'échantillon plus importants dans la mesure où on empêche le chlorure de se former dans le récipient d'oxydation. On peut ensuite, si nécessaire, déterminer le carbone organique volatil dans le type d'échantillon étudié.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ISO, Qualité de l'eau — détermination du carbone organique total. Projet de norme internationale ISO/DIS 8245, 16 janvier 1986.
- (2) American Public Health Association, Standard methods for the estimation of water and wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16ème édition (1985).

Également intéressant (donne une description d'un système d'autoanalyse):

- (3) W. Schreurs (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.
-

Appendice 2

Biodégradation dans l'eau de mer

MÉTHODE DU FLACON AGITÉ

FEUILLE DE RÉSULTATS

1. **LABORATOIRE:**
2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI:**
3. **SUBSTANCE D'ESSAI:**

Nom:

Concentration de la solution mère: mg/l de substance

Concentration initiale dans le milieu, t_0 : mg/l de substance

: mg COD/l

4. **EAU DE MER:**

Origine:

Date du prélèvement:

Profondeur du prélèvement:

Aspect au moment du prélèvement (par exemple trouble, etc.):

Salinité au moment du prélèvement: ‰

Température au moment du prélèvement: °C

COD "x" heures après le prélèvement: mg /l

Prétraitement avant l'essai (par exemple filtration, sédimentation, vieillissement, etc.):

Comptage des colonies microbiennes: — échantillon de départ: colonies/ml

— au début de l'essai: colonies/ml

Autres caractéristiques:

5. DOSAGES DU CARBONE:

Analyseur de carbone:

	Flacon n°		COD après n jours (mg/ml)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Essai: eau de mer fortifiée par des substances nutritives contenant la substance d'essai	1	a ₁					
		a ₂					
		moyenne, C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		moyenne, C _{b(t)}					
Témoin: eau de mer fortifiée par des substances nutritives ne contenant pas la substance d'essai	1	c ₁					
		c ₂					
		moyenne, C _{c(t)}					
	2	d ₁					
		d ₂					
		moyenne, C _{d(t)}					
	Moyenne, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. ÉVALUATION DES DONNÉES BRUTES:

Flacon n°	Calcul des résultats	% de dégradation après n jours				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Moyenn- e (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) On ne doit pas faire la moyenne de D₁ et D₂ s'il existe une grande différence entre ces deux valeurs.

Remarque: des tableaux similaires peuvent être utilisés quand on suit la dégradation par une analyse spécifique et également pour la substance de référence et les témoins de toxicité.

7. **DÉGRADATION ABIOTIQUE (facultatif)**

	Temps (en jours)	
	0	t
Concentration en COD (en mg/l) dans le témoin stérile	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ dégradation abiotique} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

Appendice 3

Calcul de la demande théorique biochimique en oxygène

MÉTHODE DU FLACON FERMÉ

La DThO de la substance $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ de poids moléculaire PM est calculée d'après la formule:

$$DThO_{NH_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

Ce calcul implique que C est minéralisé en CO_2 et que H est transformé en H_2O , P en P_2O_5 et Na en Na_2O . Les halogènes sont éliminés sous forme d'halogénures d'hydrogène et l'azote sous forme d'ammoniac.

Exemple:

le glucose $C_6H_{12}O_6$, de PM = 180

$$DThO = \frac{16 \left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg } O_2/\text{mg glucose}$$

Les poids moléculaires des sels autres que ceux des métaux alcalins sont calculés en supposant qu'ils ont été hydrolysés.

On considère que le soufre est oxydé à l'état + 6.

Exemple:

le n-dodécylbenzènesulfonate de sodium $C_{18}H_{29}SO_3Na$, de PM = 348

$$DThO = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg } O_2/\text{mg substance}$$

Dans le cas des substances azotées, l'azote peut être éliminé sous forme d'ammoniac, de nitrite ou de nitrate correspondant à différentes demandes théoriques en oxygène.

$$DThO_{NO_2} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{PM}$$

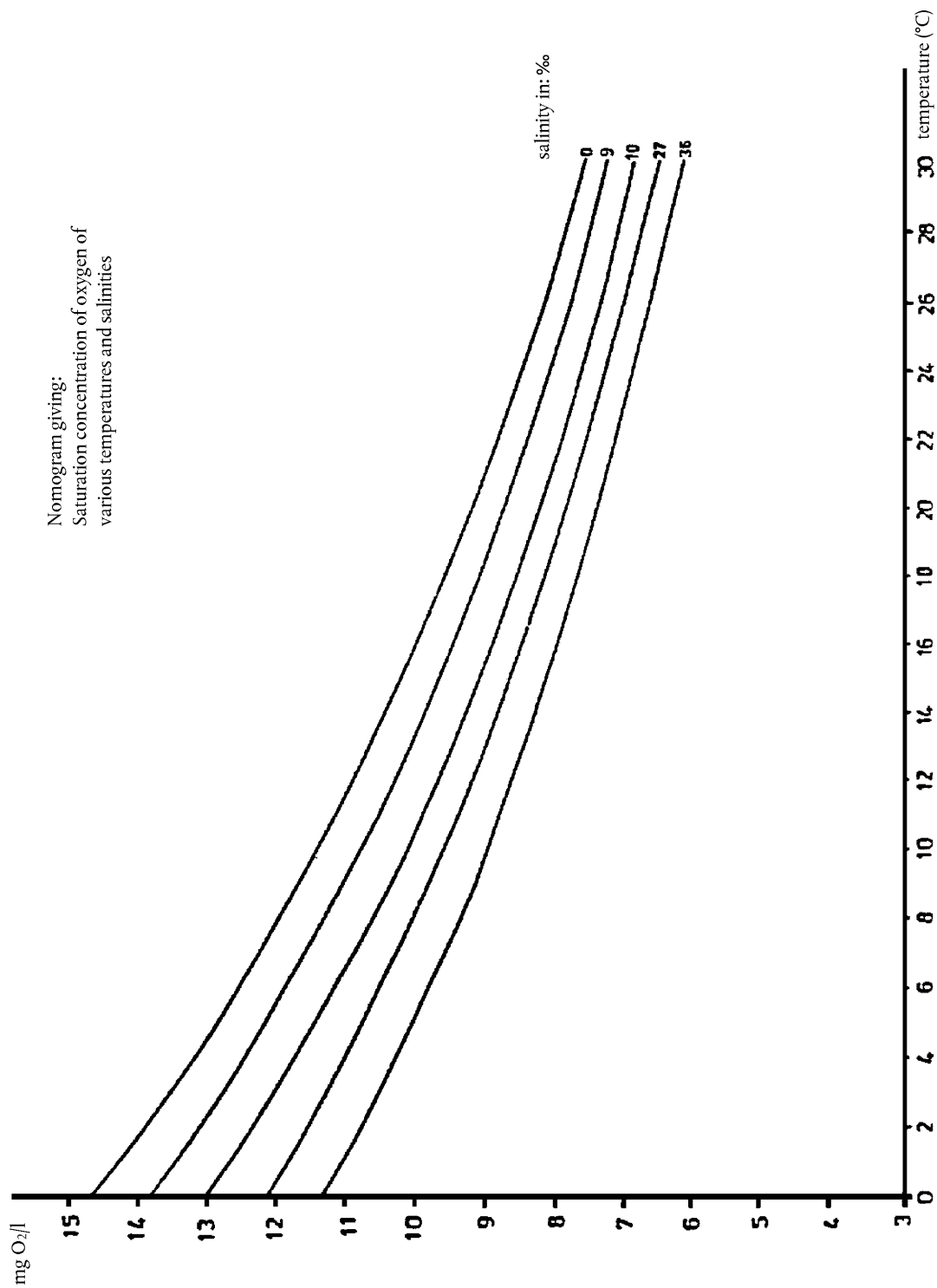
$$DThO_{NO_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{PM}$$

Par exemple, si dans le cas d'une amine secondaire, l'analyse a montré que l'azote était entièrement sous forme de nitrate:

$(C_{12}H_{25})_2NH$, de PM = 353

$$DThO_{NO_3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg } O_2/\text{mg substance}$$

Appendice 4



Appendice 5

Biodégradation dans l'eau de mer

MÉTHODE DU FLACON FERMÉ

FEUILLE DE RÉSULTATS

1. **LABORATOIRE:**
2. **DATE DU DÉBUT DE L'ESSAI:**
3. **SUBSTANCE D'ESSAI:**

Nom:

Concentration de la solution mère: mg /l
 Concentration initiale dans le milieu contenant l'eau de mer: mg /l
 DThO ou DCO: mg O₂/mg de substance testée

4. **EAU DE MER:**

Origine:

Date du prélèvement:

Profondeur du prélèvement:

Aspect au moment du prélèvement (par exemple trouble, etc.):

Salinité au moment du prélèvement: ‰
 Température au moment du prélèvement: °C
 COD "x" heures après le prélèvement: mg /l

Prétraitement avant l'essai (par exemple filtration, sédimentation, vieillissement, etc.):

Comptage des colonies microbiennes: — échantillon de départ: colonies/ml
 — au début de l'essai: colonies/ml

Autres caractéristiques:

5. **MILIEU D'ESSAI:**

Température après aération: °C
 Concentration en O₂ après aération et avant le début de l'essai: mg O₂/l

6. **DOSAGE DE L'OXYGÈNE DISSOUS:**

Méthode: Winkler/électrode

	Flacon n°		mg O ₂ /l après n jours			
			0	5	15	28
Essai: eau de mer, fortifiée par des substances nutritives, contenant la substance d'essai	1	a ₁				
	2	a ₂				
	Moyenne essai	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

	Flacon n°		mg O ₂ /l après n jours			
			0	5	15	28
Témoin: eau de mer, fortifiée par des substances nutritives, ne contenant pas la substance d'essai	1	c ₁				
	2	c ₂				
	Moyenne essai	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Remarque: Des tableaux similaires peuvent être utilisés pour la substance de référence et pour les témoins de toxicité.

7. DIMINUTION DE L'OXYGÈNE DISSOUS: % DE DÉGRADATION (% D):

	Diminution de l'oxygène dissous après n jours		
	5	15	28
(m _b - m _t) ⁽¹⁾			
$\%D = \frac{(m_b - m_t) \text{ }^{(1)}}{\text{substance d'essai (mg /l)} \times DThO} \times 100$			

- (1) Ceci suppose que m_{b(0)} = m_{t(0)}, avec
 m_{b(0)} = valeur du témoin au jour 0,
 m_{t(0)} = valeur de la substance d'essai au jour 0.
 Si m_{b(0)} n'est pas égal à m_{t(0)}, utiliser (m_{t(0)} - m_{t(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)}), avec
 m_{b(x)} = valeur du témoin au jour x,
 m_{t(x)} = valeur de la substance d'essai au jour x.

C.43. ESSAI DE BIODÉGRADABILITÉ ANAÉROBIE DES SUBSTANCES ORGANIQUES DANS UNE BOUE DIGÉRÉE: MESURE DU DÉGAGEMENT GAZEUX**INTRODUCTION**

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 311 (2006) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Il existe plusieurs essais de dépistage permettant de classer les substances organiques en fonction de leur biodégradabilité aérobie [méthodes d'essai C.4, C.9, C.10 et C.11 (1) et ligne directrice 302 C de l'OCDE (2)] et les résultats de ces essais ont permis de prédire de manière très satisfaisante le devenir de substances chimiques en milieu aérobie, en particulier aux stades aérobies du traitement des eaux usées. Des proportions diverses de substances insolubles dans l'eau et de substances s'adsorbant sur les particules solides des eaux usées sont également soumises à un traitement aérobie, puisqu'elles sont présentes dans les eaux usées décantées. Néanmoins, la majeure partie de ces substances est associée aux boues de décantation primaire, qui sont séparées des eaux usées non traitées dans des cuves de décantation avant que la partie surnageante des eaux usées subisse un traitement aérobie. La boue, qui renferme une partie des substances solubles dans le liquide interstitiel, est ensuite déversée dans un digesteur chauffé où elle subit un traitement anaérobie. À ce jour, il n'existe aucun essai dans cette série destiné à évaluer la biodégradabilité anaérobie dans les digesteurs anaérobies, d'où cette proposition de nouvelle Ligne directrice. Cet essai n'est pas nécessairement applicable à d'autres milieux anoxiques de l'environnement.
2. Des techniques respirométriques permettant de mesurer les quantités de gaz produites en anaérobiose, essentiellement du méthane (CH_4) et du dioxyde de carbone (CO_2), ont été utilisées avec succès pour évaluer la biodégradabilité anaérobie. Birch et al. (3) ont passé ces procédés en revue et conclu que les travaux de Shelton et Tiedje (4), fondés sur des études antérieures (5)(6)(7), étaient les plus complets. Cette méthode (4), qui a été mise au point par d'autres (8) et est devenue des normes américaines (9)(10), ne résout pas les problèmes liés à la différence de solubilité entre le CO_2 et le CH_4 dans le milieu expérimental et au calcul de la production gazeuse théorique d'une substance d'essai. En recommandant de mesurer également la teneur en carbone inorganique dissous du liquide surnageant, le rapport de l'ECETOC (3) a étendu le champ d'application de la technique. La méthode de l'ECETOC, qui a fait l'objet d'un étalonnage international (ou essai circulaire), est devenue la norme ISO 11734 (11).
3. La présente méthode d'essai, basée sur la norme ISO 11734 (11), décrit une méthode d'essai préliminaire destinée à évaluer la biodégradabilité anaérobie potentielle des substances organiques dans des conditions spécifiques (dans un digesteur anaérobie, sur une période définie et avec une gamme de concentrations de micro-organismes déterminée). Étant donné qu'on utilise une boue diluée et une concentration relativement élevée de substance d'essai et que la durée de l'essai est supérieure au temps de rétention appliqué dans les digesteurs anaérobies, les conditions de cet essai ne correspondent pas nécessairement aux conditions régnant dans les digesteurs anaérobies et ne s'appliquent pas forcément à l'évaluation de la biodégradabilité anaérobie de substances organiques dans d'autres conditions environnementales. La boue est exposée à la substance d'essai durant une période allant jusqu'à 60 jours, donc supérieure au temps de rétention normal des boues (25 à 30 jours) dans les digesteurs anaérobies, bien que ce temps de rétention puisse être bien plus long sur des sites industriels. Les résultats de cet essai ne permettent pas de formuler des prédictions aussi convaincantes que pour les essais de biodégradation aérobie. En effet, grâce aux essais de biodégradabilité aérobie facile et aux essais de simulation ainsi qu'en aérobiose, on a accumulé suffisamment de données sur le comportement des substances d'essai pour démontrer qu'il existe une connexion. Tandis que les données dont on dispose en ce qui concerne les milieux anaérobies sont beaucoup plus fragmentaires. On peut supposer que la biodégradation est complète si on atteint 75 à 80 % de la production gazeuse théorique. Les quotients élevés de quantité de substance chimique par biomasse appliqués dans cet essai impliquent que si une substance s'avère biodégradable à l'issue de cet essai, elle a encore plus de chances d'être dégradée dans un digesteur anaérobie. De plus, une substance qui ne se transforme pas en gaz au cours de cet essai ne sera pas nécessairement persistante dans des conditions où le quotient quantité de substance par biomasse est plus proche de celui qui règne dans la nature. Interviennent également d'autres réactions anaérobies susceptibles de dégrader, au moins partiellement, les substances, par exemple la déchloration, mais cet essai ne détecte pas ces réactions. Toutefois, certaines méthodes analytiques spécifiques permettent de suivre la disparition de la substance d'essai (voir les paragraphes 6, 30, 44 et 53).

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. Une boue digérée et lavée ⁽¹⁾, à faible concentration (< 10 mg/l) de carbone inorganique (CI), est diluée environ dix fois, de telle sorte que la concentration des solides totaux atteigne 1 à 3 g/l, et est incubée à 35 °C ± 2 °C

⁽¹⁾ La boue digérée est un mélange des phases décantées des eaux usées et de boue activée, qui a été mis à incuber dans un digesteur anaérobie à environ 35 °C afin de réduire sa biomasse et les problèmes d'odeur et d'améliorer l'aptitude de la boue au séchage. Elle consiste en une association de bactéries méthanogènes et fermentaires anaérobies produisant du dioxyde de carbone et du méthane (11).

dans des récipients hermétiquement fermés, en présence de la substance d'essai à raison de 20 à 100 mg de C/l, durant une période allant jusqu'à 60 jours. L'activité de la boue est mesurée dans des récipients témoins à blanc contenant l'inoculum boueux mais pas la substance d'essai et incubés parallèlement aux récipients expérimentaux.

5. L'augmentation de la pression dans l'espace libre (situé au dessus du liquide dans les récipients) provoquée par la production de dioxyde de carbone et de méthane est mesurée. Dans les conditions de l'essai, une proportion appréciable du CO₂ produit est dissoute dans la phase liquide ou transformée en carbonate ou en carbonate d'hydrogène. Ce carbone inorganique est mesuré à la fin de l'essai.
6. La quantité de carbone (inorganique et méthane) dégagée par la biodégradation de la substance d'essai est calculée d'après la production nette de gaz et la formation nette de carbone inorganique dans la phase liquide excédant celles relevées dans les récipients témoins. L'ampleur de la biodégradation est calculée d'après la production de carbone inorganique total et de carbone méthanique et exprimée en pourcentage de la quantité mesurée ou calculée de carbone ajouté par la substance d'essai. Le déroulement de la biodégradation peut être suivi par des mesures intermédiaires de la seule production gazeuse. De plus, la biodégradation primaire peut être déterminée par des analyses spécifiques au début et à la fin de l'essai.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

7. Afin de pouvoir interpréter correctement les résultats, il est nécessaire de connaître la pureté, la solubilité dans l'eau, la volatilité et les caractéristiques d'adsorption de la substance d'essai. La teneur en carbone organique de la substance d'essai (% poids/poids) doit être établie d'après sa structure chimique ou par une mesure. Pour des substances d'essai volatiles, il est utile de disposer d'une constante de Henry mesurée ou calculée pour savoir si cet essai est applicable à ces substances. Les informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des bactéries anaérobies permettent de sélectionner une concentration expérimentale appropriée et facilitent l'interprétation des résultats lorsque la biodégradabilité est faible. Il est recommandé d'inclure un témoin destiné à vérifier le pouvoir d'inhibition de la substance, sauf s'il est établi que la substance d'essai n'inhibe pas l'activité des micro-organismes anaérobies (voir le paragraphe 21 et la norme ISO 13641-1 (12)).

CHAMP D'APPLICATION DU PROCÉDÉ EXPÉRIMENTAL

8. La présente méthode d'essai s'applique à des substances solubles dans l'eau, et peut aussi être réalisée sur des substances peu solubles ou insolubles, à condition d'utiliser une méthode de dosage exacte [voir, par exemple, ISO 10634 (13)]. Il faut généralement prendre une décision au cas par cas pour les substances volatiles. Des précautions particulières s'imposent, par exemple empêcher tout dégagement gazeux durant l'essai.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

9. Pour vérifier le mode opératoire, on teste une substance de référence parallèlement à la substance d'essai dans des récipients appropriés. Le phénol, le benzoate de sodium et le polyéthylèneglycol 400 sont des exemples de substances de référence dont la dégradation devrait dépasser 60 % de la production gazeuse théorique (c'est-à-dire méthane et carbone inorganique) en l'espace de 60 jours (3)(14).

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS

10. Dans un essai tournant international (14), une bonne reproductibilité a été relevée entre les mesures de la production gazeuse effectuées dans des récipients représentés en trois exemplaires. L'écart-type relatif (coefficient de variation) était presque toujours inférieur à 20 %, bien qu'il dépassait souvent les 20 % en présence de substances toxiques ou vers la fin de la période d'incubation de 60 jours. Des écarts plus importants ont également été observés dans des récipients ayant un volume inférieur à 150 ml. Les valeurs finales du pH dans le milieu d'essai étaient comprises entre 6,5 et 7,0.

11. Les résultats suivants ont été obtenus dans l'essai tournant:

Substance d'essai	Nombre total de résultats n_1	Dégradation moyenne (sur l'ensemble des résultats) (%)	Écart-type relatif (sur l'ensemble des résultats) (%)	Résultats valables n_2	Dégradation moyenne (sur les résultats valables) (%)	Écart-type relatif (sur les résultats valables) (%)	Résultats affichant >60 % dégradation dans les essais valables n_3
Acide palmitique	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polyéthylène glycol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Proportion de n_2

12. Les coefficients de variation autour de la moyenne de tous les résultats obtenus avec l'acide palmitique et le polyéthylène glycol 400 ont atteint respectivement 45 % ($n = 36$) et 35 % ($n = 38$). En écartant les valeurs < 40 % et > 100 % (attribuées à des conditions sous-optimales dans le premier cas et à des causes inconnues dans le second), on ramène leurs coefficients de variation respectifs à 26 % et 23 %. Les proportions de valeurs "valables" atteignant au moins 60 % de dégradation étaient de 70 % pour l'acide palmitique et de 83 % pour le polyéthylène glycol 400. Les proportions du pourcentage de biodégradation calculées à partir des mesures du carbone inorganique dissous étaient relativement faibles, mais variables. Ces proportions s'échelonnent entre 0 et 35 % (moyenne de 12 % et coefficient de variation de 92 %), s'agissant de l'acide palmitique, et entre 0 et 40 % (moyenne de 24 % et coefficient de variation de 54 %), dans le cas du polyéthylène glycol 400.

DESCRIPTION DU PROCÉDÉ EXPÉRIMENTAL

Appareillage

13. Matériel courant de laboratoire et:

- a. incubateur anti-étincelles et thermostaté à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;
- b. récipients expérimentaux en verre résistant à la pression et d'une capacité nominale appropriée ⁽¹⁾, munis d'un septum étanche aux gaz, capable de supporter une pression d'environ 2 bars. Le volume de l'espace libre occupe environ 10 à 30 % du volume total. Si le dégagement de biogaz est régulier, un volume de 10 % convient, mais si le dégagement gazeux ne se produit qu'à la fin de l'essai, ce volume doit s'élever à 30 %. On recommande d'utiliser des flacons à sérum en verre d'un volume nominal de 125 ml et d'un volume total d'environ 160 ml, obturés par des septums ⁽²⁾ adaptés aux flacons à sérum et fixés par des surcapsules en aluminium, lorsqu'il y a un dégagement de pression à chaque prélèvement;
- c. manomètre capable de mesurer ⁽³⁾ et de laisser s'échapper le gaz produit, par exemple un manomètre manuel de précision connecté à une aiguille de seringue appropriée; un robinet à trois voies étanche aux gaz facilite la libération de la pression excédentaire (Appendice 1). Le volume interne des tuyaux et du robinet du transducteur de pression doit être aussi petit que possible, de telle sorte que les erreurs introduites du fait de négliger le volume de l'appareillage ne soient pas significatives.

⁽¹⁾ La capacité préconisée est comprise entre 0,1 et 1 litre.

⁽²⁾ Il est recommandé d'utiliser des septums en silicone étanches aux gaz et de vérifier leur étanchéité aux gaz, surtout dans le cas des septums en caoutchouc butylique, étant donné que plusieurs septums vendus dans le commerce ne sont pas suffisamment étanches au méthane et que certains septums ne sont plus étanches une fois qu'ils ont été percés par une aiguille dans les conditions de l'essai.

⁽³⁾ Cet instrument devrait être utilisé et étalonné régulièrement, conformément aux instructions du fabricant. Si on utilise un manomètre de la qualité prescrite, par exemple encapsulé avec une membrane en acier, il n'est pas nécessaire de l'étalonner au laboratoire. L'exactitude de l'étalonnage peut être vérifiée au laboratoire par une mesure unique effectuée à 1×10^5 Pa et comparée à la même mesure réalisée avec un manomètre à affichage mécanique. Si ce point est mesuré correctement, la linéarité ne sera pas altérée. Si on utilise d'autres instruments de mesure (dont l'étalonnage n'est pas garanti par le fabricant), il est recommandé de les étalonner sur la totalité de la gamme des valeurs, à intervalles réguliers.

Note: les pressions relevées sont utilisées directement pour calculer la quantité de carbone produite dans l'espace libre (paragraphe 42 à 44). Sinon, les pressions relevées peuvent également être converties en volumes (à 35 °C, à la pression atmosphérique) de gaz produit au moyen d'un graphique de conversion. Ce graphique est dressé à partir des données obtenues en injectant des volumes connus d'azote gazeux dans une série de récipients d'essai (par exemple des flacons à serum) à 35 °C ± 2 °C et en notant les valeurs résultantes de la pression stabilisée (voir Appendice 2). Le calcul est exposé dans la note du paragraphe 44.

Avertissement: prendre garde de ne pas se blesser avec les aiguilles des microseringues;

- d. analyseur de carbone, capable de déterminer directement le carbone inorganique dans la gamme comprise entre 1 mg/l et 200 mg/l;
- e. seringues à haute précision pour les échantillons gazeux et liquides;
- f. agitateurs magnétiques (facultatif);
- g. boîte à gants (recommandé).

Réactifs

- 14. Utiliser des réactifs de qualité pour analyse tout au long de l'essai.

Eau

- 15. Eau distillée ou désionisée (désoxygénée par barbotage avec de l'azote gazeux renfermant moins de 5 µl/l d'oxygène), contenant moins de 2 mg/l de carbone organique dissous.

Milieu d'essai

- 16. Préparer un milieu de dilution contenant les ingrédients suivants dans les quantités spécifiées:

Dihydrogénophosphate de potassium anhydre (KH_2PO_4)	0,27 g
Hydrogénophosphate de sodium dodécahydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	1,12 g
Chlorure d'ammonium (NH_4Cl)	0,53 g
Chlorure de calcium dihydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,075 g
Chlorure de magnésium hexahydraté ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g
Chlorure de fer (II) tétrahydraté ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,02 g
Résazurine (indicateur d'oxygène)	0,001 g
Sulfure de sodium nonahydraté ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g
Solution mère d'oligo-éléments (facultatif, paragraphe 18)	10 ml
Ajouter de l'eau désoxygénée (paragraphe 15) pour porter le volume à	1 litre-

Note: s'il est impossible d'utiliser du sulfure de sodium fraîchement préparé, il faut le laver et le sécher avant l'emploi, afin qu'il soit suffisamment réducteur. Cet essai peut être conduit sans boîte à gants (voir paragraphe 26). Dans ce cas, la concentration finale de sulfure de sodium dans le milieu peut être portée à 0,20 g de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ par litre. Le sulfure de sodium peut aussi être ajouté à partir d'une solution mère anaérobie appropriée à travers le septum des récipients d'essai fermés, ce mode opératoire diminuant le risque d'oxydation. Le sulfure de sodium peut être remplacé par du citrate de titane (III). Ce dernier est introduit à

travers le septum des récipients d'essai fermés de telle sorte que sa concentration finale y atteigne 0,8 à 1,0 mmol/l/l. Le citrate de titane (III) est un agent réducteur très efficace et peu toxique que l'on prépare comme suit: dissoudre 2,94 g de citrate de sodium dihydraté dans 50 ml d'eau désoxygénée (afin d'obtenir une solution à 200 mmol/l) et ajouter 5 ml d'une solution de chlorure de titane (III) à 15 % (poids/volume). Neutraliser à pH $7 \pm 0,2$ avec une base minérale et verser dans un récipient approprié sous un jet d'azote. La concentration de citrate de titane (III) dans cette solution mère est de 164 mmol/l.

17. Mélanger les ingrédients du milieu expérimental à l'exception de l'agent réducteur (sulfure de sodium, citrate de titane) et faire barboter de l'azote gazeux dans la solution durant environ 20 minutes, juste avant son utilisation, pour enlever l'oxygène. Ajouter ensuite le volume qui convient de la solution fraîchement préparée (dans de l'eau désoxygénée) de l'agent réducteur, juste avant d'utiliser le milieu. Ajuster le pH du milieu, si nécessaire, avec un acide ou une base minéraux dilués à $7 \pm 0,2$.

Solution mère d'oligo-éléments (facultatif)

18. Il est recommandé d'utiliser un milieu d'essai contenant les oligo-éléments suivants, afin d'améliorer les processus de dégradation anaérobie, surtout si les concentrations d'inoculum sont faibles (par exemple 1 g/l) (11).

Chlorure de manganèse tétrahydraté ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	50 mg
Acide borique (H_3BO_3)	5 mg
Chlorure de zinc (ZnCl_2)	5 mg
Chlorure de cuivre (II) (CuCl_2)	3 mg
Molybdate de sodium dihydraté ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1 mg
Chlorure de cobalt hexahydraté ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	100 mg
Chlorure de nickel hexahydraté ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	10 mg
Sélénite de sodium (Na_2SeO_3)	5 mg
Ajouter de l'eau désoxygénée (paragraphe 15) pour porter le volume à	1 litre

Substance d'essai

19. Ajouter la substance d'essai véhiculée dans une solution, suspension ou émulsion mère ou directement, à l'état solide ou liquide, ou adsorbée sur un filtre en fibres de verre, de façon à obtenir une concentration ne dépassant pas 100 mg/l de carbone organique. Si l'on emploie une solution mère, préparer une solution appropriée avec de l'eau (paragraphe 15) préalablement désoxygénée par barbotage avec de l'azote gazeux, d'une concentration telle que le volume ajouté soit inférieur à 5 % du volume total du mélange réactionnel. Ajuster le pH de la solution mère à $7 \pm 0,2$, si nécessaire. Pour les substances d'essai insuffisamment solubles dans l'eau, se reporter à la norme ISO 10634 (13). Si l'on utilise un solvant, préparer un témoin supplémentaire dans lequel seul le solvant est ajouté au milieu inoculé. Les solvants organiques dont on sait qu'ils inhibent la production de méthane, tels que le chloroforme et le tétrachlorure de carbone, sont à éviter.

Avertissement — Les substances d'essai toxiques et celles dont les propriétés sont inconnues sont à manipuler avec précaution.

Substances de référence

20. Des substances de référence, telles que le benzoate de sodium, le phénol et le polyéthylène glycol 400, ont déjà permis de vérifier correctement le mode opératoire, puisqu'elles sont biodégradées à plus de 60 % en l'espace de 60 jours. Préparer une solution mère (dans de l'eau désoxygénée) de la substance de référence choisie, de la même manière que la solution de substance d'essai, et ajuster le pH à $7 \pm 0,2$, si nécessaire.

Témoin de l'inhibition (facultatif)

21. Pour obtenir des informations sur la toxicité de la substance d'essai à l'égard des micro-organismes anaérobies, afin de trouver la concentration expérimentale la plus appropriée, ajouter la substance d'essai et la substance de référence dans un récipient contenant le milieu expérimental (voir paragraphe 16), chacune à la même concentration que celle à laquelle elles ont été ajoutées dans le milieu d'essai lors de l'essai (voir les paragraphes 19 et 20, ainsi que la norme ISO 13641-1 (12)).

Boue digérée

22. Prélever de la boue digérée dans le digesteur d'une station d'épuration qui traite principalement des eaux usées domestiques. Cette boue doit être caractérisée de façon exhaustive et les informations de référence doivent être incluses dans le rapport (voir paragraphe 54). Si l'on projette d'employer un inoculum adapté, on pourra peut-être recueillir la boue digérée dans une station d'épuration d'effluents industriels. Utiliser des bouteilles à large ouverture en polyéthylène à haute densité ou d'une matière semblable, capables de se dilater, pour collecter la boue digérée. Remplir ces bouteilles de boue jusqu'à environ 1 cm de leur embouchure et les fermer hermétiquement, de préférence avec une soupape de sécurité. Après son arrivée au laboratoire, la boue récoltée peut être utilisée directement ou placée dans un digesteur à l'échelle du laboratoire. Libérer l'excès de biogaz en ouvrant les bouteilles de boue avec précaution. Sinon, une boue anaérobie cultivée en laboratoire peut également être utilisée comme source d'inoculum, mais son spectre d'activité risque d'avoir été altéré.

Avertissement — Les boues digérées comportent des risques d'incendie et d'explosion à cause des gaz inflammables qu'elles dégagent, elles renferment également des organismes potentiellement pathogènes, de sorte que ces boues sont à manipuler avec prudence. Pour des raisons de sécurité, il ne faut pas recueillir les boues dans des récipients en verre.

23. Pour réduire la production gazeuse de fond et diminuer l'influence des témoins à blanc, on peut envisager de prédigérer la boue. Si une prédigestion s'avère nécessaire, on laisse la boue subir une digestion sans l'additionner d'éléments nutritifs ou de substrats à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ pendant sept jours au maximum. On a constaté, pour quelques substances testées, qu'une prédigestion d'environ 5 jours entraîne habituellement une diminution optimale de la production gazeuse dans le témoin à blanc, qui ne s'accompagne pas d'une prolongation inacceptable de la phase de latence ou des périodes d'incubation durant la phase d'essai, ni d'une perte d'activité.
24. Pour les substances d'essai qui sont, ou risquent d'être, peu biodégradables, on envisagera de préexposer la boue à la substance d'essai, afin d'obtenir un inoculum mieux adapté. Dans ce cas, ajouter la substance d'essai à raison de 5 mg/l à 20 mg/l de carbone organique à la boue digérée et incubé ce mélange durant deux semaines au maximum. Laver soigneusement la boue préexposée avant de l'utiliser (voir paragraphe 25) et stipuler les conditions de la préexposition dans le rapport d'essai.

Inoculum

25. Laver la boue juste avant son emploi (paragraphe 22 à 24), afin d'abaisser la concentration de carbone inorganique à moins de 10 mg/l dans la suspension expérimentale finale. Centrifuger la boue dans des tubes hermétiquement clos (par exemple pendant 5 minutes à 3 000 g) et jeter le surnageant. Suspendre le culot dans un milieu désoxygéné (paragraphe 16 et 17), centrifuger à nouveau la suspension et éliminer le liquide surnageant. Si la teneur en carbone inorganique n'a pas été suffisamment réduite, le lavage de la boue peut encore être répété deux fois au maximum. Ce traitement ne semble pas nuire aux micro-organismes. Enfin, suspendre le culot dans le volume requis de milieu expérimental et déterminer la concentration des solides totaux [voir, par exemple, ISO 11923 (15)]. La concentration finale des solides totaux dans les récipients d'essai doit être comprise entre 1 g/l et 3 g/l (ou environ 10 % de la concentration dans la boue digérée non diluée). Mener les opérations ci-dessus en s'efforçant de préserver autant que possible la boue de tout contact avec l'oxygène (par exemple dans une atmosphère azotée).

MODE OPÉRATOIRE

26. Conduire les étapes initiales suivantes en appliquant des techniques permettant de limiter au maximum le contact entre la boue digérée et l'oxygène; il peut par exemple être nécessaire de travailler dans une boîte à gants sous atmosphère azotée et/ou de purger les flacons avec de l'azote (4).

Préparation des récipients d'essai et des récipients témoins

27. Préparer des récipients en au moins trois exemplaires (voir paragraphe 13-b) pour la substance d'essai, les témoins à blanc, la substance de référence, les témoins d'inhibition (le cas échéant) ainsi que des enceintes manostatées (option facultative) (voir paragraphes 7 et 19 à 21). On peut également préparer des récipients supplémentaires pour évaluer la biodégradation primaire par des procédés analytiques spécifiques de la substance d'essai. Le même ensemble de récipients témoins à blanc peut être utilisé pour plusieurs substances soumises au même essai, à condition que les volumes de l'espace libre soient homogènes.

28. Préparer l'inoculum dilué avant de l'ajouter aux récipients, par exemple au moyen d'une pipette à large embouchure. Ajouter des aliquotes de l'inoculum bien mélangé (paragraphe 25), de telle sorte que la concentration des solides totaux soit identique dans tous les récipients (entre 1 g/l et 3 g/l). Ajouter les solutions mères de la substance d'essai et de la substance de référence, après avoir ajusté le pH à $7 \pm 0,2$, si nécessaire. Il convient d'ajouter les substances d'essai et de référence dans le véhicule le plus approprié (voir paragraphe 19).
29. La concentration expérimentale en carbone organique doit normalement se situer entre 20 et 100 mg/l (paragraphe 4). Si la substance d'essai est toxique, la concentration expérimentale doit être réduite à 20 mg de C/l, ou même moins si seule la biodégradation primaire est à mesurer (par des analyses spécifiques). Il est à noter que la variabilité des résultats de l'essai augmente aux basses concentrations expérimentales.
30. Dans les récipients témoins à blanc, ajouter une quantité équivalente du véhicule utilisé pour ajouter la substance d'essai, à la place de la solution, suspension ou émulsion mère. Si la substance d'essai a été introduite sur un support en fibres de verre (filtre) ou à l'aide de solvants organiques, ajouter un filtre dans les témoins à blanc ou un volume de solvant équivalent à celui qui a été évaporé. Inclure un récipient d'essai supplémentaire contenant la substance d'essai pour y mesurer le pH. Ajuster le pH à $7 \pm 0,2$, si nécessaire, avec de petites quantités de base ou d'acide minéraux dilués. On ajoute la même quantité d'agent neutralisant à tous les récipients d'essai. Ces ajouts ne devraient pas être nécessaires étant donné que le pH des solutions mères de la substance d'essai et de la substance de référence a déjà été ajusté (voir paragraphes 19 et 20). S'il faut mesurer la biodégradation primaire, on prélève un échantillon approprié dans le récipient destiné à l'analyse du pH ou dans un récipient d'essai supplémentaire et on mesure la concentration de la substance d'essai par une analyse spécifique. Si le mélange réactionnel requiert une agitation, des aimants enrobés peuvent être déposés dans tous les récipients (facultatif).
31. S'assurer que le volume total du liquide V_1 et le volume de l'espace libre V_h sont identiques dans tous les récipients; relever et consigner les valeurs de V_1 et V_h . Chaque récipient doit être fermé hermétiquement au moyen d'un septum étanche aux gaz et transféré de la boîte à gants (paragraphe 26) dans l'incubateur (voir paragraphe 13-a))

Substances d'essai insolubles

32. Les quantités pesées de substances peu solubles dans l'eau sont versées directement dans les récipients préparés. Si le recours à un solvant s'avère nécessaire (voir paragraphe 19), transférer la solution ou la suspension de substance d'essai dans les récipients vides. Si possible, évaporer le solvant en faisant circuler de l'azote gazeux dans les récipients, avant d'ajouter les autres ingrédients, à savoir la boue diluée (paragraphe 25) et l'eau désoxygénée, comme indiqué. Un témoin supplémentaire au solvant doit également être préparé (paragraphe 19). La norme ISO 10634 (13) présente d'autres méthodes d'ajout de substances insolubles. Les substances d'essai liquides peuvent être introduites avec une seringue dans les récipients complètement préparés et hermétiquement fermés, si l'on s'attend à ce que le pH initial ne dépasse pas 7 ± 1 , sinon ajouter la substance d'essai comme indiqué plus haut (paragraphe 19).

Incubation et mesures de la pression gazeuse

33. Incuber les récipients préparés à $35 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ durant environ une heure, afin que leur contenu s'équilibre, et évacuer l'excès de gaz dans l'atmosphère, par exemple en secouant chaque récipient, l'un après l'autre, et en y insérant l'aiguille du manomètre (paragraphe 13-c) à travers le septum, puis en ouvrant le robinet jusqu'à ce que le manomètre indique zéro. Si à ce stade, ou lorsqu'on pratique des mesures intermédiaires, la pression de l'espace libre est inférieure à la pression atmosphérique, il faut rajouter de l'azote gazeux afin de rétablir la pression atmosphérique. Fermer le robinet (voir paragraphe 13-c) et incuber les récipients à l'obscurité, en s'assurant que toutes les parties des récipients sont maintenues à la température de la digestion. Observer les récipients après 24 à 48 heures d'incubation. Écarter les récipients dont le liquide surnageant présente une coloration rose bien nette, autrement dit, où la résazurine (voir paragraphe 16) a viré, révélant la présence d'oxygène (voir paragraphe 50). Bien que le système puisse tolérer de petites quantités d'oxygène, des concentrations plus importantes risquent d'inhiber fortement la biodégradation anaérobie. Le rejet occasionnel d'un seul récipient sur un ensemble de trois récipients identiques est acceptable, mais des rejets plus fréquents doivent amener l'expérimentateur à vérifier le mode opératoire et à recommencer l'essai.

34. Mélanger soigneusement le contenu de chaque récipient en le remuant ou en agitant le récipient pendant quelques minutes, au moins 2 ou 3 fois par semaine et peu avant chaque mesure de la pression. L'agitation resuspend l'inoculum et permet d'équilibrer les gaz. Toutes les pressions sont à mesurer rapidement, les récipients d'essai pouvant subir une baisse de température induisant un affichage de valeurs erronées. Lorsqu'on mesure la pression, la totalité du récipient d'essai, y compris l'espace libre, doit être maintenue à la température de la digestion. Mesurer la pression gazeuse, par exemple en insérant l'aiguille à seringue connectée au manomètre à travers le septum (paragraphe 13-c). Veiller à ne pas laisser entrer d'eau dans l'aiguille; si cela se produit, sécher les parties humides et placer une nouvelle aiguille. La pression est à mesurer en millibars (voir paragraphe 42). La pression gazeuse régnant dans les récipients peut être mesurée périodiquement, par exemple une fois par semaine, et éventuellement l'excès de gaz peut être évacué dans l'atmosphère. Sinon, on peut aussi ne mesurer la pression qu'à la fin de l'essai, afin de déterminer la quantité de biogaz produite.
35. On préconise de relever les pressions gazeuses intermédiaires, parce que l'augmentation de la pression indique à quel moment l'essai peut être achevé et permet de suivre la cinétique (voir paragraphe 6).
36. Normalement, l'essai prend fin après une période d'incubation de 60 jours, à moins que la courbe de biodégradation obtenue à partir des mesures de la pression ait atteint un plateau avant; cette phase de plateau, où la courbe marque un pallier, correspond à la biodégradation maximale. Si le plateau atteint moins de 60 %, l'interprétation est délicate parce que cela signifie qu'une partie seulement de la molécule a été minéralisée ou qu'une erreur a été commise. Si, à l'issue de la période d'incubation normale, du gaz se dégage alors que la phase plateau n'a manifestement pas été atteinte, on envisagera de prolonger l'essai pour vérifier si la courbe parvient finalement au plateau (> 60 %).

Mesure du carbone inorganique

37. À la fin de l'essai, après la dernière mesure de la pression gazeuse, laisser la boue au repos. Ouvrir chaque récipient, l'un après l'autre, et prélever immédiatement un échantillon en vue de déterminer la concentration (mg/l) du carbone inorganique dans le liquide surnageant. Le liquide surnageant ne peut être ni centrifugé ni filtré, car ces traitements entraîneraient une perte inacceptable de dioxyde de carbone dissous. Si le surnageant ne peut être analysé juste après avoir été prélevé, stocker ce dernier dans une fiole hermétiquement fermée, sans espace libre, et refroidie à environ 4 °C, pendant deux jours au maximum. Après avoir mesuré le carbone inorganique, mesurer et enregistrer la valeur du pH.
38. Sinon, le carbone inorganique présent dans le surnageant peut être déterminé indirectement, d'après le rejet de carbone inorganique dissous sous la forme de dioxyde de carbone mesurable dans l'espace libre. Après la dernière mesure de pression gazeuse, ramener la pression régnant dans chaque récipient d'essai à la pression atmosphérique. Acidifier le contenu de chaque récipient d'essai à environ pH 1 en ajoutant un acide minéral concentré (par exemple H₂SO₄), à travers le septum des récipients hermétiquement fermés. Incuber les récipients secoués à 35 °C ± 2 °C durant environ 24 heures et mesurer au manomètre la pression gazeuse résultant du dioxyde de carbone dégagé.
39. Effectuer les mêmes relevés pour le témoin à blanc, le témoin contenant la substance de référence et, le cas échéant, les témoins d'inhibition (voir paragraphe 21).
40. Dans certains cas, en particulier si les mêmes récipients témoins sont utilisés pour plusieurs substances d'essai, on envisagera de mesurer, si nécessaire, les concentrations intermédiaires de carbone inorganique dans les récipients d'essai et les récipients témoins. Dans ce cas, il faut prévoir un nombre suffisant de récipients pour toutes les mesures intermédiaires. Il est préférable de procéder de cette manière plutôt que de prélever tous les échantillons dans le même récipient. Cette dernière option ne peut être retenue que si le volume nécessaire à l'analyse du carbone inorganique dissous ne semble pas trop important. Le carbone inorganique dissous est mesuré après la mesure de la pression gazeuse, mais sans que le gaz excédentaire ait été évacué, comme décrit ci-dessous:
- prélever des échantillons de surnageant d'un volume aussi petit que possible, en introduisant une seringue à travers le septum, sans ouvrir les récipients, et déterminer la teneur en carbone inorganique de l'échantillon;
 - après avoir prélevé l'échantillon, évacuer éventuellement le gaz excédentaire;

- il faut tenir compte du fait qu'une diminution, même minime, du volume du surnageant (par exemple de 1 %) peut entraîner une augmentation sensible du volume du gaz occupant l'espace libre (V_h);
- si nécessaire, les équations (voir paragraphe 44) sont corrigées par une augmentation de la valeur de V_h dans l'équation 3.

Analyses spécifiques

41. S'il y a lieu de déterminer la dégradation anaérobie primaire (voir paragraphe 30), prélever un échantillon d'un volume suffisant pour les analyses spécifiques, au début et à la fin de l'essai, dans les récipients contenant la substance d'essai. Il est à noter que, si ce prélèvement est effectué, les volumes de l'espace libre (V_h) et du liquide (V_l) sont modifiés et il faut en tenir compte dans le calcul de la production gazeuse. Sinon, il est également possible de prélever des échantillons destinés aux analyses spécifiques dans des mélanges supplémentaires, prévus à cette fin (paragraphe 30).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

42. Pour des raisons pratiques, la pression du gaz est mesurée en millibars ($1 \text{ mbar} = 1 \text{ hPa} = 10^2 \text{ Pa}$; $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2$), le volume en litres et la température en degrés Celsius.

Carbone dans l'espace libre

43. Sachant qu'une mole de méthane et une mole de dioxyde de carbone contiennent chacune 12 g de carbone, la masse de carbone dans un volume donné de gaz dégagé peut être exprimée par l'équation suivante:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Équation [1]}$$

où:

m = masse de carbone (mg) dans un volume donné de gaz dégagé;

12 = masse atomique relative du carbone;

n = nombre de moles de gaz dans le volume donné.

Si un gaz autre que le méthane ou le dioxyde de carbone (par exemple du N_2O) se dégage en quantité considérable, il convient de modifier la formule [1], de façon à décrire la possibilité d'effets engendrés par les gaz dégagés.

44. D'après les lois sur les gaz, n peut s'exprimer par:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Équation [2]}$$

où:

p = pression du gaz (Pascals);

V = volume du gaz (m^3);

R = constante molaire des gaz [$8,314 \text{ J}/(\text{mol K})$];

T = température d'incubation (Kelvins).

En combinant les équations [1] et [2] et en adaptant la formule pour tenir compte de la production de gaz dans le témoin à blanc,

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0,1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Équation [3]}$$

où:

m_h = masse de carbone net produite sous forme de gaz dans l'espace libre (mg);

Δp = moyenne de la différence entre les pressions initiale et finale dans les récipients d'essai moins la moyenne correspondante dans les récipients témoins à blanc (millibars);

V_h = volume de l'espace libre dans le récipient (litres).

0,1 = facteur permettant de convertir à la fois les newtons/ m^2 en millibars et les m^3 en litres.

L'équation [4] devrait être utilisée pour la température normale d'incubation, à savoir 35 °C (308 K):

$$m_h = 0,468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Équation [4]}$$

Note: Autre mode de calcul du volume: les pressions lues sur le manomètre sont converties en ml de gaz produit à l'aide de la courbe de référence tracée en portant le volume injecté (ml) en fonction des valeurs relevées sur le manomètre (Appendice 2). On calcule le nombre de moles (n) de gaz dans l'espace libre de chaque récipient en divisant la production de gaz cumulée (ml) par 25 286 ml/mole, valeur qui correspond au volume occupé par une mole de gaz à 35 °C à pression atmosphérique normale. Étant donné qu'une mole de CH₄ et une mole de CO₂ contiennent chacune 12 g de carbone, la quantité de carbone (mg) dans l'espace libre (m_h) est donnée par l'équation [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Équation [5]}$$

En adaptant la formule pour tenir compte de la production de gaz dans le témoin à blanc,

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0,475\Delta V \quad \text{Équation [6]}$$

où:

m_h = masse de carbone net produite sous forme de gaz dans l'espace libre (mg);

ΔV = moyenne de la différence entre le volume de gaz produit dans l'espace libre des récipients d'essai et le volume de gaz produit dans l'espace libre des récipients témoins à blanc

25 286 = volume occupé par une mole de gaz à 35 °C et sous 1 atmosphère.

45. Il est possible de suivre le déroulement de la biodégradation en portant sur un graphique l'accroissement de pression cumulé Δp (millibars) en fonction du temps, s'il y a lieu. À partir de cette courbe, mettre en évidence et noter la phase de latence (jours). La phase de latence correspond au temps écoulé entre le début de l'essai et le moment où la dégradation commence à être sensible (l'Appendice 3 en donne un exemple). Si des échantillons intermédiaires de surnageant sont prélevés et analysés (paragraphe 40, 46 et 47), alors le carbone total produit (dans le gaz et dans le liquide) peut être porté sur le graphique à la place de la seule pression cumulée.

Carbone dans le liquide

46. On néglige la quantité de méthane dans le liquide, sachant que sa solubilité dans l'eau est très faible. Calculer la masse de carbone inorganique dans le liquide des récipients d'essai à l'aide de l'équation [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Équation [7]}$$

où:

m_l = masse de carbone inorganique dans le liquide (mg);

C_{net} = concentration de carbone inorganique dans les récipients d'essai moins cette même concentration dans les récipients témoins à la fin de l'essai (mg/l);

V_l = volume de liquide dans le récipient (litres).

Carbone gazéifié total

47. Calculer la masse totale de carbone gazéifié dans le récipient au moyen de l'équation [8]:

$$m_t = m_h + m_l \quad \text{Équation [8]}$$

où:

m_t = masse totale de carbone gazéifié (mg);

$m_h + m_l$ sont comme définis plus haut.

Carbone de la substance d'essai

48. Calculer la masse de carbone (provenant de la substance d'essai ajoutée) dans les récipients d'essai à l'aide de l'équation [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \quad \text{Équation [9]}$$

où:

m_v = masse de carbone de la substance d'essai (mg);

C_c = concentration du carbone de la substance d'essai dans le récipient d'essai (mg/l);

V_l = volume de liquide dans le récipient d'essai (litres).

Ampleur de la biodégradation

49. Calculer le pourcentage de biodégradation d'après le gaz présent dans l'espace libre à l'aide de l'équation [10] et le pourcentage total de biodégradation avec l'équation [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \quad \text{Équation [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \quad \text{Équation [11]}$$

où:

D_h = biodégradation d'après le gaz présent dans l'espace libre (%);

D_t = biodégradation totale (%);

m_h , m_v et m_t sont définis comme plus haut.

Le degré de biodégradation primaire est calculé d'après les mesures (facultatives) de la concentration de la substance d'essai au début et à la fin de l'incubation, à l'aide de l'équation [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \quad \text{Équation [12]}$$

où:

D_p = dégradation primaire de la substance d'essai (%);

S_i = concentration initiale de la substance d'essai (mg/l);

S_e = concentration finale de la substance d'essai (mg/l).

Si la méthode d'analyse fait apparaître des concentrations significatives de substance d'essai dans l'inoculum de boue anaérobie non traité, utiliser l'équation [13]:

$$D_p^1 = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Équation [13]}$$

où:

D_p^1 = dégradation primaire corrigée de la substance d'essai (%);

S_{ib} = concentration initiale "apparente" de la substance d'essai dans les témoins à blanc (mg/l);

S_{eb} = concentration finale "apparente" de la substance d'essai dans les témoins à blanc (mg/l).

Validité des résultats

50. Seules les pressions relevées dans les récipients ne présentant pas de coloration rose (voir paragraphe 33) peuvent être utilisées. La contamination par l'oxygène est réduite au minimum par des techniques adéquates de manipulation en anaérobiose.
51. Il faut considérer que l'essai est valable si la substance de référence atteint un plateau qui représente plus de 60 % de biodégradation ⁽¹⁾.
52. Si, à la fin de l'essai, le pH sort de l'intervalle 7 ± 1 et que la biodégradation est insuffisante, recommencer l'essai en augmentant le pouvoir tampon du milieu.

⁽¹⁾ Ce point est à réévaluer si des substances chimiques de référence adsorbantes et insolubles sont incluses.

Inhibition de la dégradation

53. La production de gaz dans les récipients contenant à la fois la substance d'essai et la substance de référence doit être au moins égale à celle enregistrée dans les récipients ne contenant que la substance de référence; sinon cela révèle une inhibition de la production de gaz. Dans certains cas, la production gazeuse dans les récipients renfermant la substance d'essai, mais pas la substance de référence est inférieure à celle régnant dans les récipients témoins à blanc: cela indique que la substance d'essai est inhibante.

Rapport d'essai

54. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

Substance d'essai:

- nom courant, nom chimique, numéro CAS, formule structurale et propriétés physico-chimiques pertinentes;
- pureté (impuretés) de la substance d'essai.

Conditions expérimentales:

- volumes du liquide dilué du digesteur (V_d) et de l'espace libre (V_h) dans le récipient;
- description des récipients d'essai, des principales caractéristiques de la mesure du biogaz (par exemple, type de manomètre) et de l'analyseur de carbone inorganique;
- ajout des substances d'essai et de référence au système expérimental: concentration expérimentale employée et recours à un solvant, le cas échéant;
- détails sur l'inoculum utilisé: nom de la station d'épuration des eaux usées, description de la source des eaux usées traitées (par exemple, température des opérations, temps de rétention de la boue, origine principalement domestique, etc.), concentration, toutes les informations permettant d'étayer ce qui précède et renseignements sur le prétraitement éventuel de l'inoculum (par exemple prédigestion, préexposition);
- température d'incubation;
- nombre de récipients traités de manière identique.

Résultats:

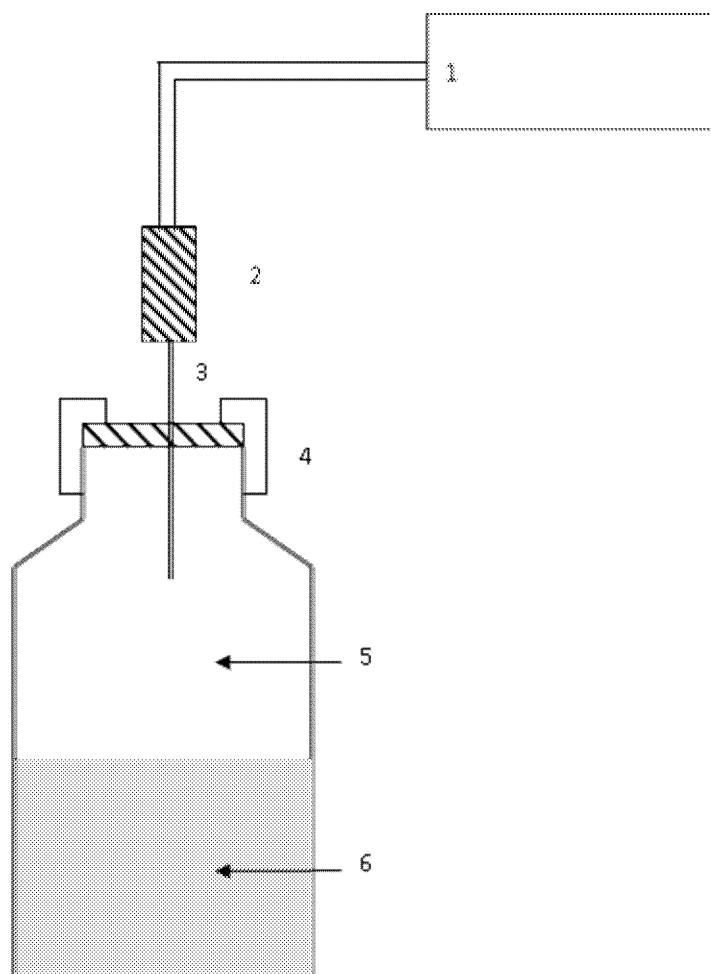
- valeurs du pH et du carbone inorganique à la fin de l'essai;
- concentration de la substance d'essai au début et à la fin de l'essai, si une mesure spécifique a été effectuée;
- toutes les valeurs mesurées dans les récipients d'essai, les témoins à blanc, les témoins contenant la substance de référence et les témoins d'inhibition, comme il convient [par exemple la pression en millibars, la concentration du carbone inorganique (mg/l)] sont présentées sous forme de tableau (les valeurs mesurées dans l'espace libre et le liquide doivent être rapportées séparément);
- traitement statistique des données, durée de l'essai et diagramme de la biodégradation de la substance d'essai, de la substance de référence et du témoin d'inhibition;
- pourcentage de biodégradation de la substance d'essai et de la substance de référence;
- motifs du rejet éventuel des résultats;
- analyse des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Chapitres suivant de la présente annexe:
- C.4. Détermination de la biodégradabilité facile;
 - C.9. Biodégradation — Essai de Zahn et Wellens;
 - C.10. Essai de simulation — Traitement aérobie des eaux usées:
A: Unités de traitement par boues activées; B: Biofilms
 - C.11. Biodégradation — Boues activées: essai d'inhibition de la respiration
- (2) OCDE (2009) Biodégradabilité dite intrinsèque: Essai MITI modifié (II), Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n° 302 C, OCDE, Paris

- (3) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527-1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).
 - (4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiology*, 47, 850-857.
 - (5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* 13, 485-492.
 - (6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 84-89.
 - (7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.
 - (8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. *Chemosphere*, 17, 2441-2460.
 - (9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.
 - (10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.
 - (11) Organisation internationale de normalisation (1995) ISO 11 734 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.
 - (12) Organisation internationale de normalisation (2003) ISO 13 641-1 Qualité de l'eau — Détermination de l'inhibition de la production de gaz des bactéries anaérobies — Partie 1 Essai général.
 - (13) Organisation internationale de normalisation (1995) ISO 10 634 Qualité de l'eau — Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.
 - (14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. *Chemosphere*, 27, 1499-1509.
 - (15) Organisation internationale de normalisation (1997) ISO 11 923 Qualité de l'eau — Dosage des matières en suspension par filtration sur filtre en fibres de verre.
-

Appendice 1

Exemple d'appareil permettant de mesurer la production de biogaz d'après la pression gazeuse*Légende:*

- 1 — Manomètre
- 2 — Robinet à trois voies étanche aux gaz
- 3 — Aiguille de seringue
- 4 — Bouchon étanche aux gaz (septum serré sur le col du flacon par une surcapsule)
- 5 — Espace libre (V_h)
- 6 — Inoculum de boue digérée (V_l)

Réipients d'essai maintenus à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

Appendice 2

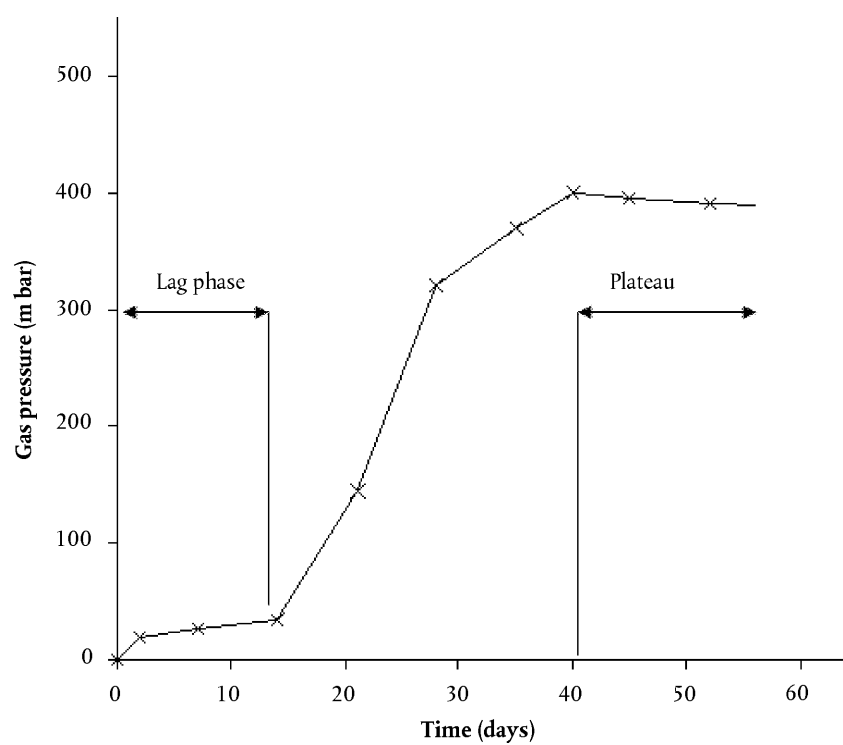
Conversion des mesures manométriques

Les pressions relevées peuvent être rapportées à des volumes gazeux à l'aide d'une courbe de référence obtenue en injectant des volumes d'air connus à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ dans des flacons à serum contenant un volume d'eau égal à celui du mélange réactionnel, V_R :

- Verser des aliquotes de V_R ml d'eau, maintenues à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ dans cinq flacons à serum. Fermer les flacons hermétiquement et les plonger dans un bain d'eau à 35 °C durant 1 heure pour les laisser s'équilibrer.
- Enclencher le manomètre, attendre qu'il se stabilise et le mettre à zéro.
- Insérer l'aiguille de la seringue à travers le bouchon de l'un des flacons, ouvrir le robinet jusqu'à ce que le manomètre indique zéro et fermer le robinet.
- Répéter ce processus avec les autres flacons.
- Injecter 1 ml d'air à $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ dans chaque flacon. Insérer l'aiguille (montée sur le manomètre) à travers le bouchon de l'un des flacons et attendre que la valeur affichée sur le manomètre se stabilise. Noter la pression, ouvrir le robinet jusqu'à ce que la pression retombe à zéro puis fermer le robinet.
- Répéter ce processus avec les autres flacons.
- Répéter la totalité du processus en appliquant des volumes d'air de 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml et 50 ml.
- Tracer une courbe de conversion de la pression (Pa) en fonction du volume de gaz injecté V_b (ml). La réponse de l'instrument est linéaire sur la gamme comprise entre 0 Pa et 70 000 Pa et entre 0 ml et 50 ml de gaz produit.

Appendice 3

Exemple d'une courbe de dégradation (accroissement net cumulé de la pression en fonction de la durée exprimée en jours)



Appendice 4

Exemple de tableau de résultats pour l'essai de biodégradation anaérobie — Tableau pour la substance d'essai

Laboratoire: Substance d'essai: Essai n°:
 Température de l'essai (°C): Volume de l'espace libre (V_h): (l) Volume du liquide (V_l): (litres)
 Carbone dans la substance d'essai $C_{c,v}$: (mg/l) m_v (¹): (mg)

Jour	p_1 (essai) (mbar)	p_2 (essai) (mbar)	p_3 (essai) (mbar)	p (essai) moyenne (mbar)	p_4 (blanc) (mbar)	p_5 (blanc) (mbar)	p_6 (blanc) (mbar)	p (blanc) moyenne (mbar)	p (nette) essai — blanc moyenne (mbar)	Δp (nette) cumulée (mbar)	m_h espace libre C (²) (mg)	D_h Biodégrada- tion (³) (%)
	$C_{IC, 1}$ essai (mg)	$C_{IC, 2}$ essai (mg)	$C_{IC, 3}$ essai (mg)	C_{IC} essai moyenne (mg)	$C_{IC, 4}$ blanc (mg)	$C_{IC, 5}$ blanc (mg)	$C_{IC, 6}$ blanc (mg)	C_{IC} blanc moyenne (mg)	$C_{IC, net}$ essai — blanc moyenne (mg)	m_l liquide C (⁴) (mg)	m_t total C (⁵) (mg)	D_t Biodégrada- tion (⁶) (%)
CI (fin)												
pH (fin)												

(¹) Carbone dans le récipient d'essai, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_l$

(²) Carbone dans l'espace libre, m_h (mg) à la température d'incubation normale (35 °C): $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$

(³) Biodégradation calculée d'après le gaz présent dans l'espace libre, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$

(⁴) Carbone dans le liquide, m_l (mg): $m_l = C_{IC, net} \times V_l$

(⁵) Carbone gazéifié total, m_t (mg): $m_t = m_l + m_h$

(⁶) Biodégradation totale, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

Laboratoire: Substance de référence: Essai n°:
 Température de l'essai (°C): Volume de l'espace libre (V_h): (l) Volume du liquide (V_l): (litres):
 Carbone dans la substance de référence $C_{c,v}$ (mg/l): m_v ⁽¹⁾ (mg):

Jour	p_1 (réf.) (mbar)	p_2 (réf.) (mbar)	p_3 (réf.) (mbar)	p (réf.) moyenne (mbar)	p_4 (inhib.) (mbar)	p_5 (inhib.) (mbar)	p_6 (inhib.) (mbar)	p (inhib.) moyenne (mbar)	p (réf.) réf. — blanc (mbar)	Δp (réf.) cumulée (mbar)	m_h espace libre C ⁽²⁾ (mg)	D_h Biodégrada- tion ⁽³⁾ (%)
	$C_{IC, 1}$ réf. (mg)	$C_{IC, 2}$ réf. (mg)	$C_{IC, 3}$ réf. (mg)	C_{IC} réf. moyenne (mg)	$C_{IC, 4}$ inhib. (mg)	$C_{IC, 5}$ inhib. (mg)	$C_{IC, 6}$ inhib. (mg)	C_{IC} inhib. moyenne (mg)	$C_{IC, net}$ réf. — in- hib. (mg)	m_l liquide C ⁽⁴⁾ (mg)	m_t total C ⁽⁵⁾ (mg)	D_t Biodégrada- tion ⁽⁶⁾ (%)
CI (fin)												
pH (fin)												

⁽¹⁾ Carbone dans le récipient d'essai, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_l$

⁽²⁾ Carbone dans l'espace libre, m_h (mg) à la température d'incubation normale (35 °C): $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$

⁽³⁾ Biodégradation calculée d'après le gaz présent dans l'espace libre, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$

⁽⁴⁾ Carbone dans le liquide, m_l (mg): $m_l = C_{IC, net} \times V_l$

⁽⁵⁾ Carbone gazéifié total, m_t (mg): $m_t = m_l + m_h$

⁽⁶⁾ Biodégradation totale, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

C.44. LIXIVIATION SUR DES COLONNES DE SOL**INTRODUCTION**

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 312(2004) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les produits chimiques de synthèse peuvent atteindre le sol directement, à la suite d'une application intentionnelle (produits agrochimiques, par exemple) ou indirectement (par exemple: véhiculés par les eaux usées → boues d'épuration → sol ou air → dépôts secs/humides). Pour évaluer les risques associés à ces substances, il est important d'estimer leur potentiel de transformation dans le sol et de migration (lixiviation) vers les couches plus profondes du sol jusqu'aux eaux souterraines.
2. Il existe plusieurs méthodes pour mesurer le potentiel de lixiviation des produits chimiques dans le sol dans des conditions contrôlées en laboratoire: la chromatographie en couche mince de sol, la chromatographie en couche épaisse de sol, la chromatographie sur colonne de sol et les mesures d'adsorption-désorption (1)(2). S'agissant des substances chimiques non ionisées, le coefficient de partage n-octanol/eau (P_{oc}) fournit une première évaluation de leurs potentiels d'adsorption et de lixiviation (3)(4)(5).
3. La méthode décrite dans la présente méthode d'essai fait appel à la chromatographie sur colonne de sol avec un sol dérangé (voir la définition à l'Appendice 1). Deux types d'expériences sont conduits pour déterminer i) le potentiel de lixiviation de la substance chimique d'essai et ii) le potentiel de lixiviation des produits de transformation (étude avec des résidus de sol incubé, aussi appelés résidus "âgés"), sur sols, dans des conditions contrôlées en laboratoire ⁽¹⁾. La méthode d'essai s'appuie sur des méthodes existantes (6)(7)(8)(9)(10)(11).
4. Un atelier de l'OCDE sur la sélection des sols et des sédiments, tenu à Belgirate (Italie) en 1995 (12) a défini le nombre et les types de sols à utiliser dans cet essai. Il a également émis des recommandations concernant le prélèvement, la manipulation et le stockage des échantillons de sol destinés aux essais de lixiviation.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

5. Des colonnes composées d'un matériau suffisamment inerte (par exemple: verre, acier inoxydable, aluminium, Téflon, PVC, etc.) sont remplies de sol, puis saturées et équilibrées avec une solution de "pluie artificielle" (voir la définition à l'Appendice 1), et on les laisse s'égoutter. Ensuite, la surface de chaque colonne de sol est traitée avec la substance d'essai et/ou des résidus "âgés" de la substance chimique d'essai. Après quoi, on arrose les colonnes de sol avec la pluie artificielle et on recueille le lixiviat. Après la lixiviation, le sol est extrait des colonnes et sectionné en un nombre de segments déterminé en fonction des informations à tirer de l'étude. La substance d'essai présente dans chaque segment de sol et dans le lixiviat est analysée, de même que les produits de transformation ou d'autres substances intéressantes, le cas échéant.

APPLICABILITÉ DE LA MÉTHODE D'ESSAI

6. La méthode s'applique aux substances chimiques d'essai (non marquées ou radiomarquées, par exemple au ^{14}C), pour lesquelles il existe une méthode d'analyse suffisamment précise et sensible. L'essai ne convient pas aux substances volatiles dans le sol et l'eau, qui ne resteraient donc pas dans le sol et/ou le lixiviat dans les conditions expérimentales de cet essai.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE CHIMIQUE D'ESSAI

7. Des substances chimiques non marquées ou radiomarquées peuvent être utilisées pour mesurer le comportement de lixiviation dans des colonnes de sol. L'étude de la lixiviation des produits de transformation (résidus "âgés" de la substance chimique d'essai) et les déterminations du bilan massique exigent des substances radiomarquées. Le marquage au ^{14}C est recommandé, mais d'autres isotopes, tels que ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P , peuvent également être utiles. Dans toute la mesure du possible, le marqueur devra être porté par le ou les fragments les plus stables de la molécule. La pureté de la substance chimique d'essai atteindra au moins 95 %.
8. La plupart des substances chimiques sont à appliquer sous forme isolée. Cependant, les substances actives des produits phytosanitaires peuvent être testées sous forme de préparation pour l'étude de la lixiviation de la substance parente, mais leur mise à l'essai sous forme isolée est fortement conseillée si le mélange risque d'affecter la vitesse de libération dans l'environnement (par exemple, préparations granulaires ou à libération régulée). Pour ce qui est d'adapter la conception de l'essai aux mélanges, il peut être utile de consulter les autorités réglementaires avant de conduire l'essai. Les études de lixiviation sur des résidus de sol incubé doivent être menées avec le composé parent à l'état pur.

⁽¹⁾ Les études de lixiviation sur colonne menées sur des produits phytosanitaires peuvent fournir des informations sur la mobilité de la substance d'essai et de ses produits de transformation et compléter les études de sorption.

9. Il est préférable de connaître les informations suivantes avant de procéder aux essais de lixiviation sur des colonnes de sol:
- (1) solubilité dans l'eau [méthode d'essai A.6] (13);
 - (2) solubilité dans les solvants organiques;
 - (3) pression de vapeur [méthode d'essai A.4] (13) et constante de Henry;
 - (4) coefficient de partage n-octanol/eau [méthodes d'essai A.8 et A.24] (13);
 - (5) coefficient d'adsorption (K_d , K_f ou K_{oc}) [méthodes d'essai C.18 et/ou C.19] (13);
 - (6) hydrolyse [méthode d'essai C.7] (13);
 - (7) constante de dissociation (pK_a) [Ligne directrice 112 de l'OCDE] (25);
 - (8) transformation aérobie et anaérobie dans le sol [méthode d'essai C.23] (13);
- Remarque:* la température à laquelle ces mesures ont été effectuées doit être mentionnée dans les rapports d'essai respectifs.
10. Il convient d'appliquer suffisamment de substance chimique d'essai sur les colonnes de sol pour pouvoir détecter au moins 0,5 % de la dose appliquée dans n'importe quel segment. S'agissant des substances chimiques actives des produits phytosanitaires, la quantité de substance d'essai appliquée doit correspondre à la dose maximale recommandée (application unique).
11. Il faut disposer d'une méthode analytique dont l'exactitude, la précision et la sensibilité sont connues pour quantifier la substance chimique d'essai et, le cas échéant, ses produits de transformation dans le sol et le lixiviat. Il faut également connaître le seuil de détection de la méthode d'analyse pour la substance d'essai et ses produits de transformation importants (normalement au moins tous les produits de transformation dont la concentration est ≥ 10 % de la dose appliquée, observés dans les études du chemin réactionnel, mais de préférence tous les produits de transformation présentant un intérêt) (voir paragraphe 17).

SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

12. Il y a lieu d'employer des substances chimiques de référence dont le comportement de lixiviation est connu, tels que l'atrazine ou le monuron, qui peuvent être considérées comme des substances modérément sujettes à la lixiviation sur le terrain, pour évaluer la mobilité relative de la substance chimique d'essai dans le sol (1)(8)(11). Il pourrait également être utile d'utiliser une substance de référence polaire, non dégradable et non sorbante (tritium, bromure, fluorescéine, éosine, par exemple), pour suivre le mouvement de l'eau dans la colonne, afin de confirmer les propriétés hydrodynamiques de la colonne de sol.
13. Des substances analytiques étalon pourraient aussi être utiles pour caractériser et/ou identifier les produits de transformation mis en évidence dans les segments de sol et dans les lixiviats, par chromatographie, spectroscopie ou par d'autres méthodes adéquates.

DÉFINITIONS ET UNITÉS

14. Voir l'Appendice 1.

CRITÈRES DE QUALITÉ

Récupération

15. La récupération à l'issue d'un essai de lixiviation équivaut à la somme des pourcentages de la substance chimique d'essai relevés après lixiviation dans les segments de sol et dans le lixiviat de la colonne. Le taux de récupération devrait varier entre 90 % et 110 % pour les substances chimiques radiomarquées (11) et entre 70 % et 110 % pour les substances chimiques non marquées (8).

Répétabilité et sensibilité de la méthode analytique

16. La répétabilité de la méthode d'analyse pour ce qui est de quantifier la substance chimique d'essai et les produits de transformation peut être vérifiée par une double analyse du même extrait d'un segment de sol ou du lixiviat (voir paragraphe 11).

17. Le seuil de détection de la méthode d'analyse pour la substance chimique d'essai et les produits de transformation devrait atteindre au moins $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ dans chaque segment de sol ou dans le lixiviat (en substance chimique d'essai) ou 0,5 % de la dose appliquée dans n'importe quel segment, selon celui des deux seuils qui est le plus bas. Le seuil de quantification doit aussi être spécifié.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

Système expérimental

18. Pour l'essai, les colonnes de lixiviation (sectionnables ou non) se composent d'un matériau suffisamment inerte (verre, acier inoxydable, aluminium, Téflon, PVC, etc.), présentent un diamètre interne d'au moins 4 cm et mesurent au moins 35 cm de haut. On s'assurera que la substance chimique d'essai et/ou ses produits de transformation n'interagissent pas avec les matériaux de la colonne. L'Appendice 2 donne des exemples de colonnes sectionnables et non sectionnables appropriées.
19. Le remplissage et le tassement du sol dans les colonnes requièrent une cuillère, un piston et un appareil à vibrations.
20. L'arrosage des colonnes de sol par la pluie artificielle peut s'effectuer à l'aide d'un piston, d'une pompe péristaltique, de pommes de douche, de flacons de Mariotte ou d'un simple entonnoir stilligoutte.

Matériel de laboratoire et produits

21. Cet essai nécessite du matériel courant de laboratoire, et en particulier:
- (1) instruments d'analyse, tels que ceux permettant d'effectuer une chromatographie gaz-liquide, une chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) ou une chromatographie en couche mince, couplés à des systèmes de détection appropriés pour analyser les substances chimiques marquées ou non, ou une méthode de dilution isotopique inverse;
 - (2) instruments d'identification (par exemple par spectrométrie de masse, spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide à haute performance, résonance magnétique nucléaire, etc.);
 - (3) compteur à scintillation liquide pour la substance chimique d'essai radiomarkée;
 - (4) dispositif d'oxydation pour la combustion des substances chimiques marquées;
 - (5) appareil d'extraction (par exemple: tubes à centrifuger pour l'extraction à froid et appareil à reflux de Soxhlet pour l'extraction continue);
 - (6) appareils pour concentrer les solutions et les extraits (par exemple, évaporateur rotatif).
22. Les substances chimiques utilisées incluent des solvants organiques de qualité pour analyse, tels que l'acétone, le méthanol, etc.; compteur à scintillation liquide; une solution 0,01 M de CaCl_2 dans de l'eau distillée ou désionisée (= pluie artificielle).

Substance chimique d'essai

23. Pour appliquer la substance chimique d'essai sur la colonne de sol, il faut la dissoudre dans de l'eau (désionisée ou distillée). Si la substance d'essai est peu soluble dans l'eau, elle peut être appliquée sous forme de préparation (si nécessaire, après suspension ou émulsion dans l'eau) ou dans un solvant organique quelconque. Le cas échéant, le volume du solvant organique sera réduit au minimum et devra être évaporé de la surface de la colonne de sol avant le début de la lixiviation. Les préparations solides, telles que les granulés, sont à appliquer à l'état solide sans eau; pour que la substance se répartisse mieux à la surface de la colonne de sol, la préparation peut être mélangée à une petite quantité de sable quartzique (1 g, par exemple), avant d'être appliquée.
24. Il convient d'appliquer suffisamment de substance chimique d'essai sur les colonnes de sol pour pouvoir détecter au moins 0,5 % de la dose appliquée dans n'importe quel segment. Dans le cas des substances actives des produits phytosanitaires, la quantité de substance d'essai peut correspondre à la dose maximale recommandée (application unique) et, qu'il s'agisse du composé parent ou des résidus "âgés", elle doit être proportionnelle à la superficie de la colonne de sol utilisée ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ La quantité à appliquer dans la colonne de sol cylindrique peut être calculée à l'aide de la formule suivante:

$$M [\mu\text{g}] = \frac{A [\text{kg}/\text{ha}] \cdot 10^9 [\mu\text{g}/\text{kg}] \cdot d^2 [\text{cm}^2] \cdot \pi}{10^8 [\text{cm}^2/\text{ha}] \cdot 4}$$

où:

M = quantité appliquée par colonne [μg]

A = densité d'application [$\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$]

d = diamètre de la colonne de sol [cm]

π = 3,14

Substance chimique de référence

25. Les essais de lixiviation devraient comporter une substance chimique de référence (voir paragraphe 12). Elle devrait être appliquée sur la colonne de sol de la même manière que la substance d'essai et à une dose permettant de la détecter correctement, soit comme étalon interne appliqué avec la substance d'essai dans la même colonne, soit isolément dans une colonne de sol séparée. Il est préférable d'appliquer les deux substances chimiques sur la même colonne, sauf si les deux substances sont marquées de la même façon.

Sols

Sélection des sols

26. Pour les études de lixiviation conduites sur le composé parent, il convient d'utiliser 3 à 4 sols différant par le pH, la teneur en carbone organique et la texture (12). Le tableau 1 ci-dessous fournit des orientations quant à la sélection des sols destinés aux essais de lixiviation. Si la substance chimique d'essai est ionisable, on sélectionne des sols couvrant une vaste gamme de pH, de façon à pouvoir évaluer la mobilité de la substance sous ses formes ionisée et non ionisée; au moins 3 sols doivent avoir un pH auquel la substance d'essai se trouve à l'état mobile.

Tableau 1

Orientations pour la sélection des sols destinés aux études de lixiviation

Sol n°	pH	Carbone organique %	Teneur en argile %	Texture (*)
1	> 7,5	3,5 - 5,0	20 - 40	Terre franche argileuse
2	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 - 25	Terre franche limo- neuse
3	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 - 30	Terre franche
4	< 4,0 - 6,0 §	< 0,5 - 1,5 § ‡	< 10 - 15 §	Sable gras
5	< 4,5	> 10 #	< 10	Sable gras/sable

(*) D'après les systèmes de la FAO et du Département de l'agriculture des États-Unis (14)

§ Les variables respectives doivent, de préférence, se situer dans la gamme indiquée. Toutefois, s'il s'avère difficile de trouver le sol adéquat, des valeurs inférieures au minimum spécifié sont acceptées.

‡ Les sols renfermant moins de 0,3 % de carbone organique risquent de perturber la corrélation entre la teneur en matière organique et l'adsorption. C'est pourquoi on recommande d'utiliser des sols renfermant au moins 0,3 % de carbone organique.

Les sols à teneur très élevée en carbone (>10 %, par exemple) risquent d'être refusés dans le contexte réglementaire (pour l'homologation des pesticides, par exemple).

27. Il peut parfois s'avérer nécessaire d'utiliser d'autres types de sol pour représenter les régions plus froides, tempérées et tropicales. Aussi, si l'on opte pour d'autres types de sols, ceux-ci devront être caractérisés par les mêmes paramètres et la même variation de propriétés que les sols décrits dans les orientations pour la sélection des sols destinés aux études de lixiviation (voir Tableau 1 ci-dessus), même s'ils ne satisfont pas exactement aux critères.
28. Les études de lixiviation sur des résidus de sol incubé sont menées sur un seul sol (12). Ce dernier doit avoir une proportion de sable >70 % et une teneur en carbone organique comprise entre 0,5 % et 1,5 % (par exemple le sol n° 4 du Tableau 1). L'utilisation de davantage de types de sols peut être nécessaire si les données sur les produits de transformation sont importantes.

29. Tous les sols doivent être caractérisés, au moins quant à la texture [% de sable, % de limon, % d'argile, selon les systèmes de classification de la FAO et du Département de l'agriculture des États-Unis], au pH, à la capacité d'échange cationique, à la teneur en carbone organique, à la densité en vrac (pour les sols dérangés) et à la capacité de rétention d'eau. La mesure de la biomasse microbienne n'est requise que pour le sol utilisé durant la période d'incubation/vieillessement précédant l'essai sur des résidus de sol incubé. Des informations supplémentaires sur les propriétés du sol (classification du sol, minéralogie de l'argile, superficie spécifique, par exemple) peuvent être utiles à l'interprétation des résultats de cette étude. S'agissant de déterminer les caractéristiques du sol, les méthodes recommandées dans les références peuvent être appliquées.

Collecte et stockage des sols

30. Les sols doivent être prélevés dans la couche superficielle (horizon A) jusqu'à une profondeur maximale de 20 cm et nettoyés de tous leurs résidus de végétation, de macrofaune et de pierres. Les sols (à l'exception des sols utilisés pour incuber la substance chimique d'essai) sont séchés à l'air, à température ambiante (de préférence entre 20 °C et 25 °C). La désagrégation s'effectue avec une force minimale, de façon à dénaturer le moins possible la texture originale du sol. Les sols sont passés au travers d'un tamis pourvu de mailles ≤ 2 mm. Il est recommandé de les homogénéiser soigneusement, afin d'accroître la reproductibilité des résultats. Avant leur utilisation, les sols peuvent être entreposés à température ambiante et conservés séchés (à l'air) (12). Aucune durée limite de stockage n'est recommandée, mais il faudrait vérifier à nouveau la teneur en carbone organique et le pH des sols entreposés depuis plus de trois ans, avant de les utiliser.
31. L'historique des sites extérieurs où les sols d'essai ont été collectés devrait être connu en détail. Ces détails incluent la localisation exacte [définie exactement par la projection MTU (Mercator Transverse Universel/Données Horizontales Européennes) ou par ses coordonnées géographiques], le couvert végétal, les traitements par des produits phytosanitaires, les traitements avec des engrais minéraux et organiques, les ajouts de matières biologiques ou toute contamination accidentelle (12). Les sols traités avec la substance chimique d'essai ou ses analogues de structure au cours des quatre dernières années ne peuvent servir aux études de lixiviation.

Conditions expérimentales

32. Durant l'essai, les colonnes de sol destinées à la lixiviation doivent être gardées à l'obscurité et à température ambiante, à condition qu'il soit possible de limiter la variation de cette température à ± 2 °C. Les températures recommandées se situent entre 18 °C et 25 °C.
33. La pluie artificielle (CaCl_2 , 0,01 M) est appliquée en continu à la surface des colonnes de sol, à raison de 200 mm par période de 48 heures ⁽¹⁾; cette valeur s'obtient par l'application de 251 ml sur une colonne dont le diamètre intérieur mesure 4 cm. Si la finalité de l'essai l'exige, d'autres volumes de pluie artificielle déversés sur des périodes plus longues pourront être appliqués en plus.

Réalisation de l'essai

Lixiviation de la substance chimique d'essai parente

34. Au moins deux colonnes de lixiviation sont remplies avec un sol non traité, séché à l'air et tamisé (< 2 mm), jusqu'à une hauteur d'environ 30 cm. Pour que le sol soit homogène dans les colonnes, il y est introduit par petites quantités à la cuillère, puis pressé par un piston tout en soumettant simultanément la colonne à de petites vibrations, jusqu'à ce que le sommet de la colonne du sol ne s'enfonce plus. La reproductibilité des résultats obtenus avec les colonnes de lixiviation est subordonnée à la répartition uniforme du sol dans les colonnes. Les références (20)(21) et (22) fournissent des détails sur les techniques de remplissage des colonnes. Afin de contrôler la reproductibilité du procédé de remplissage, on détermine le poids total du sol tassé dans les colonnes ⁽²⁾; les poids des colonnes destinées à une expérience identique doivent être similaires.

⁽¹⁾ Cette valeur correspond à une pluviométrie très élevée. En Europe centrale, par exemple, la pluviométrie annuelle moyenne se chiffre à quelque 800-1 000 mm.

⁽²⁾ Voici quelques exemples de densités en vrac pour des sols dérangés: sol sableux: $1,66 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$
sol à sable gras: $1,58 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$
terre franche: $1,17 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$
sol limoneux: $1,11 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$

35. Une fois remplies, les colonnes de sol sont préalablement mouillées avec la pluie artificielle (CaCl_2 à 0,01 M), de bas en haut, de façon que l'eau chasse l'air retenu dans les pores du sol. Après quoi, on laisse les colonnes s'équilibrer et l'excès d'eau s'égoutter par gravité. La référence (23) présente diverses méthodes de saturation des colonnes.
36. Ensuite, la substance chimique d'essai et/ou la substance chimique de référence sont appliquées sur les colonnes de sol (voir aussi les paragraphes 23-25). Pour obtenir une répartition homogène, les solutions, suspensions ou émulsions de la substance chimique d'essai et/ou de référence sont appliquées uniformément à la surface des colonnes de sol. Si le mode d'application recommandé pour la substance chimique d'essai est l'incorporation dans le sol, la substance doit être mélangée à un petit volume de sol (20 g, par exemple) et ajoutée à la surface de la colonne de sol.
37. On couvre ensuite les surfaces des colonnes de sol avec un disque en verre fritté, des perles de verre, un filtre en fibre de verre ou un papier filtre rond, afin que la pluie artificielle se répartisse uniformément sur toute la surface et d'éviter que les gouttes de pluie ne dérangent la surface du sol. L'arrosage des colonnes de sol par la pluie artificielle sera effectué avec d'autant plus de soin que le diamètre de ces colonnes est grand, de manière à ce que la pluie artificielle se répartisse uniformément à la surface du sol. Après quoi, la pluie artificielle est déversée goutte à goutte sur les colonnes de sol, à l'aide d'un piston ou d'une pompe péristaltique ou d'un entonnoir stilligoutte. Il est préférable de recueillir les lixiviats par fractions et de noter leurs volumes respectifs ⁽¹⁾.
38. À la fin de la lixiviation, on laisse les colonnes de sol s'égoutter avant de les sectionner en un nombre approprié de segments, selon les renseignements à tirer de l'étude. La substance d'essai est extraite à l'aide d'un solvant approprié ou d'un mélange de solvants, puis analysée, de même que, le cas échéant, les produits de transformation, la radioactivité totale et la substance de référence. Les mêmes produits sont analysés directement, ou après extraction, dans les lixiviats ou les fractions de lixiviats. Si la substance chimique d'essai est radiomarquée, toutes les fractions renfermant au moins 10 % de la radioactivité appliquée doivent être identifiées.

Lixiviation des résidus de sol incubé

39. Un sol frais (non séché préalablement à l'air) est traité avec la substance chimique d'essai radiomarquée à une dose proportionnelle à la superficie des colonnes de sol (voir paragraphe 24) et incubé en aérobiose conformément à la méthode d'essai C.23 (13). La période d'incubation (vieillessement) doit être suffisamment longue pour autoriser la formation d'une quantité appréciable de produits de transformation; on recommande une période d'incubation équivalente à la demi-vie de la substance chimique d'essai ⁽²⁾, mais cette période ne doit pas dépasser 120 jours. Avant la lixiviation, la substance chimique d'essai et ses produits de transformation présents dans le sol incubé sont analysés.
40. Les colonnes de lixiviation sont remplies jusqu'à une hauteur de 28 cm avec le même sol (mais séché à l'air) que celui utilisé pour l'incubation du sol, conformément aux instructions du paragraphe 34 et le poids total des colonnes de sol remplies est également déterminé. Les colonnes de sol sont ensuite mouillées préalablement, comme décrit au paragraphe 35.
41. Puis, la substance chimique d'essai et ses produits de transformation sont appliqués à la surface des colonnes de sol sous la forme de résidus du sol incubé (voir paragraphe 39) en un segment de sol de 2 cm de haut. Il est préférable que la hauteur totale des colonnes de sol (sol non traité + sol incubé) n'excède pas 30 cm (voir paragraphe 34).
42. La lixiviation est conduite selon les instructions données au paragraphe 37.
43. Après la lixiviation, la substance chimique d'essai, ses produits de transformation et la radioactivité non extraite sont analysés dans les segments de sol et les lixiviats, comme indiqué au paragraphe 38. Afin de déterminer la proportion de résidus de sol incubé restant dans la couche supérieure de 2 cm après lixiviation, on doit analyser ce segment séparément.

⁽¹⁾ Le volume des lixiviats atteint généralement 230 à 260 ml, soit environ 92-104 % du volume total de pluie artificielle versé (251 ml), avec des colonnes de sol de 4 cm de diamètre et de 30 cm de hauteur.

⁽²⁾ Plus d'un produit de transformation important est susceptible de se former dans le sol et ces produits peuvent aussi apparaître à différents moments de l'étude de transformation. Dans ce cas, il peut être nécessaire de conduire des études de lixiviation sur des résidus incubés d'âges différents.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

44. Les quantités de substance chimique d'essai, de produits de transformation, de fractions non extractibles et, le cas échéant, de la substance chimique de référence, doivent être établies en pourcentage de la dose initiale appliquée, pour chaque segment de sol et fraction de lixiviat. Pour chaque colonne, on tracera une représentation graphique des pourcentages en fonction des profondeurs de sol.
45. Lorsque ces études de lixiviation sur colonne incluent une substance chimique de référence, la lixiviation d'une substance chimique peut être évaluée sur une échelle relative, à l'aide des facteurs de mobilité relative (FMR; voir la définition à l'Appendice 3) (1)(11), ce qui permet de comparer les résultats de la lixiviation de différentes substances chimiques dans différents types de sols. L'Appendice 3 fournit des exemples de valeurs de FMR pour différents produits phytosanitaires.
46. Les estimations du K_{co} (coefficient d'adsorption normalisé du carbone organique) et du K_{mo} (coefficient de répartition normalisé de la matière organique) peuvent aussi être déduites des résultats de la lixiviation sur colonne, d'après la distance moyenne de lixiviation ou les corrélations établies entre le FMR et K_{mo} ou K_{co} respectivement (4), ou par l'application d'une théorie chromatographique simple (24). Toutefois, la dernière méthode doit être utilisée avec prudence, surtout si l'on considère que le processus de lixiviation n'obéit pas entièrement à un régime d'écoulement saturé, mais plutôt à un régime non saturé.

Interprétation des résultats

47. Les études de lixiviation sur colonne décrites dans la présente méthode permettent de déterminer le potentiel de lixiviation ou de mobilité de la substance chimique d'essai dans le sol (dans l'étude de lixiviation sur le composé parent) et/ou de ses produits de transformation (dans l'étude de lixiviation sur les résidus de sol incubé). Ces essais ne permettent pas de quantifier la lixiviation des substances chimiques d'essai sur le terrain, mais peuvent être utilisés pour comparer la lixiviableté d'une substance chimique avec d'autres dont le comportement de lixiviation est connu (24). De la même manière, ces essais ne mesurent pas quantitativement le pourcentage de substance chimique appliquée susceptible d'atteindre les eaux souterraines (11). Néanmoins, les résultats des études de lixiviation sur colonne peuvent orienter la décision de conduire ou non des essais supplémentaires sur le terrain ou en partie sur le terrain pour les substances qui présentent un potentiel de mobilité élevé lors des essais en laboratoire.

Rapport d'essai

48. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes:

Substance chimique d'essai et substance chimique de référence (le cas échéant):

- nom courant, nom chimique (nomenclature IUPAC et CAS), numéro CAS, structure chimique (indiquant la position du marqueur si une substance radiomarquée est utilisée) et propriétés physico-chimiques pertinentes;
- pureté (impuretés) de la substance chimique d'essai;
- pureté radiochimique de la substance chimique marquée et activité spécifique, le cas échéant.

Sols d'essai:

- détails relatifs au site de prélèvement;
- propriétés des sols, telles que le pH, la teneur en carbone organique et en argile, la texture et la densité en vrac (pour les sols dérangés);
- activité microbienne du sol (seulement pour le sol utilisé pour incubier/vieillir la substance chimique d'essai);
- durée et conditions du stockage du sol.

Conditions expérimentales:

- dates de la réalisation des études;
- longueur et diamètre des colonnes de lixiviation;
- poids total du sol contenu dans les colonnes de sol;
- quantité de substance chimique d'essai et, s'il y a lieu, de substance chimique de référence appliquée;

- volume, fréquence et durée de l'application de la pluie artificielle;
- température du dispositif expérimental;
- nombre d'expériences identiques (au moins deux);
- méthodes d'analyse de la substance chimique d'essai, des produits de transformation et, le cas échéant, de la substance chimique de référence dans les différents segments de sol et les lixiviats;
- méthodes de caractérisation et d'identification des produits de transformation dans les segments de sol et les lixiviats.

Résultats de l'essai:

- tableaux de résultats exprimés en concentrations et en % de la dose appliquée pour les segments de sol et les lixiviats;
- bilan massique, s'il y a lieu;
- volumes des lixiviats;
- distances de lixiviation et, s'il y a lieu, facteurs de mobilité relative;
- tracé du % détecté dans les segments de sol en fonction de la profondeur des segments de sol;
- analyse et interprétation des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental models for studying the persistence of pesticides in soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.
- (2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals — T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.
- (3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.
- (4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.
- (5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.
- (6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (7) Agriculture Canada (1987). Guide d'homologation des pesticides au Canada: chimie et devenir dans l'environnement.
- (8) Annexe I de la directive 95/36/CE de la Commission, du 14 juillet 1995, modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques, JO L 172 du 22.7.1995, p.8.
- (9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.
- (11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgrate, Italy 18-20 January 1995.

(13) Chapitres suivants de la présente annexe:

Chapitre A.4, pression de vapeur

Chapitre A.6, solubilité dans l'eau

Chapitre A.8, coefficient de partage, méthode par agitation en flacon

Chapitre A.24, coefficient de partage, méthode HPLC

Chapitre C.7, dégradation — dégradation abiotique: hydrolyse en fonction du pH

Chapitre C.18, détermination de l'adsorption/désorption au moyen de la méthode par agitation

Chapitre C.23, transformation aérobie et anaérobie dans le sol

(14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

(15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D. R. Keeney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(17) Compendium de normes ISO Environnement (1994). Qualité du sol — Aspects généraux; méthodes d'analyse chimiques et physiques; méthodes d'analyse biologiques. Première édition.

(18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

(19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.

(21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.

(22) Oliveira et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 60 (1). 49-53.

(23) Shackelford, C.D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. — A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177-217.

(24) Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds.), 115-133. Plenum Press, New York

(25) OCDE (1981). Constantes de dissociation dans l'eau. Ligne directrice n° 112 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris

Appendice 1

Définitions et unités

Résidus de sol incubé (ou résidus “âgés”): substance chimique d'essai et produits de transformation présents dans le sol au terme d'une période suffisamment longue après l'application pour permettre aux processus de transport, d'adsorption, métaboliques et dissipatifs de modifier la répartition et la nature chimique d'une partie de la substance chimique appliquée (1).

Pluie artificielle: solution de CaCl_2 à 0,01 M dans de l'eau distillée ou désionisée.

Distance moyenne de lixiviation: fond d'une section de sol où les différentes fractions de substance chimique récupérées jusque-là totalisent 50 % de la substance chimique d'essai récupérée totale [essai de lixiviation normal], ou (fond d'une section de sol où les différentes fractions de substance chimique récupérées jusque-là totalisent 50 % de la substance chimique d'essai récupérée totale) — [(épaisseur de la couche de sol incubé)/2] [essai de lixiviation des résidus de sol incubé].

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Lixiviat: phase aqueuse ayant percolé à travers un profil de sol ou une colonne de sol (1).

Lixiviation: processus par lequel une substance chimique migre vers le bas à travers un profil de sol ou une colonne de sol (1).

Distance de lixiviation: distance du segment de sol le plus profond dans lequel on retrouve au moins 0,5 % de la substance chimique d'essai appliquée ou du résidu de sol incubé, après la lixiviation (équivalent à la profondeur de pénétration).

Seuil de détection et seuil de quantification: le seuil de détection est la concentration d'une substance chimique en dessous de laquelle il n'est plus possible de distinguer l'identité de la substance des artefacts de la technique d'analyse. Le seuil de quantification est la concentration d'une substance en dessous de laquelle la concentration ne peut être déterminée avec une précision acceptable.

Facteur de mobilité relative (FMR): [distance de lixiviation de la substance d'essai (cm)]/[distance de lixiviation de la substance de référence (cm)].

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Produit de transformation: toutes les substances engendrées par des réactions de transformation biotiques ou abiotiques de la substance d'essai, y compris le CO_2 et les produits liés aux résidus.

Sol: mélange de composants chimiques minéraux et organiques, ces derniers contenant des composés fortement carbonacés et azotés et de poids moléculaire élevé, peuplés de petits organismes (surtout des microorganismes). Le sol peut être mis à l'essai sous deux états:

- non dérangé, tel qu'il s'est constitué au fil du temps, avec des couches caractéristiques de divers types de sols;
- dérangé, comme on le trouve généralement dans les champs cultivés ou du fait que des échantillons y ont été prélevés par creusement et utilisés dans la présente méthode d'essai.

(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Weeds 68, 1167-1193.

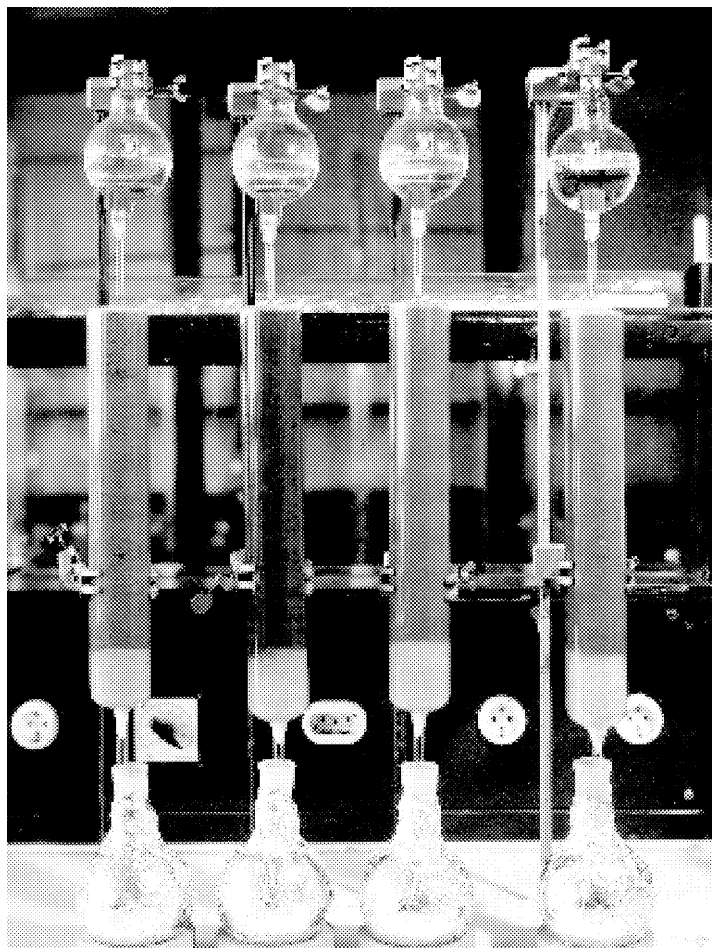
(2) Ligne directrice de l'OCDE n° 304A: Biodégradabilité intrinsèque dans le sol (adoptée le 12 mai 1981).

Appendice 2

Figure 1

Exemple de colonnes de lixiviation en verre non sectionnables, de 35 cm de longueur et d'un diamètre interne de 5 cm (1)

(1)



← Entonnoirs stilligouttes pour l'application de la pluie artificielle

← Disque en verre fritté pour protéger la surface du sol des dérangements et assurer une répartition uniforme de la pluie artificielle.

← Colonne en verre remplie de sol d'essai (si la substance d'essai est photolabile, la colonne devra être emballée dans du papier aluminium)

← Couche de sable quartzique

← Tampon de laine de verre pour retenir le sol dans la colonne

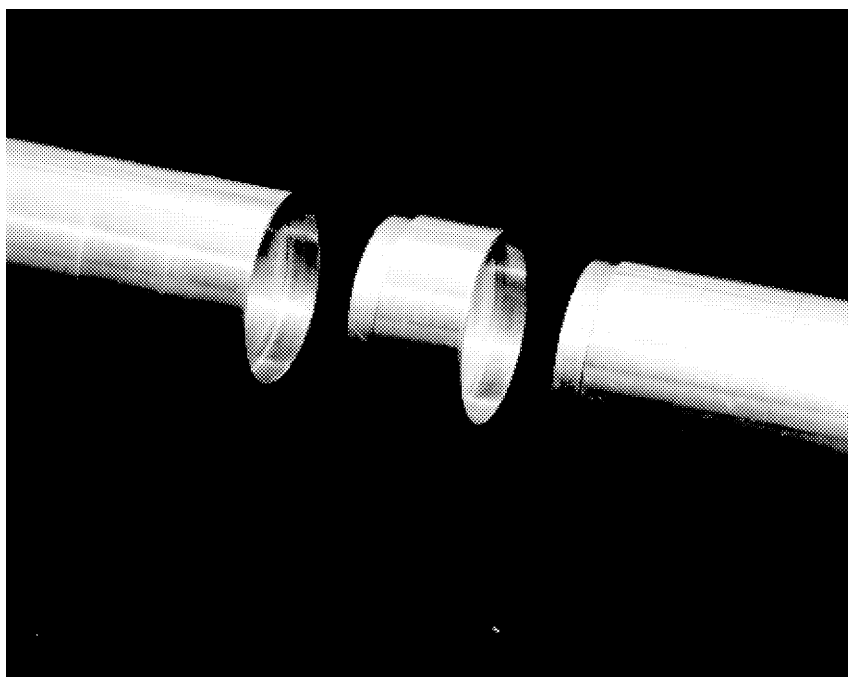
← Ballon destiné à recueillir le lixiviat, emballé dans du papier aluminium afin d'empêcher la photolyse.

Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden — 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

Figure 2

Exemple de colonne sectionnable en métal de 4 cm de diamètre intérieur (1)

(1)



Burkhard, N., Eberle, D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides.

Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

—

Appendice 3

Exemples de facteurs de mobilité relative (*) (FMR) de différents produits phytosanitaires (1)(2) et classes de mobilité correspondantes +

Gamme de FMR	Substance chimique (FMR)	Classe de mobilité
≤ 0,15	Parathion (< 0,15), Flurodifén (0,15)	I immobile
0,15 - 0,8	Profenophos (0,18), Propiconazole (0,23), Diazinon (0,28), Diuron (0,38), Terbutylazine (0,52), Methidathion (0,56), Prometryn (0,59), Propazine (0,64), Alachlor (0,66), Metolachlor (0,68)	II légèrement mobile
0,8 - 1,3	Monuron (**) (1,00), Atrazine (1,03), Simazine (1,04), Fluometuron (1,18)	III modérément mobile
1,3 - 2,5	Prometon (1,67), Cyanazine (1,85), Bromacil (1,91), Karbutilate (1,98)	IV assez mobile
2,5 - 5,0	Carbofuran (3,00), Dioxacarb (4,33)	V mobile
> 5,0	Monocrotophos (> 5,0), Dicrotophos (> 5,0)	VI très mobile

(*) Le facteur de mobilité relative se calcule comme suit (3):

$$RMF = \frac{\text{distance de lixiviation de la substance chimique d'essai (cm)}}{\text{distance de lixiviation de la substance chimique de référence (cm)}}$$

(**) Substance chimique de référence

+ D'autres systèmes de classement de la mobilité d'une substance chimique dans le sol s'appuient sur les valeurs de R_f de chromatographie en couche mince (4) et du K_{oc} (5)(6).

- (1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption In Joint International Symposium "Physicochemical Properties and their role in Environmental Hazard Assessment". Canterbury, UK, 1-3 July 1985.
- (2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr. Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.
- (3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.
- (4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.
- (5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.
- (6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

C.45. ESTIMATION DES ÉMISSIONS ISSUES DE BOIS TRAITÉ PAR UN PRODUIT DE PRÉSERVATION DANS L'ENVIRONNEMENT: MÉTHODE DE LABORATOIRE APPLICABLE AUX ARTICLES EN BOIS SANS REVÊTEMENT QUI SONT EN CONTACT AVEC DE L'EAU DOUCE OU DE L'EAU DE MER.

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 313 (2007) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les émissions dans l'environnement issues de bois traité par un produit de préservation doivent être quantifiées pour permettre une évaluation des risques pour l'environnement engendrés par le bois traité. La présente méthode d'essai décrit une méthode de laboratoire permettant d'estimer les émissions issues de bois traité par des produits de préservation dans deux cas possible d'émission dans l'environnement:
 - Les émissions issues de bois traité en contact avec de l'eau douce. Les émissions provenant de la surface du bois traité pourraient pénétrer dans l'eau.
 - Les émissions issues de bois traité en contact avec de l'eau de mer. Les émissions provenant de la surface du bois traité pourraient pénétrer dans l'eau de mer.
2. La présente méthode d'essai a pour objet l'analyse des émissions issues du bois et des articles en bois sans revêtement qui sont en contact avec de l'eau douce ou de l'eau de mer. Les classes d'emploi, utilisées au niveau international, déterminent les catégories de dangers biologiques auxquels sont exposés les articles traités. Les classes d'emploi définissent également les cas dans lesquels l'article traité est utilisé et délimitent les compartiments environnementaux (air, eau, sol) exposés à un risque du fait du bois traité par un produit de préservation.
3. La méthode d'essai est un protocole de laboratoire permettant d'obtenir des échantillons (milieu d'émission) dans l'eau utilisée pour immerger un bois traité, après des délais croissants d'exposition. La quantité d'émissions dans le milieu d'émission est corrélée à la surface spécifique du bois et à la durée de l'exposition, afin d'estimer un flux en mg/m²/jour. Le flux (taux de délavage) après des périodes d'exposition de plus en plus longues peut ainsi être estimé.
4. La quantité d'émissions peut être utilisée dans une évaluation des risques environnementaux engendrés par le bois traité.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

5. Il est vraisemblable que le mécanisme de délavage de la surface du bois par l'eau douce n'est pas de nature ni d'intensité identiques au délavage d'une surface de bois par de l'eau de mer. Par conséquent, il est nécessaire d'entreprendre une étude du délavage du bois par l'eau de mer applicable aux produits ou aux mélanges de préservation utilisés pour traiter le bois employé dans un environnement d'eau salée.
6. Dans une étude de traitement par un produit de préservation du bois, le bois doit être représentatif des matériaux utilisés dans le commerce. Il doit être traité conformément aux instructions du fabricant du produit de préservation et dans l'observation des normes et spécifications appropriées. Les paramètres du conditionnement postérieur au traitement du bois et préalables à l'essai doivent être spécifiés.
7. Les échantillons de bois employés doivent correspondre aux produits utilisés (par exemple en termes d'espèce, de densité et d'autres caractéristiques).
8. L'essai peut être appliqué au bois par un procédé de pénétration ou par application superficielle ou à un bois traité soumis ensuite à un traitement de surface imposé complémentaire (par exemple une peinture dont l'application est exigée pour un usage commercial).
9. La composition, la quantité, le pH et l'état physique de l'eau sont des facteurs qui conditionnent la détermination de la quantité, de la teneur et de la nature des émissions issues du bois.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

10. Les échantillons expérimentaux de bois traités par un produit de préservation sont immergés dans de l'eau. L'eau (milieu d'émission) est recueillie et soumise à une analyse chimique répétée à plusieurs reprises au cours de la période d'exposition, de façon à permettre l'analyse statistique. Les taux d'émission en mg/m²/jour sont calculés à partir des résultats analytiques. Les périodes de prélèvement des échantillons doivent être notées. Il est possible d'interrompre les essais sur échantillons non traités si aucune valeur de base n'a été détectée sur les trois premiers points de résultats.

11. L'inclusion dans l'étude d'échantillons de bois non traités permet la détermination des niveaux de base des produits émis par le bois autres que le produit de préservation utilisé.

CRITÈRES DE QUALITÉ

Exactitude

12. L'exactitude de la méthode d'estimation des émissions dépend de la représentativité des échantillons expérimentaux par rapport au bois traité du commerce, de la représentativité de l'eau par rapport à de l'eau réelle et de la représentativité du régime d'exposition par rapport aux conditions naturelles.
13. L'exactitude, la précision et la répétabilité de la méthode analytique doivent être déterminées avant la mise en œuvre de l'essai.

Reproductibilité

14. La valeur moyenne est calculée à partir de trois échantillons d'eau prélevés et analysés et elle est considérée comme valeur d'émission. La reproductibilité des résultats au sein d'un laboratoire et entre différents laboratoires dépend du dispositif d'immersion et du bois utilisé pour les échantillons expérimentaux.

Intervalle de résultats acceptable

15. L'intervalle de résultats de cet essai est acceptable dès lors que les valeurs supérieures et inférieures diffèrent de moins d'un ordre de grandeur.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Eau

16. Modes de délavage dans l'eau douce: il est recommandé d'utiliser de l'eau désionisée (par exemple, ASTM D 1193 Type II) dans l'essai de délavage lorsque l'on cherche à évaluer un bois exposé à de l'eau douce. La température de l'eau doit se situer à 20 °C +/- 2 °C et les mesures de pH et de température de l'eau doivent être intégrées dans le rapport d'essai. L'analyse d'échantillons de l'eau employée prélevés avant immersion des échantillons traités permet d'estimer les substances chimiques étudiées dans l'eau. Il s'agit d'un témoin permettant de déterminer les valeurs de base des substances qui seront ensuite chimiquement analysées.
17. Mode de délavage dans de l'eau de mer: Il est recommandé d'utiliser une eau de mer synthétique (par exemple, ASTM D 1141 Eau océanique substitut, sans métaux lourds) dans l'essai de délavage lorsqu'on cherche à évaluer un bois exposé à de l'eau de mer. La température de l'eau doit se situer à 20 °C +/- 2 °C et les mesures de pH et de température de l'eau doivent être intégrées dans le rapport d'essai. L'analyse d'échantillons de l'eau employée prélevés avant immersion des échantillons traités permet d'estimer les substances chimiques étudiées dans l'eau. Il s'agit là d'un témoin permettant de déterminer les valeurs de base des substances chimiques importantes.

Échantillons expérimentaux de bois

18. Pour la pleine efficacité de l'essai des produits de préservation du bois, l'espèce de bois doit être représentative des espèces habituellement utilisées. Les espèces recommandées sont *Pinus sylvestris* L. (pin sylvestre), *Pinus resinosa* Ait. (pin rouge d'Amérique), ou *Pinus spp* (pin du sud). Des tests complémentaires peuvent être effectués sur d'autres espèces.
19. Il convient d'utiliser un bois à fil droit sans nœud et d'éviter les matériaux d'apparence résineuse. Le bois doit être représentatif d'un bois disponible dans le commerce. Le bois doit être représentatif d'un bois disponible dans le commerce. La source, la densité et le nombre des cernes annuels pour 10 mm doivent être notés.
20. Il est recommandé d'utiliser les échantillons expérimentaux de bois par groupes de cinq conformément aux blocs de taille de la norme EN 113 (dimensions 25 mm × 50 mm × 15 mm) avec des faces longitudinales parallèles au fil du bois, mais on peut cependant utiliser d'autres dimensions, par exemple 50 mm sur 150 mm sur 10 mm. L'échantillon doit être complètement immergé dans l'eau. Les échantillons doivent être constitués à 100 % d'aubier. Chaque échantillon est individuellement marqué de façon à pouvoir être identifié sur toute la durée de l'essai.
21. Tous les échantillons doivent être rabotés ou sciés, sans ponçage des surfaces.

22. Les groupes d'échantillons expérimentaux de bois utilisés pour l'analyse sont au nombre d'au moins cinq: trois groupes de spécimens sont traités par le produit de préservation, un groupe n'est pas traité et un groupe est réservé à l'estimation de la teneur en humidité après séchage à l'étuve des échantillons expérimentaux avant le traitement. Le nombre d'échantillons préparés doit permettre la sélection d'au moins trois groupes d'échantillons dont la rétention du produit de préservation a une valeur égale à la moyenne, à 5 % près, de l'ensemble des échantillons expérimentaux.
23. Tous les échantillons expérimentaux sont colmatés à l'extrémité par une substance chimique qui empêche la pénétration du produit de préservation dans le fil d'extrémité ou empêche le délavage des échantillons par l'intermédiaire du fil d'extrémité. Lors de l'application de l'agent colmatant l'extrémité, il faut distinguer les échantillons recevant une application superficielle de ceux soumis à des procédés de pénétration. Cet agent ne doit être appliqué avant le traitement que dans le cas d'une application superficielle.
24. Le fil d'extrémité doit rester ouvert lors des traitements par des procédés de pénétration. Par conséquent les échantillons seront colmatés à l'extrémité après la période de conditionnement. L'émission n'est estimée que pour la surface spécifique longitudinale. Il convient d'examiner les agents colmatants et de procéder à une nouvelle application, s'il y a lieu, avant le début du délavage, mais jamais après.

Récipient d'immersion

25. Le récipient est constitué d'un matériau inerte et ses dimensions permettent de contenir 5 échantillons de bois conformes à EN 113 dans 500 ml d'eau, le rapport surface spécifique au volume d'eau étant égal à 0,4 cm²/ml.

Assemblage des échantillons dans l'essai

26. L'assemblage qui soutient les échantillons expérimentaux permet le contact de toutes les surfaces exposées de l'échantillon avec l'eau.

PROTOCOLE DU TRAITEMENT DE PRÉSERVATION

Préparation des échantillons expérimentaux traités

27. La méthode de traitement de l'échantillon expérimental de bois par le produit de préservation conformément à l'essai est celle spécifiée pour ce produit, c'est-à-dire un procédé de traitement de pénétration ou un procédé d'application superficielle, par exemple un trempage, une pulvérisation ou un badigeonnage.

Produits de préservation appliqués par un procédé de traitement par pénétration

28. On prépare une solution du produit de préservation qui permet l'absorption ou la rétention spécifiée lorsqu'on l'applique à l'aide du procédé du traitement par pénétration. L'échantillon expérimental de bois est pesé et ses dimensions sont mesurées. Le procédé de traitement de pénétration doit être un procédé spécifié pour l'application du produit de préservation au bois dans l'objectif d'une utilisation dans la classe d'emploi 4 ou 5. L'échantillon est à nouveau pesé après traitement et la rétention du produit de préservation (kg/m³) est calculée par l'équation:

$$\frac{\text{Masse après traitement (kg)} - \text{Masse avant traitement (kg)}}{\text{Volume de l'échantillon expérimental (m}^3\text{)}} \times \frac{\text{Concentration de la solution (\% masse / masse)}}{100}$$

29. Il convient de noter qu'il est possible d'utiliser dans cet essai un bois d'œuvre traité dans une usine de traitement industriel (par exemple, par imprégnation sous vide). Les protocoles employés doivent être consignés et la rétention du matériau ainsi traité doit être analysée et enregistrée.

Produit de préservation appliqué par des procédés d'application superficielle

30. Les procédés d'application superficielle comprennent le trempage, la pulvérisation ou le badigeonnage des échantillons expérimentaux de bois. Le procédé et le taux d'application (par exemple litres/m²) sont ceux spécifiés pour l'application superficielle du produit de préservation.

31. Il convient de noter que dans ce cas également du bois d'œuvre traité dans une usine de traitement industriel peut être utilisé dans l'essai. Les protocoles employés doivent être consignés et la rétention du matériau ainsi traité doit être analysée et enregistrée.

Conditionnement des échantillons expérimentaux après traitement

32. Après traitement, il faut conditionner les échantillons expérimentaux traités conformément aux recommandations dispensées par le fournisseur du produit de préservation de l'essai, et en respectant les conditions portées sur l'étiquette du produit ou en respectant les pratiques de traitement habituelles dans l'industrie ou selon la norme EN 252.

Préparation et sélection des échantillons expérimentaux

33. Après le conditionnement qui suit le traitement, la rétention moyenne du groupe d'échantillons expérimentaux est calculée et trois groupes d'échantillons représentatifs dont la rétention est égale à la moyenne à 5 % près du groupe sont sélectionnés au hasard pour procéder à des mesures de délavage.

PROTOCOLE DES MESURES D'ÉMISSION DU PRODUIT DE PRÉSERVATION

Méthode par immersion

34. Les échantillons expérimentaux sont pesés et ensuite totalement immergés dans l'eau tandis que la date et l'heure sont enregistrées. Le récipient est couvert afin de réduire l'évaporation.
35. L'eau est remplacée aux intervalles suivants: 6 heures, 1 jour, 2 jours, 4 jours, 8 jours, 15 jours, 22 jours, 29 jours (note: il s'agit là de durées totales et non des intervalles entre les prélèvements). L'heure et la date du changement de l'eau et la masse d'eau recueillie dans le récipient sont consignées.
36. Chaque fois que l'eau est remplacée, un échantillon de l'eau dans laquelle a été immergé le groupe des échantillons expérimentaux est conservé à des fins d'analyses chimiques.
37. Le protocole d'échantillonnage permet le calcul d'une courbe de quantité d'émissions en fonction du temps. Il faut conserver les échantillons dans des conditions permettant de préserver l'analyte, par exemple dans un réfrigérateur à l'obscurité, afin de limiter la croissance microbienne dans l'échantillon avant son analyse.

MESURE DES ÉMISSIONS

Échantillons traités

38. La substance active et/ou ses produits de dégradation ou de transformation appropriés, s'il y a lieu, sont chimiquement analysés dans l'eau collectée.

Échantillons non traités

39. La collecte de l'eau (milieu d'émission) dans ce système et l'analyse consécutive des substances lessivées à partir d'échantillons de bois non traité permet d'estimer le taux d'émission éventuel du produit de préservation par le bois non traité. La vitesse de changement du taux d'émission en fonction du temps peut être estimée par la collecte et l'analyse du milieu d'émission après des délais croissants d'exposition. Cette analyse constitue un moyen de contrôle permettant de déterminer les niveaux de base de la substance chimique d'essai dans le bois non traité pour confirmer l'absence de traitement préalable du bois source d'échantillons par le produit de préservation.

RÉSULTAT ET RAPPORT

Analyses chimiques

40. L'eau collectée est chimiquement analysée et les résultats de l'analyse sont exprimés en unités appropriées, par exemple, µg/l.

Rapport des résultats

41. Tous les résultats sont enregistrés. L'appendice présente un exemple de formulaire de relevé conseillé pour un groupe d'échantillons expérimentaux traités, et le tableau de synthèse permettant le calcul des valeurs moyennes d'émissions à chaque intervalle de prélèvement.
42. Le calcul du flux d'émissions quotidiennes en $\text{mg/m}^2/\text{jour}$ consiste à diviser la moyenne des trois mesures de trois expériences identiques par le nombre de jours d'immersion.

Rapport de l'essai

43. Le rapport de l'essai doit contenir au moins les informations suivantes:
 - Le nom du fournisseur du produit de préservation soumis à l'essai;
 - Le nom ou le code spécifique et individuel du produit de préservation testé;
 - Le nom commercial ou courant du ou des ingrédients actifs, assorti d'une description générique des co-formulants (par exemple, co-solvant, résine) et la composition en % m/m des ingrédients;
 - La valeur pertinente de rétention ou de charge (en kg/m^3 ou l/m^2 , respectivement) spécifiée pour le bois employé au contact de l'eau;
 - L'espèce de bois utilisée, caractérisée par sa densité et sa vitesse de croissance en cernes pour 10 mm;
 - La charge ou la rétention du produit de préservation testé et la formule utilisée pour calculer la rétention, exprimée en l/m^2 ou kg/m^3 ;
 - La méthode d'application du produit de préservation, précisant le mode de traitement utilisé pour un procédé par pénétration, et la méthode d'application dans le cas d'un traitement superficiel;
 - La date d'application du produit de préservation ainsi qu'une estimation de la teneur en humidité des échantillons expérimentaux, exprimée en pourcentage;
 - Les protocoles de conditionnement employés, détaillant le type, les conditions et la durée;
 - L'indication de l'agent de colmatage d'extrémité employé et le nombre d'applications;
 - La notification de tout traitement consécutif du bois, par exemple, indication du fournisseur, du type, des caractéristiques et de la charge d'une peinture;
 - L'heure et la date de chaque événement d'immersion, la quantité d'eau utilisée pour l'immersion des échantillons expérimentaux lors de chacun de ces événements, et la quantité d'eau absorbée par le bois pendant l'immersion;
 - Toutes les variations modifiant la méthode décrite et tous les facteurs susceptibles d'influencer les résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Norme Européenne, EN 84 — 1997. Produits de préservation du bois Epreuve de vieillissement accéléré des bois traités avant essais biologiques. Epreuve de délavage.
- (2) Norme Européenne, EN 113/A1 — 2004. Produits de préservation du bois. Produits de préservation du bois — Méthode d'essai pour déterminer l'efficacité protectrice vis-à-vis des champignons basidiomycètes lignivores — Détermination du seuil d'efficacité.
- (3) Norme Européenne, EN 252 — 1989. Essai de champ pour déterminer l'efficacité protectrice relative d'un produit de préservation du bois en contact avec le sol.
- (4) Norme Européenne, EN 335 — Partie 1: 2006. Durabilité du bois et des matériaux dérivés du bois — Définition des classes d'emploi — Partie 1: Généralités.

-
- (5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 — 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.
 - (6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II — 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.
-

Appendice 1

Formulaire de relevé pour la méthode d'essai

Estimation des émissions issues de bois traité par un produit de préservation dans l'environnement: méthode de laboratoire applicable aux articles en bois sans revêtement qui sont en contact avec de l'eau douce ou de l'eau de mer.

Site de l'essai	
Produit de préservation du bois	
Fournisseur du produit de préservation	
Nom ou code spécifique et individuel du produit de préservation	
Nom commercial ou courant du produit de préservation	
Co-formulants	
Rétention correspondant au bois utilisé au contact de l'eau	
Application	
Méthode d'application	
Date d'application	
Formule utilisée pour calculer la rétention:	
Protocole de conditionnement	
Durée du conditionnement	
Agent colmatant l'extrémité / nombre d'applications	
Traitement consécutif	s'il y a lieu
Échantillons expérimentaux	
Espèce de bois	
Densité du bois	(minimum ... valeur moyenne ... maximum)
Vitesse de croissance (cernes pour 10 mm)	(minimum ... valeur moyenne ... maximum)
Teneur en humidité	

Assemblages de l'essai (*)	Rétention (par exemple kg/m ³)
Traité "x"	Valeur moyenne et écart type ou intervalle pour 5 échantillons
Traité "y"	Valeur moyenne et écart type ou intervalle pour 5 échantillons
Traité "z"	Valeur moyenne et écart type ou intervalle pour 5 échantillons
Non traité	
Variation par rapport aux paramètres de la méthode d'essai	Par exemple, qualité de l'eau, dimensions des échantillons expérimentaux etc.

(*) x, y, z représentent les trois échantillons d'expériences identiques

Durée	Echange d'eau	Masse de l'échantillon		Absorption d'eau		Echantillon d'eau				
		Traité (moyenne)	Non traité	Traité (moyenne)	Non traité		Eau de l'essai	x	y	z
	Date	g	g	g	g	n°	pH	pH	pH	pH
début										
6 h						1				
24 h						2				
2 j						3				
4 j						4				
8 j						5				
15 j						6				
22 j						7				
29 j						8				

Préparer des tableaux séparés pour chaque ingrédient actif

Durée	Échange d'eau	Résultats analytiques														
		Échantillons non traités			Échantillons traités											
		Concentration d'i.a. dans l'eau mg/l	Quantité émise mg/m²	Taux d'émission mg/m²/j	Concentration d'i.a. dans l'eau				Quantité émise				Taux d'émission			
	x				y	z	Moyenne	x	y	z	Moyenne	x	y	z	Moyenne	
	Date				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m²	mg/m²	mg/m²	mg/m²	mg/m²/j	mg/m²/j	mg/m²/j	mg/m²/j
6 h																
24 h																
2 j																
4 j																
8 j																
15 j																
22 j																
29 j																

Note: Les résultats concernant le bois non traité peuvent être utilisés pour corriger les taux d'émission des échantillons traités, et ils doivent par conséquent apparaître en premier et toutes les valeurs des échantillons traités sont des "valeurs corrigées". L'analyse initiale de l'eau peut également donner lieu à une correction.

*Appendice 2***Définitions**

Substance chimique: une substance ou un mélange.

Substance chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

C.46. BIOACCUMULATION CHEZ LES OLIGOCHÈTES BENTHIQUES FOUISEURS**INTRODUCTION**

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 315 (2008) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les animaux endobenthiques ingérant des sédiments peuvent être exposés aux substances liées aux sédiments (1). Parmi ces espèces ingérant des sédiments, les oligochètes aquatiques jouent un rôle important à la base des systèmes aquatiques. Ils vivent dans les sédiments et représentent souvent les espèces les plus abondantes, en particulier dans des habitats dont les conditions environnementales sont hostiles aux autres animaux. Par la bioturbation de ces sédiments et en servant de proie, ces animaux peuvent avoir une forte influence sur la biodisponibilité de ces substances pour d'autres organismes comme les poissons benthivores. Par opposition aux organismes épibenthiques, les oligochètes aquatiques endobenthiques s'enfouissent dans les sédiments et ingèrent des particules de sédiment sous la surface des sédiments. De ce fait, ces organismes sont exposés aux substances chimiques qui peuvent pénétrer dans leur corps de diverses manières comme par contact direct, ingestion de particules sédimentaires contaminées, via l'eau interstitielle et l'eau surjacente. Certaines espèces d'oligochètes benthiques actuellement utilisées dans des essais écotoxicologiques sont décrites à l'Appendice 6.
2. Les paramètres qui caractérisent la bioaccumulation d'une substance se composent essentiellement du facteur de bioaccumulation (FBA), de la constante de vitesse d'absorption sédimentaire (k_d) et de la constante de vitesse d'élimination (k_e). L'Appendice 1 donne des définitions détaillées de ces paramètres.
3. Afin d'évaluer le potentiel de bioaccumulation de substances chimiques de manière générale et d'étudier la bioaccumulation de substances ayant tendance à se répartir dans ou sur les sédiments, une méthode d'essai comportant des compartiments spécifiques est nécessaire (1) (2) (3) (4).
4. La présente méthode d'essai doit permettre d'évaluer la bioaccumulation de substances chimiques associées à des sédiments dans des vers oligochètes endobenthiques. La substance d'essai est dispersée dans le sédiment. L'utilisation d'un sédiment enrichi a pour but de simuler un sédiment contaminé.
5. La méthode se fonde sur les méthodes d'essai existantes pour la toxicité sédimentaire et la bioaccumulation (1) (4) (5) (6) (7) (8) (9). On trouvera des informations utiles dans les discussions et résultats d'un groupe de travail international (11) et les résultats d'un essai comparatif interlaboratoires international (12).
6. Cet essai s'applique aux substances chimiques organiques neutres, stables, qui ont tendance à s'associer aux sédiments. Cette méthode permet également de mesurer la bioaccumulation de composés organométalliques stables, associés à des sédiments (12). Elle ne s'applique pas aux métaux et autres éléments présents à l'état de traces (11), sans modification de la conception de l'essai en ce qui concerne les volumes de substrat et d'eau, et probablement la dimension des échantillons de tissu.

PRÉREQUIS ET INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

7. Il existe quelques relations structure-activité quantitatives (RSAQ) bien établies, disponibles, concernant les processus de bioaccumulation (14). La relation la plus largement utilisée est la corrélation entre la bioaccumulation et la bioconcentration de substances organiques stables et leur lipophilie respective (exprimée comme le logarithme du coefficient de partage octanol-eau ($\log K_{oe}$); voir la définition en Appendice 1), qui a été développée pour la description d'une substance se répartissant entre l'eau et les poissons. Cette relation a également permis d'établir des corrélations pour le compartiment sédimentaire (15)(16)(17)(18). La corrélation $\log K_{oe}$ - $\log FBC$, principale RSAQ, peut être utile pour une estimation préliminaire du potentiel de bioaccumulation de substances chimiques associées à un sédiment. Toutefois, le FBA peut être influencé par la teneur en lipide de l'organisme d'essai et la teneur en carbone organique du sédiment. Par conséquent, il est également possible d'utiliser le coefficient de partage carbone organique/eau (K_{co}) comme déterminant principal de la bioaccumulation de composés organiques associés à un sédiment.
8. Cet essai s'applique:
 - aux substances organiques, stables, dont les valeurs de $\log K_{oe}$ sont comprises entre 3,0 et 6,0 (5) (19) et aux substances superlipophiles dont le $\log K_{oe}$ est supérieur à 6,0 (5);
 - aux substances appartenant à la classe des substances organiques connues pour leur potentiel de bioaccumulation dans les organismes vivants, p. ex. les agents tensioactifs ou les substances fortement adsorbantes (p. ex. de K_{co} élevée).

9. Avant de débiter toute étude, il convient de se procurer certaines informations sur la substance d'essai, comme les mesures de sécurité, les conditions de stockage convenables, la stabilité et les méthodes analytiques. Des conseils pour la réalisation d'essais rendus difficiles par les propriétés physico-chimiques des substances d'essai sont donnés dans (20) et (21). Avant de conduire un essai de bioaccumulation sur des oligochètes aquatiques, il est nécessaire de réunir les informations suivantes à propos de la substance d'essai:
- le nom courant, le nom chimique (de préférence le nom IUPAC), la formule structurale, le n°CAS, la pureté;
 - la solubilité dans l'eau [méthode d'essai A.6 (22)];
 - le coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}) [méthodes d'essai A.8, A.24 (22)];
 - le coefficient de partage sédiment-eau, exprimé par K_d ou K_{co} [méthode d'essai C.19 (22)];
 - les propriétés vis-à-vis de l'hydrolyse [méthode d'essai C.7 (22)];
 - la phototransformation dans l'eau (23);
 - la pression de vapeur [méthode d'essai A.4 (22)];
 - la biodégradabilité immédiate [méthodes d'essai C.4 et C.29 (22)];
 - la tension de surface [méthode d'essai A.5 (22)];
 - la concentration micellaire critique (24).

Par ailleurs, les informations suivantes, lorsqu'elles sont disponibles, sont pertinentes:

- la biodégradation en environnement aquatique [méthodes d'essai C.24 et C.25 (22)];
 - la constante de la loi de Henry.
10. Des substances d'essai radiomarquées peuvent faciliter l'analyse de l'eau, du sédiment et des échantillons biologiques et peuvent être employées afin de déterminer si l'identification et la quantification des produits de dégradation doivent être conduites. La méthode décrite ici a été validée par un essai comparatif interlaboratoires international (12), pour des substances marquées au ^{14}C . Si l'ensemble des résidus marqués est mesuré, le facteur de bioaccumulation (FBA) est basé sur la substance parente incluant les éventuels produits de dégradation retenus. Il est également possible de combiner une étude du métabolisme et une étude de bioaccumulation par l'analyse et la quantification du pourcentage de la substance parente et de ses produits de dégradation dans des échantillons prélevés à la fin de la phase d'absorption ou au niveau du pic de bioaccumulation. Dans tous les cas, il est recommandé que le calcul du FBA se base sur la concentration de la substance parente dans les organismes et pas uniquement sur le total des résidus radioactifs.
11. En plus des propriétés de la substance d'essai, une autre information nécessaire est la toxicité envers les espèces oligochètes devant être utilisées dans l'essai, comme la concentration létale médiane (CL_{50}) pour la durée nécessaire à la phase d'absorption, afin de s'assurer que les concentrations d'exposition retenues sont bien inférieures aux niveaux toxiques. Si elles sont disponibles, la préférence devrait être donnée aux valeurs de toxicité issues d'études sur le long terme sur des critères d'évaluation sublétaux (CE_{50}). En cas d'indisponibilité de ces données, un test de toxicité aiguë dans des conditions identiques à celles de l'essai de bioaccumulation, ou des données toxicologiques concernant d'autres espèces substitutives peuvent fournir des informations utiles.
12. Une méthode analytique appropriée, d'incertitude, de précision et de sensibilité connues pour la quantification de la substance dans les solutions, le sédiment et le matériau biologique d'essai doit être disponible, ainsi que les détails de la préparation et du stockage des échantillons et les fiches de données de sécurité des substances. Les limites de détection analytiques de la substance d'essai dans l'eau, le sédiment et les tissus du ver devraient également être connues. Si une substance d'essai radiomarquée est utilisée, la radioactivité spécifique (c.-à-d. en $\text{Bq}\cdot\text{mol}^{-1}$), la position de l'atome marqué et le pourcentage de radioactivité associé aux impuretés doivent également être connus. La radioactivité spécifique de la substance d'essai devrait être aussi élevée que possible afin de permettre la détection de concentrations aussi faibles que possible (11).
13. Des informations sur les caractéristiques du sédiment utilisé (p. ex. l'origine du sédiment ou de ses constituants, son pH et la concentration en ammoniacale de l'eau interstitielle (sédiments naturels) la teneur en carbone organique (COT), la distribution de taille des particules (le pourcentage de sable, de limon et d'argile) et le pourcentage de masse sèche) devraient être accessibles (6).

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. L'essai consiste en deux phases, la phase d'absorption (exposition) et la phase d'élimination (post-exposition). Durant la phase d'absorption, des vers sont exposés au sédiment enrichi avec la substance d'essai, recouverts d'eau reconstituée et convenablement équilibrée (11). Des groupes de vers témoins sont conservés dans des conditions identiques, sans la substance d'essai.
15. Pour la phase d'élimination les vers sont transférés dans un système sédiment-eau ne contenant pas la substance d'essai. Une phase d'élimination est nécessaire afin de recueillir des informations sur la vitesse à laquelle la substance d'essai est excrétée par l'organisme d'essai (19)(25). Une phase d'élimination est toujours nécessaire sauf si l'absorption de la substance d'essai au cours de la phase d'exposition s'avère être non significative (p. ex. aucune différence statistique entre la concentration de la substance d'essai dans les vers d'essai et dans les vers témoins). Si un état quasi stationnaire n'a pas été atteint durant la phase d'absorption, il est possible de réaliser une détermination de la cinétique — constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, FBA_k , en utilisant les résultats de la phase d'élimination. Une évolution de la concentration de la substance d'essai dans/sur les vers est suivie sur l'ensemble des deux phases de l'essai.
16. Durant la phase d'absorption, on conduit des mesures jusqu'à ce que le FBA atteigne un plateau ou un état quasi stationnaire. Par défaut, la durée de la phase d'absorption devrait être de 28 jours. La pratique a montré qu'une phase d'absorption de 12 à 14 jours suffit, pour plusieurs substances organiques neutres stables, à atteindre un état quasi stationnaire (6) (8) (9).
17. Toutefois, si l'état quasi stationnaire n'est pas atteint dans les 28 jours, la phase d'élimination est démarrée en transférant les oligochètes exposés dans des récipients contenant le même milieu sans la substance d'essai. La phase d'élimination est achevée soit lorsqu'on atteint un niveau de 10 % de la concentration mesurée dans les vers au 28^e jour de la phase d'absorption, soit après une durée de 10 jours au maximum. Le niveau résiduel dans les vers à la fin de la phase d'élimination est relevé comme un critère d'évaluation supplémentaire, p. ex. comme résidus non éliminés (RNE). Le facteur de bioaccumulation (FBA_{ss}) est calculé de préférence à la fois comme le rapport de la concentration dans les vers (C_a) à celle dans le sédiment (C_s) à un état quasi stationnaire apparent, et comme un facteur de bioaccumulation cinétique, FBA_k comme le rapport de la constante de vitesse d'absorption à partir du sédiment (k_a) à la constante de vitesse d'élimination (k_e) en supposant une cinétique du premier ordre. Si aucun état quasi stationnaire n'est atteint dans les 28 jours, calculer FBA_k à partir des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination. Pour les calculs, voir l'Appendice 2. Si une cinétique du premier ordre ne s'applique pas, des modèles plus complexes devront être utilisés [Appendice 2 et référence (25)].
18. Si aucun état quasi stationnaire n'est atteint dans les 28 jours, de manière facultative, la phase d'absorption peut être prolongée en soumettant les groupes de vers exposés — s'ils sont disponibles — à des mesures supplémentaires jusqu'à atteindre un état quasi stationnaire. En parallèle, la phase d'élimination devrait néanmoins débiter au 28^e jour de la phase d'absorption.
19. La constante de vitesse d'absorption, la constante de vitesse d'élimination (ou les constantes, dans le cas de modèles plus complexes), le facteur de bioaccumulation cinétique (FBA_k), et lorsque cela est possible, les limites de confiance de chacun de ces paramètres sont calculés à partir des équations du modèle numérique (voir les modèles en Appendice 2). La pertinence d'un modèle peut être déterminée à partir du coefficient de corrélation ou du coefficient de détermination (des coefficients proches de 1 indiquent un bon accord).
20. Pour réduire la dispersion des résultats pour des substances organiques de lipophilie élevée, les facteurs de bioaccumulation devraient être exprimés en plus en relation avec la teneur en liquide des organismes d'essai et avec la teneur en carbone organique (COT) du sédiment (facteur d'accumulation biote-sédiment ou BSAF en kg de sédiment COT.kg⁻¹ de teneur en lipide des vers). Cette approche se base sur des corrélations expérimentales et théoriques pour le compartiment aquatique, où — pour certaines classes chimiques — il existe une relation claire entre le potentiel d'une substance à être bioaccumulée et sa lipophilie, laquelle a été clairement établie pour des organismes modèles comme le poisson (14) (26) (27). Il existe également une relation entre la teneur en lipide du poisson d'essai et la bioaccumulation observée de ces substances. Pour les organismes benthiques, des corrélations similaires ont été trouvées (15) (16) (17) (18). Si on dispose de suffisamment de tissu de vers, il est possible de déterminer la teneur en lipide des animaux d'essai sur le même matériau biologique que celui utilisé pour déterminer la concentration de la substance d'essai. Toutefois, il est plus pratique d'utiliser des animaux témoins acclimatés au moins pour démarrer ou — de préférence — à la fin de la phase d'absorption pour mesurer la teneur en lipide, laquelle peut ensuite être utilisée pour normaliser les valeurs de FBA.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

21. Pour qu'un essai soit valable, les conditions suivantes doivent être satisfaites:
- La mortalité cumulée des vers (témoins et traités) jusqu'à la fin de l'essai, ne devrait pas dépasser 20 % du nombre initial.
 - De plus, il devrait être prouvé que les vers s'enfouissent dans le sédiment pour prendre en compte une exposition maximum. Voir le paragraphe 28 pour les détails.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Espèces d'essai

22. Différentes espèces d'oligochètes aquatiques se prêtent à l'essai. Les espèces les plus couramment employées sont listées en Annexe 6.
23. Les essais de toxicité (96 h, dans l'eau seule) devraient être conduits à intervalles réguliers (p.ex. chaque mois) par rapport à un composé toxique de référence tel que le chlorure de potassium (KCl) ou le sulfate de cuivre (CuSO_4) (1) afin de démontrer l'état de santé des animaux d'essai (1) (6). Si aucun essai de toxicité de référence n'est conduit à intervalles réguliers, le lot d'organismes devant être utilisés dans un essai de bioaccumulation sédimentaire doit être vérifié à l'aide d'un composé toxique de référence. La mesure de la teneur en lipide pourrait également fournir des informations utiles sur l'état des animaux.

Culture des organismes d'essai

24. Afin de disposer d'un nombre suffisant de vers pour conduire les essais de bioaccumulation, il pourra être nécessaire de conserver les vers dans une culture de laboratoire mono-espèce permanente. Les méthodes de culture en laboratoire pour les espèces d'essai retenues sont résumées en Appendice 6. Pour les détails, voir les références (8) (9) (10) (18) (28) (29) (30) (31) (32).

Appareillage

25. On doit veiller à tout moment à ne pas utiliser pour l'appareillage des matériaux susceptibles de dissoudre ou absorber les substances d'essai ou pouvant libérer des substances ayant un effet délétère sur les animaux d'essai. Des chambres rectangulaires ou cylindriques standard, faites d'un matériau chimiquement inerte et présentant une capacité adaptée au taux de charge, c.-à-d. au nombre de vers d'essai, peuvent être utilisées. Il convient d'éviter l'utilisation de tubes en plastique souples pour l'administration d'eau ou d'air. Du polytétrafluoroéthylène, de l'acier inoxydable et/ou du verre devront être utilisés pour tout équipement entrant en contact avec le milieu faisant l'objet de l'essai. Du verre silanisé peut s'avérer nécessaire pour des substances de coefficient d'adsorption élevé comme les pyréthroides synthétiques. Dans de telles circonstances, l'équipement devra être jeté après usage (5). Pour des substances d'essai radiomarquées et pour des substances chimiques volatiles, on doit prendre soin d'éviter l'évaporation et la perte des substances d'essai. Il convient d'utiliser des pièges (p. ex. des flacons de lavage des gaz) contenant un absorbant permettant de capter d'éventuels résidus s'évaporant des chambres d'essai (11).

Eau

26. L'eau surjacente doit être d'une qualité permettant la survie des espèces d'essai durant les périodes d'acclimatation et d'essai, sans qu'elle ne présente un aspect ou un comportement anormal. Pour l'eau surjacente, tant pour les essais que pour les cultures de laboratoire, il est recommandé d'utiliser une eau reconstituée selon la méthode d'essai C.1 (25). Il a été démontré que plusieurs espèces d'essai peuvent survivre, croître et se reproduire dans cette eau (8); une normalisation maximum des conditions d'essai et de culture est proposée. L'eau devrait être caractérisée au moins par son pH, sa conductivité et sa dureté. La recherche de micropolluants dans l'eau, préalablement à son utilisation pourrait fournir des informations utiles (Appendice 4).
27. L'eau devrait être de qualité constante sur toute la durée de l'essai. Le pH de l'eau surjacente devrait être compris entre 6 et 9. La dureté totale devrait être comprise entre 90 et 400 mg de CaCO_3 par litre au début de l'essai (7). Les plages de pH et de dureté dans l'eau reconstituée mentionnée sont données dans la méthode d'essai C.1 (25). Si une interaction est suspectée entre la dureté de certains ions et la substance d'essai, une eau moins dure devrait être utilisée. L'Appendice 4 résume des critères supplémentaires pour une eau de dilution acceptable selon la ligne directrice 210 de l'OCDE (34).

Sédiment

28. Le sédiment doit être d'une qualité permettant la survie et de préférence la reproduction des organismes d'essai durant les périodes d'acclimatation et d'essai, sans qu'ils ne présentent un aspect ou un comportement anormal. Les vers devront s'enfouir dans le sédiment. Le comportement d'enfouissement peut avoir une influence sur l'exposition et donc sur le FBA. Par conséquent, la tendance à éviter le sédiment ou comportement fouisseur des organismes d'essai devra être observée, lorsque la turbidité de l'eau surjacente le permet. Les vers (témoins et traités) devront s'enfouir dans le sédiment dans les 24 h à compter de leur addition au récipient d'essai. Si on observe de manière permanente un défaut d'enfouissement ou un évitement du sédiment (p. ex. plus de 20 % sur plus de la moitié de la phase d'absorption), ceci indique soit que les conditions de l'essai ne sont pas appropriées, soit que les organismes d'essai ne sont pas en bonne santé, soit encore que la concentration de la substance chimique d'essai provoque ce comportement. Dans ce cas, l'essai devra être arrêté et répété en améliorant les conditions. Il est possible d'obtenir des informations supplémentaires sur l'ingestion du sédiment en utilisant les méthodes décrites dans (35) et (36), qui précisent l'ingestion de sédiments ou la sélection de particules par les organismes d'essai. Si elles sont observables, au moins la présence ou l'absence de coprolithes à la surface du sédiment, qui indiquent l'ingestion du sédiment par les vers, devraient être relevées et prises en compte dans l'interprétation des résultats de l'essai du point de vue du trajet d'exposition.
29. On recommande l'utilisation d'un sédiment artificiel basé sur le sol artificiel décrit dans la méthode d'essai C.8 (40) à la fois pour l'essai et pour les cultures des vers en laboratoire (Appendice 5), puisque des sédiments naturels de qualité appropriée ne sont pas disponibles tout au long de l'année. De plus, l'essai pourrait être influencé par la présence éventuelle d'organismes indigènes ainsi que de micropolluants dans des sédiments naturels. Le sédiment artificiel permet à différentes espèces d'essai de survivre, croître et se reproduire (8).
30. Le sédiment artificiel devrait être caractérisé au moins par l'origine de ses constituants, la distribution de taille de particule, (le pourcentage de sable, de limon et d'argile), la teneur en carbone organique (COT), la teneur en eau et le pH. La mesure du potentiel redox est facultative. Toutefois, il est possible d'utiliser des sédiments naturels, provenant de sites non pollués, comme sédiment d'essai et/ou de culture (1). Les sédiments naturels devraient être caractérisés au moins par leur origine (le site de prélèvement), le pH et la teneur en ammoniacque de l'eau interstitielle, la teneur en carbone organique (COT), la distribution de taille de particule, (le pourcentage de sable, de limon et d'argile), et la teneur en eau (6). Si un dégagement d'ammoniacque est attendu, on recommande de conditionner le sédiment naturel durant sept jours dans les conditions du test à venir, avant de l'enrichir avec la substance d'essai. À la fin de cette période de conditionnement, l'eau surjacente devra être enlevée et éliminée. La recherche de micropolluants dans le sédiment ou ses constituants, préalablement à son utilisation pourrait fournir des informations utiles.

Préparation

31. La manipulation des sédiments naturels préalablement à leur utilisation en laboratoire est décrite dans (1) (6) (44). La préparation du sédiment artificiel est décrite en Appendice 5.

Stockage

32. Le stockage de sédiments naturels au laboratoire devrait être aussi court que possible. L'Agence de Protection de l'Environnement américaine (6) recommande une durée maximum de stockage de 8 semaines à 4 °C ± 2 °C à l'abri de la lumière. Aucun espace libre ne doit être présent au-dessus du sédiment dans le récipient de stockage. L'Appendice 5 donne des recommandations concernant le stockage de sédiments artificiels.

Application de la substance d'essai

33. La substance d'essai est dispersée sur le sédiment. La procédure de dispersion implique le revêtement d'un ou plusieurs des constituants du sédiment avec la substance d'essai. Par exemple, le sable de quartz, ou une portion de celui-ci (p. ex. 10 g de sable de quartz par récipient d'essai), peut être trempé dans une solution de la substance d'essai dans un solvant adapté, lequel est ensuite lentement évaporé à sec. La fraction revêtue peut ensuite être mélangée avec le sédiment mouillé. La quantité de sable apportée avec la substance d'essai et le mélange de sable doivent être pris en compte lors de la préparation du sédiment, c.-à-d. que le sédiment doit alors être préparé avec moins de sable (6).

34. Pour un sédiment naturel, la substance d'essai peut être ajoutée par dispersion sur une portion séchée du sédiment ainsi que cela est décrit plus haut pour le sédiment artificiel, ou par mélange avec le sédiment mouillé, puis évaporation de l'agent de solubilisation éventuellement utilisé. Des solvants adaptés à la dispersion sur sédiment mouillé sont l'éthanol, le méthanol, l'éthylène glycol monométhyl éther, l'éthylène glycol diméthyl éther, le diméthylformamide et le triéthylène glycol (5) (34). La toxicité et la volatilité du solvant et la solubilité de la substance d'essai dans le solvant choisi doivent être les principaux critères de sélection d'un agent de solubilisation adapté. Des conseils supplémentaires sur les procédures de dispersion sont donnés dans Environnement Canada (1995) (41). On doit prendre des précautions pour s'assurer que la substance chimique d'essai ajoutée au sédiment est distribuée régulièrement et dans l'ensemble du sédiment. Des sous-échantillons du sédiment enrichi, d'expériences identiques, devraient être analysés afin de vérifier les concentrations en substance d'essai dans le sédiment et afin de déterminer le degré d'homogénéité de la distribution de la substance d'essai.
35. Une fois le sédiment enrichi préparé, avec une couche d'eau surjacente, il est souhaitable de laisser la substance d'essai se partager entre le sédiment et la phase aqueuse. Ceci devrait de préférence être réalisé dans les conditions de température et d'aération de l'essai. La durée d'équilibration appropriée dépend du sédiment et de la substance chimique et peut être de l'ordre de quelques heures à quelques jours, et dans quelques rares cas jusqu'à plusieurs semaines (4 à 5 semaines) (28) (42). Dans cet essai, on n'attend pas l'équilibre mais une période d'équilibration de 48 h à 7 jours est recommandée. Selon l'objectif de l'étude, p. ex. lorsqu'il s'agit de simuler des conditions environnementales, il peut être nécessaire d'équilibrer ou de vieillir le sédiment enrichi plus longtemps (11).

RÉALISATION DE L'ESSAI

Essai préliminaire

36. Il peut être utile de conduire une expérience préliminaire afin d'optimiser les conditions de l'essai définitif, p. ex. choix des concentrations des substances testées et durées des phases phase d'absorption et d'élimination. Le comportement des vers, par exemple évitement du sédiment, c.-à-d. que les vers quittent le sédiment, ce qui peut être dû à la substance d'essai et/ou au sédiment lui-même, devrait être observé et noté durant un essai préliminaire. L'évitement du sédiment peut également être utilisé comme paramètre subléthal dans un essai préliminaire pour l'estimation des concentrations des substances d'essai à utiliser dans un essai de bioaccumulation.

Conditions d'exposition

Durée de la phase d'absorption

37. Les organismes d'essai sont exposés à la substance d'essai durant la phase d'absorption. Le premier échantillon devrait être prélevé entre 4 et 24 h après le début de la phase d'absorption. La phase d'absorption devrait être conduite durant 28 jours au plus (1) (6) (11), sauf s'il peut être démontré qu'un équilibre a été atteint plus rapidement. On identifie un état quasi stationnaire par: (i) un tracé des facteurs de bioaccumulation pour chaque période d'échantillonnage en fonction du temps, parallèle à l'axe du temps, (ii) trois analyses successives de FBA réalisées sur des échantillons prélevés à des intervalles d'au moins deux jours, ne différant pas de plus de $\pm 20\%$ l'une par rapport à l'autre, et (iii) une absence de différence significative entre les trois périodes d'échantillonnage (sur la base de comparaisons statistiques, p. ex. l'analyse de la variance et une analyse par régression). Si l'état quasi stationnaire n'a pas été atteint après 28 jours, il est possible de clore la phase d'absorption en démarrant la phase d'élimination et il est possible de calculer le FBA_K à partir des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination (voir également les paragraphes 16 à 18).

Durée de la phase d'élimination

38. Le premier échantillon devrait être prélevé entre 4 et 24 h après le début de la phase d'élimination car des modifications peuvent survenir dans les résidus de tissu durant de la période initiale. Il est recommandé de clore la phase d'élimination soit lorsque la concentration de substance d'essai est inférieure à 10 % de la concentration de l'état quasi stationnaire, soit après une durée de 10 jours. Le niveau résiduel dans les vers à la fin de la phase d'élimination est relevé comme un critère d'évaluation secondaire. La période peut toutefois être définie par la durée pendant laquelle la concentration de la substance d'essai dans les vers est supérieure à la limite de détection analytique.

Organismes d'essai

Nombre de vers d'essai

39. Le nombre de vers par échantillon doit fournir une masse de tissu de vers telle que la masse de la substance d'essai par échantillon au début de la phase d'absorption et à la fin de la phase d'élimination soient, significativement supérieures à la limite de détection de la substance d'essai dans le matériau biologique. Dans les phases mentionnées d'absorption et d'élimination la concentration dans les animaux d'essai est généralement relativement faible (6) (8) (18). Comme le poids individuel de nombreuses espèces d'oligochètes aquatiques est très faible (5 à 10 mg de poids humide par individu pour *Lumbriculus variegatus* et *Tubifex tubifex*), il est possible de réunir les vers de chambres d'essai d'expériences identiques données pour la pesée et l'analyse de la substance chimique d'essai. Pour les espèces d'essai de poids individuel supérieur (p. ex. *Branchiura sowerbyi*), il est possible d'utiliser des expériences identiques contenant un unique individu, mais dans ce cas le nombre d'expériences identiques doit être augmenté à cinq par point d'échantillonnage (11). On doit toutefois avoir à l'esprit que *B. sowerbyi* ne faisait pas partie de l'essai comparatif interlaboratoires (12) et il ne fait pas conséquent pas partie des espèces préférables de la ligne directrice préliminaire.
40. Des vers de taille similaire devraient être utilisés (pour *L. variegatus* voir l'Appendice 6). Ils devraient provenir de la même source et devraient être des animaux adultes ou de gros animaux de la même classe d'âge (voir l'Appendice 6). Le poids et l'âge d'un animal peuvent avoir un effet significatif sur les valeurs de FBA (p. ex. du fait d'une teneur en lipide différente et/ou de la présence d'œufs); ces paramètres devraient être relevés avec précision. Afin de mesurer le poids moyen et le poids sec, un sous échantillon de vers devrait être pesé avant de débiter l'essai.
41. Avec *Tubifex tubifex* et *Lumbriculus variegatus*, on peut s'attendre à observer une reproduction sur la durée de l'essai. Une absence de reproduction lors d'un essai de bioaccumulation devrait être relevée et prise en compte lors de l'interprétation des résultats.

Charge

42. Il est recommandé d'utiliser des rapports sédiment/vers et eau/vers élevés afin de minimiser la réduction de la concentration de la substance d'essai dans le sédiment durant la phase d'absorption et d'éviter une réduction de la concentration en oxygène dissous. Les taux de charge choisis devraient également correspondre à des densités de population observées dans la nature pour l'espèce choisie (43). Par exemple, pour *Tubifex tubifex*, on recommande un taux de charge de 1 à 4 mg de tissu de ver (poids humide) par gramme de sédiment humide (8) (11). Les références (1) et (6) recommandent un taux de charge ≤ 1 g de poids sec de tissu de ver pour 50 g de carbone organique sédimentaire, pour *L. variegatus*.
43. Les vers utilisés lors d'un essai sont extraits de la culture par tamisage du sédiment de culture. Les animaux (adultes ou gros vers sans signes de fragmentation récente) sont transférés dans des récipients en verre (p. ex. des boîtes de Petri) contenant une eau propre. Si les conditions de l'essai diffèrent des conditions de culture, une phase d'acclimatation de 24 h devrait suffire. Avant la pesée, l'excès d'eau doit être séparé des vers. Ceci peut être fait en plaçant les vers avec précaution sur un mouchoir en papier préhumidifié. Il est déconseillé d'utiliser un papier absorbant pour sécher les vers car celui-ci peut provoquer un stress ou abîmer les vers. Brunson et al. (1998) recommandent l'utilisation de vers non éponges d'environ 1,33 fois la biomasse cible. Ces 33 % supplémentaires correspondent à la différence entre des vers éponges et non éponges (28).
44. Au début de la phase d'absorption (jour 0 de l'essai), les organismes d'essai sont transférés depuis la chambre d'acclimatation et distribués aléatoirement dans des récipients (p. ex. des boîtes de Petri) contenant de l'eau reconstituée, en ajoutant les vers par deux dans chaque récipient, jusqu'à ce que chaque récipient en contienne dix. Chacun de ces groupes de vers est ensuite aléatoirement transféré dans des récipients d'essai séparés, p. ex. en utilisant une pince en acier souple. Les récipients d'essai sont ensuite incubés dans les conditions de l'essai.

Alimentation

45. Compte tenu de la faible teneur en nutriment du sédiment artificiel, le sédiment devra être complété d'une source alimentaire. Afin de ne pas sous-estimer l'exposition des organismes d'essai, p. ex. en apportant sélectivement une alimentation non contaminée, la nourriture nécessaire à la reproduction et à la croissance des organismes d'essai devrait être ajoutée au sédiment en une fois, avant ou durant l'application de la substance d'essai (voir l'Appendice 5).

Rapport sédiment/eau

46. Le rapport sédiment/eau recommandé est de 1:4 (45). On considère que ce rapport permet de conserver les concentrations en oxygène à des niveaux convenables et d'éviter l'accumulation d'ammoniaque dans l'eau surnageante. La teneur en oxygène dans l'eau surjacente devrait être conservée à une valeur ≥ 40 % de la saturation. L'eau surjacente des récipients d'essai devrait être doucement aérée (p. ex. 2 à 4 bulles par seconde) via une pipette pasteur située environ 2 cm au-dessus de la surface du sédiment de sorte à minimiser la perturbation du sédiment.

Éclairement et température

47. La photopériode de la culture et de l'essai est de 16 heures (1) (6). L'intensité lumineuse dans la zone de l'essai devrait être maintenue à environ 500 à 1 000 lux. La température devrait être de 20 ± 2 °C sur toute la durée de l'essai.

Concentrations d'essai

48. L'une des concentrations d'essai (aussi faible que possible) est utilisée pour la détermination de la cinétique d'absorption, mais il est possible d'utiliser une seconde concentration (supérieure) [p. ex. (46)]. Dans ce cas, des échantillons sont prélevés et analysés à l'état quasi stationnaire ou après 28 jours afin de confirmer le FBA mesuré à la concentration la plus basse (11). La concentration supérieure devrait être choisie de sorte à ne pas provoquer d'effets délétères (p. ex; en se plaçant à environ 1 % en dessous de la concentration de toxicité chronique la plus basse connue EC_x provenant d'études de toxicité chronique pertinentes). La concentration d'essai la plus basse devrait être significativement supérieure à la limite de détection dans le sédiment et dans les échantillons biologiques selon la méthode analytique employée. Si la concentration d'effet de la substance d'essai est voisine de la limite de détection analytique, on recommande l'utilisation d'une substance d'essai radiomarquée, de radioactivité spécifique élevée.

Expériences identiques traitées et témoins

49. Le nombre minimum d'expériences identiques traitées pour les mesures de cinétique devrait être de trois par point d'échantillonnage (11), pour l'ensemble des phases d'absorption et d'élimination. Des expériences identiques supplémentaires devraient être utilisées p. ex. pour des dates d'échantillonnage supplémentaires facultatives. Pour la phase d'élimination, un nombre correspondant d'expériences identiques est préparé avec un sédiment et une eau surjacente non enrichis, de sorte que les vers traités puissent être transférés depuis des récipients traités donnés vers des récipients non traités à la fin de la phase d'absorption. Le nombre total d'expériences identiques traitées devrait être suffisant à la fois pour la phase d'absorption et pour la phase d'élimination.
50. En variante, il est possible d'exposer les vers destinés à être échantillonnés durant la phase d'élimination dans un grand container contenant un sédiment enrichi, du même lot que celui utilisé pour la cinétique d'absorption. Il doit être prouvé que les conditions de l'essai (p. ex. la profondeur du sédiment, le rapport sédiment/eau, la charge, la température, la qualité de l'eau) sont comparables aux expériences identiques destinées à la phase d'absorption. Une fois la phase d'absorption terminée, l'eau, le sédiment et les échantillons de vers devraient être prélevés de ce container pour analyse et un nombre suffisant de grands vers, ne présentant pas de signes de fragmentation récents, devraient être soigneusement extraits et transférés vers les expériences identiques préparées pour la phase d'élimination (p. ex. dix organismes par récipient d'expérience identique).
51. Si aucun solvant autre que l'eau n'a été utilisé, au moins 9 expériences identiques d'un contrôle négatif (au moins 3 échantillons au démarrage, 3 à la fin de la phase d'absorption et 3 à la fin de la phase d'élimination) devraient être fournies pour analyse biologique et du bruit de fond. Si un agent de solubilisation est utilisé pour l'application de la substance d'essai, il convient de contrôler le solvant (au moins 3 échantillons d'expériences identiques devraient être échantillonnés au démarrage, 3 à la fin de la phase d'absorption et 3 à la fin de la phase d'élimination). Dans ce cas, au moins 4 expériences identiques d'un contrôle négatif (sans solvant) devraient être fournies pour échantillonnage à la fin de la phase d'absorption. Ces expériences identiques peuvent être comparées biologiquement au contrôle du solvant afin d'obtenir des informations sur une éventuelle influence du solvant sur les organismes d'essai. L'Appendice 3 donne plus de détails.

Fréquence des mesures de la qualité de l'eau

52. Durant les phases d'absorption et d'élimination, l'eau surjacente devrait faire l'objet de mesures de qualité, au minimum selon les paramètres suivants:

Température	dans un récipient de chaque niveau de traitement par date d'échantillonnage, et dans un récipient témoin, une fois par semaine et au départ et à la fin des phases d'absorption et d'élimination; la température peut également être enregistrée, p. ex. en continu ou à intervalles d'une heure, dans l'environnement (air ambiant ou bain d'eau) ou dans un récipient d'essai représentatif;
Teneur en oxygène dissous	dans un récipient de chaque niveau de traitement et dans un récipient témoin, par date d'échantillonnage, exprimée en mg/l et en % de la saturation à l'air;
Alimentation en air	contrôlée au moins une fois par jour (travaillé) et au besoin ajustée;
pH	dans un récipient traité de chaque niveau de traitement par date d'échantillonnage et dans un récipient témoin une fois par semaine et au début et à la fin des phases d'absorption et d'élimination;
Dureté totale de l'eau	au moins dans un récipient traité et dans un récipient témoin au début et à la fin des phases d'absorption et d'élimination, exprimée en mg de CaCO_3/l ;
Teneur totale en ammoniacque	au moins dans un récipient traité et dans un récipient témoin au début et à la fin des phases d'absorption et d'élimination, exprimée en mg de NH_4^+ ou de NH_3 ou d'azote ammoniacal total par litre.

Échantillonnage et analyse des vers, du sédiment et de l'eau*Programme d'échantillonnage*

53. L'Appendice 3 donne des exemples de programme d'échantillonnage pour une phase d'absorption de 28 jours et une phase d'élimination de 10 jours.
54. Échantillonner l'eau et le sédiment des chambres d'essai pour la détermination de la concentration de la substance d'essai avant addition des vers et durant les phases d'absorption et d'élimination. Durant l'essai, les concentrations de la substance d'essai sont déterminées dans les vers, le sédiment et l'eau, afin de suivre la distribution de la substance d'essai dans le compartiment du système d'essai.
55. Échantillonner les vers, le sédiment et l'eau à au moins six reprises durant la phase d'absorption, comme dans la phase d'élimination.
56. Poursuivre l'échantillonnage en continu jusqu'à atteindre un plateau (état quasi stationnaire) (voir l'Appendice 1) ou durant 28 jours. Si le plateau n'a pas été atteint dans les 28 jours, débiter la phase d'élimination. Au démarrage de la phase d'élimination, transférer les vers voulus vers des chambres des expériences identiques contenant un sédiment non traité et de l'eau (voir également les paragraphes 17 et 18).

Échantillonnage et préparation des échantillons

57. Les échantillons d'eau sont obtenus par décantation, siphonnage ou pipetage d'un volume suffisant pour la mesure de la quantité de la substance d'essai dans l'échantillon.
58. L'eau surjacente restante est soigneusement décantée ou siphonnée de la ou des chambres d'essai. Les échantillons de sédiment doivent être prélevés avec le plus grand soin, en dérangeant les vers au minimum.
59. Enlever tous les vers des expériences d'essai identiques au moment de l'échantillonnage, p. ex. en mettant en suspension le sédiment avec l'eau surjacente et en étalant le contenu de chaque expérience identique sur un plateau peu profond et en prélevant les vers à l'aide d'une pince en acier souple. Les rincer rapidement à l'eau dans un récipient peu profond en verre ou en acier. Enlever l'eau en excès. Transférer délicatement les vers dans un récipient préalablement taré, et les peser. Sacrifier les vers par congélation (p. ex. $\leq -18^\circ\text{C}$). La présence et le nombre de cocons et/ou de jeunes devraient être relevés.

60. De manière générale, les vers devraient être pesés et sacrifiés immédiatement après l'échantillonnage, sans phase de purge de l'intestin, afin d'obtenir un FBA classique incluant le contenu de l'intestin contaminé et afin d'éviter des pertes de résidus corporels durant une éventuelle phase de purge de l'intestin dans de l'eau seule (8). Les composés de $\log K_{oc}$ supérieur à 5 ne sont pas censés être significativement éliminés durant une phase de purge des intestins dans l'eau seule, alors que les substances chimiques de $\log K_{oc}$ inférieur à 4 peuvent être perdues en quantités significatives (47).
61. Durant la phase d'élimination, les vers purgent leur intestin dans le sédiment propre. Ceci signifie que les mesures réalisées immédiatement avant la phase d'élimination incluent le sédiment avec l'intestin contaminé, alors qu'après les 4 à 24 h initiales de la phase d'élimination, l'essentiel du contenu de l'intestin contaminé est supposé avoir été remplacé par du sédiment propre (11) (47). La concentration dans les vers de cet échantillon peut alors être considérée comme la concentration dans les tissus après la purge de l'intestin. Pour tenir compte de la dilution de la substance d'essai par du sédiment non contaminé durant la phase d'élimination, il est possible d'estimer le poids du contenu de l'intestin à partir des rapports poids des vers humides/poids des cendres de vers ou poids des vers secs/poids des cendres de vers.
62. Si l'objectif de l'étude est la mesure de la biodisponibilité et des résidus réels dans les tissus des organismes d'essai, alors au moins un sous-échantillon des animaux traités (provenant p. ex. de trois récipients d'expériences identiques supplémentaires), de préférence échantillonné durant l'état quasi stationnaire, devrait être pesé, purgé dans de l'eau propre durant 6 heures (47), et pesé de nouveau avant analyse. Les données de poids des vers et de concentrations corporelles de ces sous-échantillons peuvent ensuite être comparées aux valeurs obtenues à partir de vers purgés. Les vers destinés à une mesure d'élimination ne devraient pas être purgés avant le transfert vers le sédiment propre afin de minimiser le stress subi par les animaux.
63. Analyser de préférence l'eau, le sédiment et les échantillons de vers immédiatement (c.-à-d. dans les 1 à 2 jours) après extraction afin d'éviter une dégradation ou autres pertes et de calculer les vitesses d'absorption et d'élimination approximatives pendant le déroulement de l'essai. Une analyse immédiate permet également de déterminer sans retard l'atteinte du plateau.
64. Si les analyses ne sont pas réalisées immédiatement, les échantillons devront être stockés dans des conditions appropriées. Il convient d'obtenir les informations sur la stabilité et les conditions de stockage appropriées (p. ex. la durée et la température de stockage, les procédures d'extraction, etc.) pour la substance d'essai donnée, avant de débiter l'étude. Si ces informations ne sont pas disponibles et qu'elles sont jugées nécessaires, des tissus témoins contaminés peuvent être étudiés en parallèle afin de déterminer la stabilité au stockage.

Qualité de la méthode analytique

65. Comme l'ensemble de la procédure est essentiellement gouverné par l'incertitude, la précision et la sensibilité de la méthode analytique employée pour la substance d'essai, il convient de vérifier expérimentalement que la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique, ainsi que la récupération de la substance d'essai à partir de l'eau, du sédiment ou des échantillons de vers sont satisfaisantes pour la méthode donnée. Vérifier également que la substance d'essai n'est pas détectable dans les chambres témoins, en concentrations supérieures au bruit de fond. Si nécessaire, corriger les valeurs de C_w , C_s et C_a pour les valeurs des récupérations et du bruit de fond du témoin. Pour l'ensemble de l'essai, manipuler tous les échantillons de manière à minimiser les contaminations et les pertes (résultant p. ex. d'une adsorption de la substance d'essai sur le dispositif d'échantillonnage).
66. La récupération globale et la récupération de la substance d'essai dans les vers, le sédiment, l'eau et le cas échéant, dans les pièges contenant des absorbants permettant de retenir la substance d'essai évaporée, devraient être enregistrées et consignées.
67. Puisque l'utilisation de substances radiomarquées est recommandée, il est possible d'analyser la radioactivité totale (c.-à-d. celle du produit parent et des produits de dégradation). Toutefois, si ceci est faisable du point de vue analytique, une quantification de la substance parente et des produits de dégradation à l'état quasi stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption peuvent fournir des informations importantes. Si on envisage de réaliser de telles mesures, les échantillons devraient alors être soumis à des procédures d'extraction appropriées de sorte que la substance parente puisse être quantifiée séparément. Lorsqu'un produit de dégradation détecté représente un pourcentage significatif (p. ex. > 10 %) de la radioactivité mesurée dans les organismes d'essai à l'état quasi stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption, on recommande l'identification de ces produits de dégradation (5).

68. Du fait de la faible biomasse individuelle, il est souvent impossible de déterminer la concentration de la substance d'essai dans chacun des vers, sauf à utiliser l'espèce d'essai *Branchiura sowerbyi* (poids humide: 40 à 50 mg par ver) (11). Par conséquent, le regroupement d'individus échantillonnés à partir d'un récipient d'essai donné est acceptable, mais ceci restreint les procédures statistiques pouvant s'appliquer aux données. Si une procédure et une puissance statistiques spécifiques sont des considérations importantes, alors l'essai devrait comprendre un nombre adéquat de chambres d'essai, d'animaux d'essais et/ou d'expériences identiques adaptés aux quantités, à la procédure et à la puissance voulues.
69. On recommande d'exprimer le FBA à la fois comme une fonction du poids total humide, du poids total sec et si nécessaire (p. ex. pour des substances fortement lipophiles), comme une fonction de la teneur en lipide et du COT du sédiment. La teneur en lipide doit être déterminée par des méthodes adaptées (48) (49). On peut recommander la technique d'extraction au chloroforme/méthanol (50) comme une méthode standard (48). Toutefois, afin d'éviter l'utilisation de solvants chlorés, il est possible d'utiliser une modification, qui a fait l'objet d'un essai comparatif interlaboratoires, de la méthode de Bligh & Dyer (50); celle-ci est décrite dans (51). Comme les diverses méthodes ne conduisent pas à des valeurs identiques (48), il est important de détailler la méthode employée. Lorsque cela est possible, c.-à-d. si on dispose de suffisamment de tissu de vers, la teneur en lipide est mesurée dans le même échantillon ou extrait que celui produit pour l'analyse de la substance d'essai, puisqu'il est souvent nécessaire d'éliminer les lipides de l'extrait avant de pourvoir le chromatographe (5). Toutefois, il est plus pratique d'utiliser des animaux témoins acclimatés au moins pour démarrer ou — de préférence — à la fin de la phase d'absorption pour mesurer la teneur en lipide, p. ex. dans trois échantillons.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

70. On obtient la courbe d'absorption de la substance d'essai en portant, en échelle linéaire, la concentration de la substance d'essai dans/sur les vers durant la phase d'absorption en fonction du temps. Si la courbe a atteint un plateau, calculer le FBA_{ss} à l'état quasi stationnaire:

$$\frac{C_a \text{ à l'état quasi stationnaire ou au 28}^\circ \text{ jour (moyenne)}}{C_s \text{ à l'état quasi stationnaire ou au 28}^\circ \text{ jour (moyenne)}}$$

71. Déterminer le facteur de bioaccumulation cinétique (FBA_k) comme le rapport de k_s/k_e . La constante d'élimination (k_e) est généralement déterminée à partir de la courbe d'élimination (c.-à-d. d'un tracé de la concentration de la substance d'essai dans les vers durant la phase d'élimination). La constante de vitesse d'absorption k_s est ensuite calculée à partir de la cinétique de la courbe d'absorption. La méthode préférée pour l'obtention du FBA_k et des constantes de vitesse, k_s et k_e , consiste à utiliser des méthodes d'estimation des paramètres non linéaires à l'aide d'un ordinateur (voir l'Appendice 2). Si l'élimination n'est à l'évidence pas du premier ordre, alors des modèles plus complexes devraient être utilisés (26) (27) (52).
72. Le facteur d'accumulation biote-sédiment (BSAF) est déterminé en normalisant le FBA_k par rapport à la teneur en lipide des vers et à la teneur en carbone organique total du sédiment.

Interprétation des résultats

73. Les résultats devraient être interprétés avec précaution lorsque les concentrations mesurées lors des essais sont à des niveaux proches de la limite de détection de la méthode analytique employée.
74. Des courbes d'absorption et d'élimination clairement définies sont une indication de données de bioaccumulation de bonne qualité. En général, pour des études bien conçues, les limites de confiance des valeurs de FBA ne devraient pas dépasser 25 % (5).

Rapport d'essai

75. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes.

Substance d'essai

- nature physique et propriétés physico-chimiques, p. ex. $\log K_{ow}$, solubilité dans l'eau;
- données sur l'identification de la substance chimique; provenance de la substance d'essai, identités et concentrations des solvants éventuellement utilisés;
- dans le cas de radiomarquage, la position précise des atomes marqués, la radioactivité spécifique et le pourcentage de radioactivité associé aux impuretés.

Espèces d'essai

- nom scientifique, souche, origine, pré-traitement éventuel, acclimatation, âge, plage de taille, etc.

Conditions de l'essai

- procédure utilisée pour l'essai (p. ex. statique, semi-statique, ou dynamique);
- type et caractéristiques de l'éclairement utilisé et photopériode(s);
- conception de l'essai (p. ex. nombre, matériau et dimension des chambres d'essai, volume d'eau, masse et volume de sédiment, vitesse de remplacement de l'eau (pour les procédures dynamiques ou semi- statiques), éventuelle aération utilisée avant et durant l'essai, nombre d'expériences identiques, nombre de vers par expérience identique, nombre de concentrations d'essai, durée des phases d'absorption et d'élimination, fréquence d'échantillonnage);
- méthode de préparation de la substance d'essai et d'application ainsi que les raisons du choix d'une méthode donnée;
- concentrations testées nominales;
- source des constituants de l'eau et du sédiment artificiels ou — si un milieu naturel est utilisé — origine de l'eau et du sédiment, description d'un éventuel prétraitement, résultats d'une éventuelle démonstration de l'aptitude des animaux d'essai à vivre et/ou à se reproduire dans le milieu utilisé, caractéristiques du sédiment (pH et teneur en ammoniac de l'eau interstitielle (pour les sédiments naturels), teneur en carbone organique (COT), distribution de taille de particule (pourcentage de sable, de limon et d'argile), teneur en eau en pourcentage et toutes autres mesures réalisées) et caractéristiques de l'eau (pH, dureté, conductivité, température, concentration en oxygène dissous, niveaux de chlore résiduels (s'il est mesuré) et toutes autres mesures réalisées);
- poids sec mesuré et nominal en % du poids humide (ou rapport poids sec/poids humide) du sédiment artificiel, poids sec mesuré en % du poids humide (ou rapport poids sec/poids humide) pour les sédiments naturels;
- qualité de l'eau dans les chambres d'essai, caractérisée par sa température, son pH, sa teneur en ammoniac, sa dureté totale et sa concentration en oxygène dissous;
- informations détaillées sur le traitement des échantillons d'eau, de sédiment et de vers, y compris les détails concernant la préparation, le stockage, les procédures d'enrichissement en substance d'essai, l'extraction et les procédures analytiques (et leur précision) pour la substance d'essai et la teneur en lipide, et les méthodes de récupération de la substance d'essai.

Résultats

- mortalité des vers témoins et des vers dans chaque chambre d'essai et éventuels effets sous-létaux observés, y compris un comportement anormal (p. ex. évitement du sédiment, présence ou absence de coprolithes, absence de reproduction);
- mesure du poids sec en % du poids humide (ou rapport poids sec/poids humide) du sédiment et des organismes d'essai (utiles pour la normalisation);
- teneur en lipide des vers;
- courbe montrant les cinétiques d'absorption et d'élimination de la substance d'essai chez les vers, et la durée pour atteindre l'état quasi stationnaire;
- C_a , C_s et C_w (avec écart type et étendue, si nécessaire) pour toutes les dates d'échantillonnage (C_a exprimé en g.kg^{-1} de poids humide et sec de l'ensemble du corps, C_s exprimé en g.kg^{-1} de poids humide et sec de sédiment, et C_w en mg.l^{-1}). Si un facteur d'accumulation biote-sédiment (BSAF, voir la définition en Appendice 1) est nécessaire (p. ex. pour une comparaison des résultats entre deux essais ou plus réalisés avec des animaux de teneur en lipide différente), C_a devrait en plus être exprimé en g.kg^{-1} de teneur en lipide de l'organisme et C_s devrait être exprimé en g.kg^{-1} de carbone organique (CO) du sédiment;

- on peut également rapporter en plus les données suivantes: FBA (exprimé en kg de sédiment humide. kg^{-1} de ver humide), constante de vitesse d'absorption sédimentaire k_s (exprimée en g de sédiment humide. kg^{-1} de vers humides. j^{-1}), et la constante de vitesse d'élimination k_e (exprimée en j^{-1}); BSAF (exprimé en kg de CO du sédiment. kg^{-1} de teneur en lipide des vers);
- résidus non éliminés (RNE) à la fin de la phase d'élimination;
- le cas échéant: les pourcentages de substance parente, les produits de dégradation et les résidus liés (c.-à-d. le pourcentage de substance d'essai ne pouvant être extraite par les méthodes d'extraction courantes) détectés dans les animaux d'essai;
- méthodes utilisées pour les analyses statistiques des données.

Évaluation des résultats

- conformité des résultats avec les critères de validité tels qu'ils sont listés au paragraphe 21;
 - résultats inattendus ou inhabituels, p. ex. élimination incomplète de la substance d'essai des animaux d'essai; dans ce cas, les résultats d'une éventuelle étude préliminaire peuvent fournir des informations utiles
-

Appendice 1

Définitions et unités

Sédiment artificiel, ou sédiment formulé, reconstitué ou synthétique: mélange de matériaux utilisé pour simuler les composants physiques d'un sédiment naturel.

Bioaccumulation: augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant. La bioaccumulation est le résultat combiné des processus de bioconcentration et de bioamplification (voir ci-dessous).

Facteur de bioaccumulation (FBA): concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai (C_a en g.kg^{-1} de poids humide ou sec) divisée par la concentration de la substance dans le milieu environnant (C_s en g.kg^{-1} de poids de sédiment humide ou sec) à tout instant durant la phase d'absorption d'un essai de bioaccumulation. Afin de conserver le lien avec C_a et C_s , le FBA est exprimé en $\text{kg de sédiment.kg}^{-1}$ de ver (15).

Les facteurs de bioaccumulation calculés directement à partir du rapport de la constante de vitesse d'absorption sédimentaire divisée par la constante de vitesse d'élimination (k_s et k_e , respectivement — voir ci-dessous) sont dénommés facteurs de bioaccumulation cinétique (FBA_k).

Bioconcentration: augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, résultant exclusivement de l'absorption via la surface du corps, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant.

Bioamplification: augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, résultant principalement de l'absorption d'aliments ou de proies contaminés, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans l'alimentation ou la proie. La bioamplification peut conduire à un transfert ou à une accumulation de la substance d'essai dans les réseaux trophiques.

Facteur d'accumulation biote-sédiment (BSAF): concentration de la substance d'essai à l'état quasi stationnaire normalisée par rapport aux lipides dans/sur l'organisme d'essai divisée par la concentration de la substance normalisée par rapport au carbone organique, dans le sédiment à l'état quasi stationnaire. C_a est alors exprimée en g kg^{-1} de teneur en lipides de l'organisme, et C_s en g kg^{-1} de teneur en carbone organique du sédiment.

Période de conditionnement: sert à stabiliser le composant microbien du sédiment et à enlever p. ex. l'ammoniaque provenant des composants du sédiment; elle a lieu avant l'enrichissement du sédiment avec la substance d'essai. Généralement, une fois le conditionnement terminé, l'eau surjacente est éliminée.

Élimination d'une substance d'essai: perte de cette substance par les tissus de l'organisme d'essai selon des processus actifs ou passifs survenant indépendamment de la présence ou de l'absence de la substance d'essai dans le milieu environnant.

Phase d'élimination: durée, suite au transfert des organismes d'essai depuis un milieu contaminé dans un milieu ne contenant pas la substance d'essai, durant laquelle est étudiée l'élimination (ou la perte nette) de la substance par les organismes.

Constante de vitesse d'élimination (k_e): valeur numérique définissant la vitesse de réduction de la concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai, suite au transfert des organismes d'essai depuis un milieu contenant la substance d'essai vers un milieu ne contenant pas la substance; k_e est exprimé en j^{-1} .

Période d'équilibration: utilisée afin de tenir compte de la distribution de la substance d'essai entre la phase solide, l'eau interstitielle et l'eau surjacente; elle a lieu après l'enrichissement du sédiment avec la substance d'essai et avant l'addition des organismes d'essai.

Coefficient de partage octanol-eau (K_{oe}): rapport des solubilités de la substance dans le n-octanol et dans l'eau à l'équilibre; il est parfois exprimé par P_{oe} . Le logarithme de K_{oe} ($\log K_{oe}$) est utilisé comme indicateur du potentiel de bioaccumulation de la substance par les organismes aquatiques.

Coefficient de partage carbone organique-eau (K_{oc}): rapport de la concentration d'une substance dans/sur la fraction carbone organique d'un sédiment à la concentration de la substance dans l'eau à l'équilibre.

Eau surjacente: eau se trouvant au-dessus du sédiment dans le récipient d'essai.

Plateau ou état quasi stationnaire: définit l'équilibre entre les processus d'absorption et d'élimination survenant simultanément durant la phase d'exposition. L'état quasi stationnaire est atteint, dans le tracé du FBA pour chaque période d'échantillonnage en fonction du temps, lorsque la courbe devient parallèle à l'axe des temps et que trois analyses successives de FBA réalisées sur des échantillons pris à intervalles d'au moins deux jours se tiennent dans 20 % et qu'il n'y a pas de différence statistique significative entre les trois périodes d'échantillonnage. Pour les substances d'essai absorbées lentement, des intervalles plus appropriés seraient de sept jours (5).

Eau interstitielle, ou eau des pores: eau occupant l'espace entre les particules du sédiment ou du sol.

Constante de vitesse d'absorption sédimentaire (k_s): valeur numérique définissant la vitesse d'augmentation de la concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai résultant de l'absorption de la phase sédimentaire. k_s est exprimé en g de sédiment.kg⁻¹ de ver.j⁻¹.

Sédiment enrichi: sédiment auquel une substance d'essai a été ajoutée.

Facteur de bioaccumulation à l'état quasi stationnaire (FBA_{ss}): FBA à l'état quasi stationnaire et n'évolue pas significativement dans le temps, la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant (C_s en g.kg⁻¹ de poids de sédiment humide ou sec) étant constante sur cette durée.

Phase d'absorption ou d'exposition: durée pendant laquelle les organismes d'essai sont exposés à la substance d'essai.

Appendice 2

Calcul des paramètres d'absorption et d'élimination

Le critère d'évaluation principal d'un essai de bioaccumulation est le facteur de bioaccumulation, FBA. Il est possible de calculer le FBA en divisant la concentration de la substance d'essai dans l'organisme d'essai, C_a , par la concentration de la substance d'essai dans le sédiment, C_s , à l'état quasi stationnaire. Si l'état quasi stationnaire n'est pas atteint durant la phase d'absorption, le FBA est calculé de la même manière pour le jour 28. Toutefois, on doit indiquer si le FBA est basé, ou non, sur des concentrations à l'état quasi stationnaire.

Les méthodes préférées pour l'obtention du facteur de bioaccumulation cinétique (FBA_k), de la constante de vitesse d'absorption sédimentaire (k_s) et de la constante de vitesse d'élimination (k_e) consistent à utiliser des méthodes d'estimation des paramètres non linéaires de manière informatique. Pour une série temporelle de facteurs d'accumulation (FA) moyens donnée (C_a , valeurs moyennes pour chaque date d'échantillonnage/ C_s , valeurs moyennes pour chaque d'échantillonnage = FA) de la phase d'absorption basée sur le poids humide de ver et de sédiment, et l'équation modèle

$$FA(t) = FBA \times (1 - e^{k_e \times t}) \quad [\text{équation 1}]$$

où $FA(t)$ est le rapport de la concentration de la substance d'essai dans les vers et de sa concentration dans le sédiment à un instant (t) quelconque de la phase d'absorption, ces programmes informatiques calculent les valeurs de FBA_k , k_s et k_e .

Lorsqu'on a atteint un état quasi stationnaire durant la phase d'absorption (c.-à-d. $t = \infty$), il est possible de réduire l'équation 1 à:

$$BAF_k = \frac{k_s}{k_e} \quad [\text{équation 2}]$$

où

k_s = constante de vitesse d'absorption [en g de sédiment.kg⁻¹ de ver.j⁻¹]

k_e = constante de vitesse d'élimination [j⁻¹]

Ensuite $k_s/k_e \times C_s$ donne une valeur approchée de la concentration de la substance d'essai dans le tissu du ver à l'état quasi stationnaire ($C_{a,ss}$).

Le facteur d'accumulation biote-sédiment (BSAF) doit être calculé comme suit:

$$BSAF = BAF_k \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

où f_{oc} est la fraction de carbone organique dans le sédiment, et f_{lip} est la fraction de lipide dans le ver, toutes deux basées soit sur le poids sec, soit sur le poids humide.

Pour une série temporelle donnée de valeurs de concentrations, il est possible de modéliser les cinétiques d'élimination en utilisant les équations du modèle suivantes et un calcul informatique fondé sur une méthode d'estimation des paramètres non linéaire.

On recommande d'utiliser le résidu corporel moyen mesuré à la fin de la phase d'absorption comme point de départ par défaut. L'utilisation de la valeur modélisée/estimée à partir de la phase d'absorption ne devrait être utilisée que, p. ex. si la valeur mesurée s'écarte significativement du résidu corporel modélisé. Voir également le paragraphe 50 pour une variante de pré-exposition des vers destinés à l'élimination; avec cette approche, des échantillons de ces vers pré-exposés au jour 0 de la phase d'élimination sont supposés fournir une valeur du résidu corporel réaliste, avec laquelle il est possible de démarrer la cinétique d'élimination.

Si le tracé des données en fonction du temps indique une décroissance exponentielle constante de la concentration de la substance d'essai dans les animaux, l'évolution temporelle de l'élimination peut être décrite par un modèle à un compartiment (équation 4).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [\text{équation 3}]$$

Les processus d'élimination semblent parfois évoluer en deux étapes, en montrant une décroissance rapide de C_a au cours des premières étapes, qui évolue vers une perte plus lente des substances d'essai dans les étapes ultérieures de l'élimination (8) (19) (26)). Les deux étapes peuvent être interprétées en faisant l'hypothèse de l'existence de deux compartiments dans l'organisme; compartiments à partir desquels la substance d'essai est éliminée à différentes vitesses. Dans ces cas particuliers, il convient d'étudier attentivement la littérature (15) (16) (17) (25).

L'équation ci dessous, par exemple, décrit une élimination à deux compartiments (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \quad [\text{équation 4}]$$

A et B représentent les dimensions des compartiments (en pourcentage du résidu de tissu total), où A est le compartiment éliminant rapidement la substance et B est le compartiment où l'élimination de la substance d'essai est la plus lente. La somme de A et de B fait 100 % de l'ensemble du volume du compartiment animal à l'état quasi stationnaire. k_a et k_b représentent les constantes d'élimination correspondantes [j^{-1}]. Si le modèle à deux compartiments correspond aux données de dépuration, il est possible de calculer la constante de vitesse d'absorption k_s comme suit (53) (54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \quad [\text{équation 5}]$$

Quoi qu'il en soit, ces équations modèles doivent être utilisées avec précaution, en particulier lorsque des modifications de la biodisponibilité de la substance d'essai surviennent durant l'essai (42).

En variante aux équations modélisées décrites ci-dessus, il est également possible de calculer les cinétiques (k_s et k_e) en un essai, en appliquant un modèle de cinétique du premier ordre à toutes les données des phases d'absorption et d'élimination ensemble. Pour une description d'une méthode pouvant permettre un tel calcul combiné des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, consulter les références (55), (56) et (57).

Les résidus non éliminés (RNE) devraient être calculés comme un critère d'évaluation secondaire en multipliant le rapport de la concentration moyenne dans les vers (C_a) au dixième jour de la phase d'élimination à la concentration moyenne dans les vers (C_a) à l'état quasi stationnaire (28^e jour de la phase d'absorption) par 100:

$$RNE_{10j}[\%] = \frac{C_a \text{ à la fin de l'élimination (moyenne)} \times 100}{C_a \text{ à l'état quasi stationnaire (moyenne)}}$$

Appendice 3

Exemple de planning d'échantillonnage pour un essai de bioaccumulation sur 28 jours**a) Phase d'absorption (incluant une phase d'équilibration de 4 jours)**

Jour	Activités
- 6	Préparation d'une suspension de tourbe pour le sédiment, conditionnement de la suspension durant 48 h;
- 4	Enrichissement du sédiment ou d'une fraction du sédiment; mélange de tous les constituants du sédiment; prélèvement d'échantillons de sédiment des sédiments témoins traité et solvant pour détermination de la concentration en élément d'essai; ajout d'eau surjacente; incubation dans les conditions de l'essai (phase d'équilibration);
- 3/- 2	Séparation des organismes d'essai de la culture pour acclimatation;
0	Mesure de la qualité de l'eau (voir le paragraphe 52); retrait d'expériences identiques pour la prise d'échantillons d'eau et de sédiment pour la détermination de la concentration de substance d'essai; répartition aléatoire des vers dans les chambres d'essai conservation de suffisamment de sous-échantillons de vers pour la détermination des valeurs de bruit de fond analytique; contrôle de l'alimentation en air, dans le cas d'un système fermé;
1	Retrait d'expériences identiques pour échantillonnage; contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers, de la qualité de l'eau (voir le paragraphe 56); prélèvement d'échantillons d'eau, de sédiment et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai;
2	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température;
3	Comme au 1 ^{er} jour;
4 - 6	Comme au 2 ^e jour;
7	Comme au 1 ^{er} jour; si nécessaire, compenser l'évaporation de l'eau;
8 - 13	Comme au 2 ^e jour;
14	Comme au 1 ^{er} jour; si nécessaire, compenser l'évaporation de l'eau;
15 - 20	Comme au 2 ^e jour;
21	Comme au 1 ^{er} jour; si nécessaire, compenser l'évaporation de l'eau
22 - 27	Comme au 2 ^e jour;
28	Comme au 1 ^{er} jour; mesure de la qualité de l'eau (voir le paragraphe 52); fin de la phase d'absorption; conservation de suffisamment de sous-échantillons de vers pour la détermination des valeurs de bruit de fond analytique, du poids sec et humide et de la teneur en lipide; transfère des vers depuis les expériences identiques exposées restantes vers des récipients contenant du sédiment propre pour la phase d'élimination (sans purge de l'intestin); échantillonnage de l'eau, du sédiment et des vers des témoins solvants; échantillonnage des solutions pièges, le cas échéant.
	Les activités de pré-exposition (phase d'équilibration) devraient être programmées en tenant compte des propriétés de la substance d'essai. Si nécessaire, conditionnement du sédiment préparé sous de l'eau surjacente à 20 ± 2 °C durant 7 jours; dans ce cas, préparation préalable du sédiment!
	Les activités décrites pour le 2e jour devraient être réalisées quotidiennement (au moins les jours travaillés).

b) Phase d'élimination

Jour	Activités
- 6	Préparation d'une suspension de tourbe pour le sédiment, conditionnement de la suspension durant 48 h;
- 4	Mélange de tous les constituants du sédiment; prélèvement d'échantillons de sédiment des sédiments témoins traité et solvant pour détermination de la concentration en élément d'essai; ajout d'eau surjacente; incubation dans les conditions de l'essai;
0 (28 ^e jour d'absorption)	Mesure de la qualité de l'eau (voir le paragraphe 52); transfert des vers depuis les de la phase expériences identiques exposées restantes vers les récipients contenant du sédiment propre; après 4 à 6 h , retrait d'expériences identiques pour la prise d'échantillons d'eau, de sédiment et de vers pour la détermination de la concentration en substance d'essai; répartition aléatoire des vers dans les chambres d'essai;
1	Retrait d'expériences identiques pour échantillonnage; contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers, de la qualité de l'eau (voir le paragraphe 52); prélèvement d'échantillons d'eau, de sédiment et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai;
2	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température;
3	Comme au 1 ^{er} jour;
4	Comme au 2 ^e jour;
5	Comme au 1 ^{er} jour;
6	Comme au 2 ^e jour;
7	Comme au 1 ^{er} jour; si nécessaire, compenser l'évaporation de l'eau;
8 - 9	Comme au 2 ^e jour;
10	Comme au 1 ^{er} jour; fin de la phase d'élimination; mesure de la qualité de l'eau (voir le paragraphe 52); échantillonnage de l'eau, du sédiment et des vers des témoins solvants; échantillonnage des solutions pièges, le cas échéant.
	La préparation du sédiment avant de débiter la phase d'élimination doit être conduite de la même manière que préalablement à la phase d'absorption.
	Les activités décrites pour le 2 ^e jour devraient être réalisées quotidiennement (au moins les jours travaillés).

Appendice 4

Quelques caractéristiques physico-chimiques d'une eau de dilution acceptable

CONSTITUANT	CONCENTRATIONS
Matière particulaire	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 µg/l
Ammoniaque non ionisée	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux plus biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

COMPOSITION DE L'EAU RECONSTITUÉE RECOMMANDÉE

a) Solution de chlorure de calcium

Dissoudre 11,76 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau déionisée; ajuster à 1 l avec de l'eau déionisée

b) Solution de sulfate de magnésium

Dissoudre 4,93 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau déionisée; ajuster à 1 l avec de l'eau déionisée

c) Solution de bicarbonate de sodium

Dissoudre 2,59 g de NaHCO_3 dans de l'eau déionisée; ajuster à 1 l avec de l'eau déionisée

d) Solution de chlorure de potassium

Dissoudre 0,23 g de KCl dans de l'eau déionisée; ajuster à 1 l avec de l'eau déionisée

Tous les produits chimiques doivent être de qualité analytique.

La conductivité de l'eau distillée ou déionisée ne doit pas dépasser $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

25 ml de chacune des solutions a) à d) sont mélangés et le volume total est ajusté à 1 l avec de l'eau déionisée. La somme des concentrations en ions calcium et magnésium dans cette solution est de 2,5 mmol/l.

Le rapport ionique Ca:Mg est de 4:1 et Na:K est de 10:1. La capacité acide $K_{\text{S4,3}}$ de cette solution est de 0,8 mmol/l.

Aérer l'eau de dilution jusqu'à atteindre la saturation en oxygène, puis la stocker durant approximativement deux jours sans aération supplémentaire avant utilisation.

Le pH d'une eau de dilution acceptable doit être dans la plage de 6 à 9.

Appendice 5

Sédiment artificiel — recommandations pour la préparation et le stockage

Contrairement aux exigences de la méthode d'essai C.8 (40), on recommande une teneur en tourbe de 2 % pour le sédiment artificiel plutôt que de 10 %, du poids sec, afin de correspondre à une teneur organique faible à modérée des sédiments naturels (58).

Pourcentage des constituants secs du sédiment artificiel:

Constituant	Caractéristiques	% du sédiment sec
Tourbe	Tourbe de sphaigne, degré de décomposition: "moyen", séchée à l'air, pas de résidus végétaux visibles, finement broyée (taille de particules $\leq 0,5$ mm)	$2 \pm 0,5$
Sable de quartz	Taille de grains: ≤ 2 mm, mais > 50 % des particules doivent être dans la plage de 50 à 200 μm	76
Argile kaolinique	Teneur en kaolinite ≥ 30 %	22 ± 1
Aliments	<i>Folia urticae</i> , poudre de feuilles d' <i>Urtica</i> sp. (ortie brûlante), finement broyées (taille de particules $\leq 0,5$ mm), ou un mélange de feuille en poudre d' <i>Urtica</i> sp. avec de la cellulose alpha (1:1); conformément aux normes de pharmacie, pour la consommation humaine; en plus du sédiment sec	0,4 - 0,5 %
Carbonate de calcium	CaCO_3 , pulvérisé, chimiquement pur, en plus du sédiment sec	0,05 - 1
Eau déionisée	Conductivité ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$, en plus du sédiment sec	30 - 50

Si on s'attend à une concentration élevée en ammoniacque, p. ex. si la substance d'essai est connue pour inhiber la nitrification, il peut être utile de remplacer 50 % de la poudre d'ortie riche en azote par de la cellulose (p. ex., de la poudre de cellulose α , chimiquement pure, taille de particule $\leq 0,5$ mm).

Préparation

La tourbe est séchée à l'air et broyée en une poudre fine (taille de grain $\leq 0,5$ mm, pas de résidus végétaux visibles). Une suspension de la quantité de tourbe voulue est préparée en utilisant une partie de l'eau déionisée devant être ajoutée au sédiment sec [un volume d'eau de $11,5 \times$ le poids sec de tourbe a donné une suspension de tourbe qui a pu être agitée (8)] en utilisant un dispositif d'homogénéisation haute performance.

Le pH de cette suspension est ajusté à $5,5 \pm 0,5$ avec CaCO_3 . La suspension est conditionnée durant au moins deux jours sous agitation douce à 20 ± 2 °C, afin de stabiliser le pH et d'établir une composante microbienne stable. Le pH est de nouveau mesuré et ajusté à $6,0 \pm 0,5$ avec CaCO_3 si nécessaire. Ensuite l'ensemble de la suspension est mélangé aux autres constituants secs, en prenant en compte l'éventuelle part utilisée pour l'enrichissement. L'eau déionisée restante est ajoutée afin d'obtenir un sédiment homogène. Le pH est de nouveau mesuré et ajusté à 6,5 à 7,5 avec CaCO_3 si nécessaire. Toutefois, si on s'attend à un dégagement d'ammoniac, il peut être utile de conserver le pH du sédiment inférieur à 7,0 (p. ex. entre 6,0 et 6,5). Des échantillons du sédiment sont prélevés afin d'en déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Si on s'attend à un dégagement d'ammoniac, le sédiment artificiel peut être conditionné durant sept jours dans les conditions des essais à venir (p. ex. rapport sédiment:eau de 1:4, hauteur de la couche de sédiment comme dans les récipients d'essai) avant enrichissement avec la substance d'essai, c.-à-d. il doit être recouvert d'eau, laquelle doit être aérée. À la fin de la période de conditionnement, l'eau surjacente devra être enlevée et éliminée. Des échantillons du sédiment sont prélevés afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique total (p. ex. 3 échantillons).

Après quoi, le sable de quartz enrichi est mélangé au sédiment pour chaque niveau de traitement, le sédiment est réparti dans les récipients d'essai d'expériences identiques et recouvert avec l'eau d'essai (p. ex. avec un rapport sédiment:eau de 1:4, une hauteur de la couche de sédiment comme dans les récipients d'essai). Les récipients sont ensuite incubés dans les conditions de l'essai à venir. Ceci définit le point de départ de la période d'équilibration. L'eau surjacente doit être aérée.

La source de nourriture choisie doit être ajoutée avant ou durant l'enrichissement du sédiment avec la substance d'essai. Elle peut être mélangée dès le départ à la suspension de tourbe (voir plus haut). Toutefois, il est possible d'éviter une dégradation excessive de la source de nourriture avant addition des organismes d'essai — p. ex. en cas de période d'équilibration longue — en réduisant autant que possible la durée entre l'addition des aliments et le début de l'exposition. Afin d'assurer que la nourriture est en contact suffisant avec le composé d'essai, la source de nourriture ne doit pas être mélangée avec le sédiment plus d'une journée après l'enrichissement du sédiment avec la substance d'essai. On peut faire une exception lorsque la durée de la période d'équilibration conduit à une dégradation microbienne excessive des aliments avant ajout des organismes d'essai. Des échantillons du sédiment sont prélevés afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique total (p. ex. 3 échantillons de sédiment enrichis ou témoins).

Le poids sec des composants (tourbe, sable, kaolin) devrait être rapporté en g et en pourcentage du poids sec total.

Le volume d'eau devant être ajouté aux composants secs durant la préparation du sédiment devrait également être rapporté en pourcentage du poids total (p. ex. 100 % de poids sec + 46 % d'eau signifie qu'un poids sec de 1 000 g reçoit un total de 460 ml d'eau, ce qui conduit à 1 460 g de sédiment humide).

Stockage

Les constituants secs du sédiment artificiel peuvent être stockés dans un endroit frais, sec à température ambiante. Le sédiment humide préparé peut être stocké (uniquement pour un usage en culture) à 4 ± 2 °C à l'abri de la lumière durant 2 à 4 semaines à compter du jour de la préparation (8).

Un sédiment enrichi avec la substance d'essai devrait être utilisé immédiatement, sauf si des informations spécifient qu'il est possible de stocker ce sédiment sans affecter la toxicité et la biodisponibilité de la substance d'essai. Des échantillons de sédiment enrichi peuvent être stockés dans les conditions recommandées pour la substance d'essai donnée jusqu'à analyse.

Appendice 6

Espèces oligochètes recommandées pour les essais de bioaccumulation***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, oligochaeta**

L'oligochète tubificidé (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) vie dans les sédiments d'eau douce dans des tubes enduits de mucus. Les vers vivent dans ces tubes, la tête en bas, ingérant les particules de sédiment en utilisant les micro-organismes et les débris organiques associés. La portion postérieure ondule généralement dans l'eau surjacent pour permettre au ver de respirer. Bien que cette espèce se rencontre dans une grande variété de sédiments sur tout l'hémisphère nord, *Tubifex tubifex* affectionne particulièrement les grains fins (59). Les raisons de l'adéquation de cette espèce pour des essais écotoxicologiques sont décrites, par exemple, dans (8) (29) (31) (39) (60) (62) (63).

Méthodes de culture

Afin de disposer d'un nombre suffisant de *Tubifex tubifex* pour conduire les essais de bioaccumulation, les vers devront être conservés dans une culture de laboratoire permanente. Un système consistant en un sédiment artificiel basé sur le sol artificiel de la méthode d'essai C.8 (40) et une eau reconstituée conformément à la méthode d'essai C.1 est recommandé pour la culture de *T. tubifex* (8).

Des récipients en verre ou en acier inoxydable d'une hauteur de 12 à 20 cm peuvent être utilisés comme récipients de culture. Chaque récipient de culture est chargé d'une couche de sédiment artificiel humide préparé selon la description de l'Appendice 5. L'épaisseur de la couche de sédiment doit permettre aux vers d'adopter un comportement d'enfouissement naturel (au minimum 2 cm de profondeur pour *T. tubifex*). Une eau reconstituée est ajoutée au système. Opérer soigneusement afin de ne pas perturber le sédiment. Le volume d'eau est doucement aéré (p. ex. 2 bulles par seconde avec un air filtré à 0,45 µm) via une pipette pasteur placée 2 cm au-dessus de la surface du sédiment. La température de culture recommandée est de 20 ± 2 °C.

Les vers sont ajoutés au système de culture avec une charge maximum de 20 000 individus/m² de surface de sédiment. Une charge supérieure peut provoquer une réduction des vitesses de croissance et de reproduction (43).

Dans des cultures en sédiment artificiel, les vers doivent être nourris. Un régime alimentaire consistant en du poisson finement broyé, p. ex. du TetraMin®, peut servir de nutriment supplémentaire (8); Klerks 1994, communication personnelle. La fréquence de l'alimentation doit permettre une croissance et une reproduction suffisantes et doit maintenir au minimum l'accumulation d'ammoniaque et la croissance de champignons dans la culture. La nourriture peut être administrée deux fois par semaine (p. ex. à raison de 0,6 à 0,8 mg par cm² de surface sédimentaire). L'expérience a montré que l'utilisation de nourriture mise en suspension et homogénéisée dans de l'eau déionisée peut faciliter une distribution homogène de la nourriture sur la surface du sédiment, dans les récipients de culture.

Afin d'éviter l'accumulation d'ammoniaque, l'eau surjacent devrait être renouvelée en utilisant un système dynamique ou, manuellement, au moins une fois par semaine. Dans les cultures de réserve, le sédiment devrait être remplacé tous les trois mois.

Si seuls des vers adultes sont nécessaires, il est possible de réaliser l'échantillonnage des vers à partir de la culture en tamisant le sédiment de culture au travers d'un tamis de 1 mm. Pour conserver des cocons, il convient d'utiliser un tamis de 0,5 mm et pour les jeunes, un tamis de 0,25 mm. Une fois que le sédiment est passé au travers, les tamis peuvent être placés dans de l'eau reconstituée. Les vers quittent le tamis et peuvent ensuite être prélevés dans l'eau en utilisant une pince en acier souple ou une pipette dont l'extrémité a été adoucie à la flamme.

Seuls des spécimens intacts et clairement identifiés de *Tubifex tubifex* [p. ex. (64)] sont utilisés pour démarrer l'essai ou de nouvelles cultures. Les vers malades ou blessés ainsi que les cocons infestés par une mycose doivent être éliminés.

Une culture synchronisée peut fournir des vers d'un âge spécifique à intervalles adaptés à la demande. De nouveaux récipients de culture sont mis en place aux intervalles voulus (p. ex. toutes les deux semaines), en démarrant avec des animaux d'âge connu (p. ex. des cocons). Dans les conditions de culture décrites ici, les vers sont adultes après 8 à 10 semaines. Les cultures peuvent être "récoltées" lorsque les vers ont formé de nouveaux cocons, p. ex. après dix semaines. Les adultes échantillonnés peuvent être utilisés pour les essais, et de nouvelles cultures peuvent être démarrées avec les cocons.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, oligochaeta**

Lumbriculus variegatus (Lumbriculidae, Oligochaeta) est également un habitant des sédiments d'eau douce présent partout sur terre et il est largement utilisé dans des essais écotoxicologiques. On peut trouver des informations sur la biologie, les conditions de culture et la sensibilité de l'espèce dans (1) (6) (9) (36). Il est également possible de cultiver *Lumbriculus variegatus* dans le sédiment artificiel recommandé pour *T. tubifex* conformément à (8) avec certaines limitations. Comme, dans la nature, *L. variegatus* préfère des sédiments plus grossiers que *T. tubifex* (59), les cultures de laboratoire avec le sédiment artificiel utilisé pour *T. tubifex* peuvent s'éteindre après 4 à 6 mois. L'expérience a montré que *L. variegatus* peut être conservé dans un substrat sableux (p. ex. du quartz, des graviers fins) dans un système dynamique, en utilisant une alimentation à base de poissons, durant plusieurs années sans renouvellement du substrat. Un avantage majeur de *L. variegatus* par rapport à d'autres espèces d'oligochètes est sa rapidité de reproduction, qui conduit à une augmentation rapide de la biomasse des populations cultivées en laboratoire (1) (6) (9) (10).

Méthodes de culture

Les conditions de culture pour *Lumbriculus variegatus* sont détaillées par Phipps et al. (1993) (10), Brunson et al. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Un bref résumé de ces conditions est donné ci-dessous.

Les vers peuvent être cultivés dans de grands aquariums (57 à 80 l) à 23 °C avec une photopériode de 16L:8D (100 à 1 000 lux) en utilisant une eau naturelle renouvelée quotidiennement (45 à 50 l par aquarium). Le substrat est préparé en découpant des serviettes en papier brun non blanchi en rubans, lesquels peuvent ensuite être mélangés à l'eau de culture durant quelques secondes pour donner de petits morceaux de substrat de papier. Ce substrat peut ensuite être utilisé directement dans les aquariums de culture de *Lumbriculus* en couvrant le fond du récipient, ou être stocké congelé dans de l'eau déionisée pour une utilisation ultérieure. Un substrat neuf dans le réservoir durera généralement environ deux mois.

Chaque culture de vers démarre avec 500 à 1 000 vers et est alimentée par 10 ml d'une suspension contenant 6 g d'un starter à base de truite, 3 fois par semaine, en conditions dynamiques. Les cultures statiques ou semi-statiques devraient être alimentées moins fréquemment afin d'éviter le développement de bactéries et de champignons. Le substrat de nourriture et de papier devrait être analysé en y recherchant les substances chimiques utilisées dans les essais de bioaccumulation.

Dans ces conditions, le nombre d'individus de la culture double généralement en environ 10 à 14 jours.

Lumbriculus variegatus peut être sorti des cultures p. ex. en transférant soit le substrat avec un filet à mailles fines, soit les organismes en utilisant une pipette de verre à grande ouverture (environ 5 mm de diamètre) dont l'extrémité a été adoucie à la flamme, vers un bécher indépendant. Si du substrat est transféré dans ce bécher, le bécher contenant des vers et du substrat est laissé une nuit dans des conditions dynamiques, ce qui permet d'évacuer le substrat du bécher, alors que les vers restent dans le fond du récipient. Ils peuvent ensuite être introduits dans des récipients de culture fraîchement préparés, ou traités pour l'essai comme cela est indiqué dans (1) et (6). Il conviendra d'éviter les blessures ou l'autotomie des vers, p. ex. en utilisant des pipettes dont les bords ont été adoucis à la flamme, ou des pinces en acier inoxydable pour la manipulation de ces vers.

Un problème critique lors de l'utilisation de *L. variegatus* dans des essais de bioaccumulation concerne son mode de reproduction (architomie suivie de morphallaxie). Cette reproduction asexuée conduit à deux fragments qui, pendant un certain temps, ne s'alimentent pas jusqu'à ce que la partie tête ou queue soit régénérée (p. ex. (36) (37)). Ceci signifie que l'absorption de sédiment et de contaminant par ingestion ne peut avoir lieu en continu chez *L. variegatus* comme chez les tubificidés, qui ne se reproduisent pas par fragmentation.

Par conséquent, une synchronisation doit être réalisée afin de minimiser une reproduction et une régénération non contrôlée, qui s'en suivraient d'une variation importante des résultats des essais. Une telle variation peut survenir, lorsque certains individus, qui se sont fragmentés et par conséquent ne s'alimentent pas durant un certain temps, sont moins exposés à la substance d'essai que les autres individus, qui ne se sont pas fragmentés durant l'essai, p. ex. (38). 10 à 14 jours avant le début de l'exposition, les vers devraient être fragmentés artificiellement (synchronisation) (65). Il est préférable d'utiliser des grands vers, ne montrant, de préférence, pas de signes de fragmentation récente. Ces vers peuvent être placés sur une lame de verre dans une goutte d'eau de culture, et disséqués dans la région

médiane du corps avec un scalpel. Il convient de veiller à ce que les extrémités postérieures soient de taille similaire. On doit ensuite laisser les extrémités postérieures régénérer de nouvelles têtes dans un récipient de culture contenant un substrat identique à celui utilisé dans la culture et de l'eau reconstituée, jusqu'au début de l'exposition. La régénération de nouvelles têtes est indiquée par l'enfouissement des vers synchronisés, dans le substrat (la présence des têtes régénérées peut être confirmée par inspection d'un sous échantillon représentatif au microscope binoculaire). Les organismes d'essai sont par la suite supposés être dans un état physiologique similaire. Ceci signifie que, lorsque de la régénération par morphallaxie survient chez des vers synchronisés en cours d'essai, virtuellement tous les animaux sont supposés être également exposés au sédiment enrichi. L'alimentation des vers synchronisés devrait être réalisée dès que les vers commencent à s'enfouir dans le substrat, ou 7 jours après dissection. Le régime alimentaire devra être comparable à celui des cultures classiques, mais il est recommandé d'alimenter les vers synchronisés avec la même source de nourriture que celle utilisée durant l'essai. Les vers devraient être conservés à la température de l'essai, soit 20 ± 2 °C. Après régénération, des vers complets, intacts, de taille similaire, nageant ou rampant activement lors d'une stimulation douce, devraient être utilisés pour l'essai. Il conviendra d'éviter les blessures ou l'autotomie des vers, p. ex. en utilisant des pipettes dont les bords ont été adoucis à la flamme, ou des pinces en acier inoxydable pour la manipulation de ces vers.

Lorsque *Lumbriculus variegatus* est utilisé pour les essais, du fait du mode de reproduction particulier de cette espèce, le nombre de vers devrait augmenter durant l'essai, si les conditions le permettent (6). Une absence de reproduction lors d'un essai de bioaccumulation avec *L. variegatus* devrait être relevée et prise en compte lors de l'interprétation des résultats.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, oligochaeta (non validé par des essais comparatifs interlaboratoires)**

On trouve *Branchiura sowerbyi* dans une variété de type de sédiment de réservoirs, de lacs, d'étangs et de rivières, initialement dans les régions tropicales. On peut également les trouver dans des zones d'eau chaude de l'hémisphère nord. Toutefois, ils sont plus abondants dans les sédiments de boue argileuse à forte teneur en matière organique. En outre, les vers vivent dans la couche de sédiment. Même l'extrémité postérieure des vers est généralement enfouie. Cette espèce est facilement identifiée par les filaments branchiaux sur la partie postérieure. Les adultes peuvent atteindre une longueur de 9 à 11 cm et un poids humide de 40 à 50 mg. Les vers ont un taux de reproduction élevé, avec un temps de doublement de la population inférieur à 2 semaines, dans les conditions de température et d'alimentation décrites ci-dessous [Aston et al., 1982, (65)]. *B. sowerbyi* a été utilisé à la fois dans des études de toxicité et de bioaccumulation (Marchese & Brinkhurst 1996, (31), Roghair et al. 1996, (67) respectivement).

Méthodes de culture

Un résumé des conditions de culture est donné ci-dessous pour *Branchiura sowerbyi* (fourni par Mercedes R. Marchese, INALI, Argentine, et Carla J. Roghair, RIVM, Pays-Bas).

Il n'existe pas une technique unique pour la culture des organismes d'essai. Il est possible de cultiver les organismes en utilisant un sédiment naturel non contaminé (31). L'expérience a montré qu'un milieu consistant en un sédiment naturel et du sable améliore l'état des vers par rapport au sédiment naturel pur (32) (67). Des béciers de 3 l contenant 1 500 ml de milieu sédiment/eau, consistant en 375 ml de sédiment naturel non contaminé (environ 10 % de carbone organique total; environ 17 % de particules fines ≤ 63 μ m), 375 ml de sable propre (M32), et 750 ml d'eau reconstituée ou d'eau du robinet déchlorée peuvent être utilisés pour la culture (31) (32) (67). Il est également possible d'utiliser des serviettes en papier comme substrat de culture, mais la croissance de population est plus lente que dans un sédiment naturel. Dans des systèmes semi-statiques, la couche d'eau, dans le bécier, est lentement aérée, et l'eau surjacente doit être renouvelée chaque semaine.

Pour démarrer, chaque bécier contient 25 jeunes vers. Après deux mois, les grands vers sont prélevés dans le sédiment avec une pince et sont placés dans un nouveau bécier avec un milieu sédiment/eau fraîchement préparé. L'ancien bécier contient également des cocons et des jeunes vers. De cette manière, il est possible de récolter jusqu'à 400 jeunes vers par bécier. Des vers adultes peuvent être utilisés pour la reproduction durant au moins un an.

Les cultures devraient être maintenues à une température de 21 à 25 °C. Les variations de température devraient être maintenues entre ± 2 °C. Le temps nécessaire au développement embryonnaire à partir de la ponte d'un œuf jusqu'à ce que le jeune quitte le cocon est d'environ trois semaines à 25 °C. La production d'œufs obtenue par un vers survivant de *B. sowerbyi* s'est avérée être dans la plage de 6,36 (31) à 11,2 (30) dans la boue à 25 °C. Le nombre d'œufs par cocon va de 1,8 à 2,8 (66) (69) ou jusqu'à 8 (68).

L'oxygène dissous, la dureté de l'eau, la température et le pH devraient être mesurés chaque semaine. Une alimentation à base de poisson (p. ex. TetraMin®) peut être ajoutée en suspension deux ou trois fois par semaine *ad libitum*. Les vers peuvent également être nourris avec de la salade décongelée *ad libitum*.

Un avantage majeur de cette espèce est la biomasse individuelle élevée (jusqu'à 40 à 50 mg de poids humide par individu). Par conséquent, cette espèce peut être utilisée pour des essais de bioaccumulation de substances d'essai non radiomarquées. Elle peut être exposée dans les systèmes utilisés pour *T. tubifex* ou *L. variegatus* avec un unique individu par expérience (11). Le nombre d'expériences identiques devra toutefois être augmenté, à moins d'utiliser des chambres d'essai plus grandes (11). Par ailleurs, le critère de validité concernant le comportement fouisseur doit être ajusté pour cette espèce.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. Dans ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (2) Commission européenne (CE) (2003) Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I — IV. Office des publications officielles des Communautés européennes (Commission européenne), Luxembourg.
- (3) OCDE (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OCDE Monographie No. 60. Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris.
- (4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. et Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.
- (5) Chapitre C.13 de la présente annexe — Bioconcentration: essai avec renouvellement continu sur les poissons.
- (6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (7) Chapitre C.27 de la présente annexe — Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment dopé.
- (8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.
- (9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. et Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.
- (10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ. Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on "Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

- (13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a *Thalassia* seagrass ecosystem. *Estuaries* 13, 301-310.
- (14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): *Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990.* VCH, Weinheim
- (15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1709-1725.
- (16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. *Wat. Res.* 23, 1443-1450.
- (17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24, 1225-1231.
- (18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhlting, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. et Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29, 1501-1514.
- (20) OCDE (2000). *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures.* Publications de l'OCDE sur l'environnement, la santé et la sécurité, Série sur les essais et l'évaluation N° 23.
- (21) U.S. EPA (1996). *Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines.* OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.
- (22) Chapitres suivants de la présente annexe:
- Chapitre A.4 — Pression de vapeur
 - Chapitre A.5 — Tension superficielle
 - Chapitre A.6 — Solubilité dans l'eau
 - Chapitre A.8 — Coefficient de partage, méthode par agitation en flacon
 - Chapitre A.24 — Coefficient de partage, méthode HPLC
 - Chapitre C.7 — Dégradation — dégradation abiotique: hydrolyse en fonction du pH
 - Chapitre C.4 A-F — Détermination de la biodégradabilité "facile"
 - Chapitre C.19 — Estimation du coefficient d'adsorption (K_{oc}) sur le sol et les boues d'épuration par chromatographie liquide haute performance (HPLC)
 - Chapitre C.29 — Biodégradabilité facile — dégagement de CO₂ dans des flacons hermétiquement clos
- (23) OCDE (1996). *Direct phototransformation of chemicals in water.* Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OCDE, Paris.
- (24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. *Microchem. J.* 43, 165-172.
- (25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J* (Vol. editor: B. Beek): *Bioaccumulation — New Aspects and Developments.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22, 701-707.
- (28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.

- (29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1061-1072.
- (30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. *Aquaculture* 26, 155-160.
- (31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia* 334, 163-168.
- (32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719102027.
- (33) Chapitre C.1 de la présente annexe: Toxicité aiguë vis-à-vis des poissons.
- (34) OCDE (1992c). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques n° 210. Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie. OCDE, Paris.
- (35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.
- (36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 2196-2202.
- (38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- (39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* 8, 111-124.
- (40) Chapitre C.8 de la présente annexe: Toxicité pour les vers de terre.
- (41) Environnement Canada (1995). Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiments de contrôle dopé avec un produit toxique de référence. Série de la protection de l'environnement. Rapport SPE 1/RM/30.
- (42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23, 588-595.
- (43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): *Aquatic Oligochaeta Biology*, 175-184. Plenum Press, New York.
- (44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.
- (45) Hoofman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.
- (46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. *Chemosphere* 32, 1897-1905.
- (47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.
- (48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1431-1436.
- (49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985) Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography*, 30, 1099-1105.

- (50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- (51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- (53) Zok, S., Gorge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Sci. Total Environment* 109/110, 411-421
- (54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische — Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.
- (55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.
- (57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. *Arch. Hydr.* 63, 310-386.
- (60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. *Environ. Sci. Technol.* 21, 785-790.
- (61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 47-67.
- (62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 69-78.
- (63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ.* N°. 22.
- (65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. *Aquaculture* 29, 137-145.

-
- (67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge *Chironomus riparius* and the tubificid oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719101026.
- (68) Aston, R.J. (1984). The culture of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. *Aquaculture* 40, 89-94.
- (69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 278, 267-274.»
-