

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

Essai de toxicité sur *Lumbriculus* dans un système eau-sédiment chargé

INTRODUCTION

1. 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 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. Cette Ligne directrice 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 Ligne directrice consiste à charger le sédiment de la substance d'essai, dans l'intention de l'utiliser pour simuler un sédiment contaminé par le composé 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 dépend 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 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 d'essais.

4. La méthode expérimentale a pour objectif de déterminer les effets d'une substance 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 © OCDE, (2007).

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.

l'aide d'un modèle de régression afin d'estimer la concentration responsable d'un effet de x % (par exemple CE50, CE25, et CE10), 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. La Ligne directrice de l'OCDE No. 218 : "Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment chargé" (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.

PREREQUIS ET RECOMMANDATIONS

6. Il conviendra d'obtenir avant le début de l'étude des informations concernant la substance 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 le composé 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_{oe} ;
- 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'Annexe 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 d'essai servent de témoins. La substance 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 annexe 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 REFERENCE

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'Annexe 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 (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).

VALIDITE 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 METHODE

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 du composé 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 adaptée 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 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 d'essai ou de laisser s'échapper d'autres substances exerçant un effet indésirable sur les animaux de l'essai. Il faut utiliser du Teflon[®], 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'explicitier 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 à la Ligne directrice de l'OCDE 203 (37) comme eau sus-jacente est recommandée; on peut également l'utiliser pour les cultures des vers en laboratoire (voir Annexe 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 CaCO₃/l). La détection d'éventuels micropolluants dans l'eau avant son utilisation devrait fournir des informations utiles (voir, par exemple, Annexe 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 CaCO₃ par litre pour l'eau naturelle. L'Annexe 3 résume d'autres critères caractérisant une eau de dilution acceptable conformément à la Ligne directrice de l'OCDE No. 210 (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 ≤ 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 (CaCO₃), 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 % (± 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'Annexe 4.

23. Les sources de tourbe, d'argile kaolinique, d'aliments et de sable doivent être connues. Outre ceux du (g) ci-dessus, la Ligne directrice de l'OCDE 218 (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'aliment choisie doit être ajoutée avant ou pendant l'introduction dans le sédiment de la substance d'essai. 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'Annexe 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 Annexe 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 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'Annexe 4.

Application de la substance d'essai

28. La substance d'essai doit être introduite dans le sédiment. La faible solubilité dans l'eau de la plupart des substances 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 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 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 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 le produit 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 le produit chimique d'essai ajouté au sédiment est totalement et uniformément distribué 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 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 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 du produit chimique de l'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 d'essai. Ces mesures analytiques de la substance 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 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 d'essai. Les vers sont exposés à chaque concentration de la substance 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 le produit chimique de l'essai et/ou le sédiment. Les concentrations testées dans l'essai préliminaire ne dépasseront pas 1000 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 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 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 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 CME0 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'Annexe 6 présente des informations sur la puissance statistique déterminée au cours de la vérification de l'hypothèse lors de 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 1000 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 1000 mg/kg (poids sec). Habituellement, il est nécessaire de répéter l'expérience six fois tant pour les échantillons traités que pour les témoins. L'Annexe 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 Annexe 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'Annexe 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'Annexe 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'éclairage et d'eau sus-jacente), une phase d'acclimatation, par exemple, de 24 h avec des paramètres de température, d'éclairage 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 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. A 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 d'essai 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 d'essai

Prélèvement des échantillons

53. Il faut prélever des échantillons pour l'analyse chimique du composé 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 ± 20 % de la concentration nominale). Si la substance 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 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 $10000 \pm 600 \times g$ 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 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 d'essai spécifique (par exemple, les échantillons prélevés dans l'environnement sont habituellement stockés à -18 °C dans l'obscurité). Il convient d'obtenir des informations sur les conditions convenant à la substance 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 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 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 d'essai sur le dispositif de prélèvement).

59. Il faut enregistrer et indiquer la récupération de la substance d'essai, la limite de quantification et la limite de détection dans le sédiment et l'eau.

RESULTATS 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 dit de cet essai, il convient de l'évaluer dans la mesure du possible. A 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 et 120 % des concentrations nominales du composé 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 $\pm 20\%$, 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 du composé 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 CE₅₀ 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 $p \leq 0.05$. 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 de sont pas remplies. L'Annexe 6 fournit des informations sur la puissance statistique observée lors 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 cette Ligne directrice, et lorsque les concentrations mesurées de l'essai approchent la limite de détection de la méthode analytique utilisée. Tout écart par rapport à cette Ligne directrice doit être noté.

Rapport d'essai

69. Le rapport d'essai comprend au moins les informations suivantes :

Substance 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 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_{oe} , 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, fréquence des prélèvements) ;
- profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente ;
- méthode de prétraitement de la substance 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 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 d'essai, et récupérations de la substance 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 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 cette Ligne directrice.

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. 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.
- (6) OCDE (2004). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. No. 218 : "Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment chargé" (Adoptée en avril 2004).
- (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. Rapport SPE 1/RM/32. Décembre 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. Ludwighowski & 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) OCDE (1992b). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques No. 203. Poisson, essai de toxicité aigüe. OCDE, Paris.
- (38) OCDE (1992c). Lignes directrices 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 et 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.

ANNEXE 1

DEFINITIONS

Dans le cadre de cette Ligne directrice, les définitions suivantes sont utilisées :

Le coefficient de partage carbone organique-eau (K_{co}) est le rapport de la concentration d'une substance dans/sur la fraction de carbone organique d'un sédiment et de la concentration de substance dans l'eau à l'équilibre.

Le coefficient de partage octanol-eau (K_{oe} ; parfois exprimé par P_{oe}) est le rapport de la solubilité d'une substance dans le n-octanol et dans l'eau à l'équilibre et correspond à la lipophilie d'une substance (Ligne directrice de l'OCDE 117). 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.

La période de conditionnement est 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 d'essai. Habituellement, on élimine l'eau sus-jacente après conditionnement.

La période d'équilibrage est utilisée pour que la substance 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 d'essai et avant l'addition des organismes expérimentaux.

La phase d'exposition est la durée pendant laquelle les organismes expérimentaux sont exposés à la substance d'essai.

Un sédiment formulé ou un sédiment reconstitué, artificiel ou synthétique, est un mélange de matériaux employés pour simuler les composants physiques d'un sédiment naturel.

Le sédiment chargé est le sédiment auquel a été ajoutée la substance d'essai.

L'eau sus-jacente est l'eau qui recouvre le récipient dans le sédiment expérimental.

L'eau interstitielle est l'eau qui occupe les espaces entre les particules de sédiment ou de sol.

La CE_x est la concentration de substance d'essai dans le sédiment qui provoque un effet de X % (par exemple 50 %) sur un paramètre biologique après une durée d'exposition donnée.

La concentration minimale avec effet observé (CMEO) est la concentration la plus faible analysée d'une substance 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).

La concentration sans effet observé (CSEO) est 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.

ANNEXE 2

COMPOSITION DE L'EAU RECONSTITUEE RECOMMANDEE

(extrait de la TG de l'OCDE 203 (1))

(a) Solution de chlorure de calcium

Dissoudre 11.76 g de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 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 $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 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 μl 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 $\text{K}_{\text{S4.3}}$ 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) OCDE (1992) Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. No 203 : poissons, essai de toxicité aiguë. OCDE, Paris.

ANNEXE 3

CARACTERISTIQUES PHYSIQUES ET CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ADMISSIBLE

SUBSTANCE	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

(extrait de OCDE (1992) (1))

Référence

- (1) OCDE (1992) Ligne directrice pour les essais de produits chimiques . No. 210 : poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie, OCDE, Paris.

ANNEXE 4

SEDIMENT ARTIFICIEL RECOMMANDE – PRESCRIPTIONS POUR LA PREPARATION 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 ≤ 0.5 mm)	5 ± 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 $\geq 30\%$	20 ± 1
Source d'aliment	Par exemple, poudre d' <i>Urtica</i> (<i>Folia urticae</i>), feuilles d' <i>Urtica dioica</i> (ortie), finement broyées (tailles de particules ≤ 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 ± 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 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 ≤ 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 ± 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 ± 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 d'essai, c'est-à-dire qu'il doit être recouvert d'eau impérativement aérée. A 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 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 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 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, Germany. pp. 107-119.

ANNEXE 5

METHODES 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 - 1000 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 – 1000 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 oligochetes peuvent être cultivés à température ambiante avec une photopériode de 16 heures de lumière (intensité 100 – 1000 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 bécher 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 bécher, 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 d'essai de certains individus qui se sont fragmentés et ne se sont par conséquent 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 $20 \pm 2^\circ\text{C}$. 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 Etats-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

E.U.A.

Agence de protection de l'environnement des Etats-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 Etats-Unis
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Université d'état de Wright
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

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. Ludwighowski & 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.

ANNEXE 6

SYNTHESE DES RESULTATS DE L'ESSAI CIRCULAIRE “ESSAI DE TOXICITE DU SEDIMENT AVEC LUMBRICULUS VARIEGATUS”

Tableau 1 : Résultats des cycles individuels de l'essai circulaire : nombres moyen de vers dans les témoins et les témoins de solvant à la fin de l'essai ; EC = écart type ; CV = coefficient de variation.

	nombre moyen de vers dans les témoins				nombre moyen de vers dans les témoins de solvant			
		EC	CV (%)	n		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
interlaboratoire								
moyenne	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)				Poids sec total des vers par expérience (témoins de solvant)			
		EC	CV (%)	n		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
interlaboratoire								
moyenne	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 CMEO ; EC = écart type ; CV = coefficient de variation.

paramètre biologique		moyenne interlaboratoire (mg/kg)		facteur interlaboratoire		EC	CV (%)	Moyenne géométr. (mg/kg)
		min	max	min	max			
nombre total de vers total	CE ₅₀	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
	CMEO	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	CE ₅₀	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
	CMEO	25.7	2.1	50.0	23.5	16.8	65.5	19.4
	DDM (%)	24.8	10.9	44.7				
mortalité/survie	CE ₅₀	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
	CMEO	39.1	4.7	66.7	14.2	18.1	46.2	32.6
reproduction (augmentation du nombre de vers par expérience)	CE ₅₀	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
	CMEO	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)	CE ₅₀	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
	CMEO	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

Reference

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.