

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

Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fousseurs

INTRODUCTION

1. Les animaux endobenthiques ingérant des sédiments peuvent être exposés aux substances liées aux sédiments (1). Parmi ces espèces ingérant des sédiments, les oligochètes aquatiques jouent un rôle important à la base des systèmes aquatiques. Ils vivent dans les sédiments et représentent souvent les espèces les plus abondantes, en particulier dans des habitats dont les conditions environnementales sont hostiles aux autres animaux. Par la bioturbation de ces sédiments et en servant de proie, ces animaux peuvent avoir une forte influence sur la biodisponibilité de ces substances pour d'autres organismes comme les poissons benthivores. Par opposition aux organismes épibenthiques, les oligochètes aquatiques endobenthiques s'enfouissent dans les sédiments et ingèrent des particules de sédiment sous la surface des sédiments. De ce fait, ces organismes sont exposés aux substances chimiques qui peuvent pénétrer dans leur corps de diverses manières comme par contact direct, ingestion de particules sédimentaires contaminées, via l'eau interstitielle et l'eau surjacente. Certaines espèces d'oligochètes benthiques actuellement utilisées dans des essais écotoxicologiques sont décrites à l'Annexe 6.

2. Les paramètres qui caractérisent la bioaccumulation d'une substance se composent essentiellement du facteur de bioaccumulation (FBA), de la constante de vitesse d'absorption sédimentaire (k_s) et de la constante de vitesse d'élimination (k_e). L'Annexe 1 donne des définitions détaillées de ces paramètres.

3. Afin d'évaluer le potentiel de bioaccumulation de substances chimiques de manière générale et d'étudier la bioaccumulation de substances ayant tendance à se répartir dans ou sur les sédiments, une méthode d'essai comportant des compartiments spécifiques est nécessaire (1) (2) (3) (4).

4. Cette ligne directrice pour les essais doit permettre d'évaluer la bioaccumulation de substances chimiques associées à des sédiments dans des vers oligochètes endobenthiques. La substance d'essai est dispersée dans le sédiment. L'utilisation d'un sédiment enrichi a pour but de simuler un sédiment contaminé.

5. Ces lignes directrices se fondent sur des méthodes de test de toxicité sédimentaire et de bioaccumulation existantes (1) (4) (5) (6) (7) (8) (9). On trouvera des informations utiles dans les discussions et résultats d'un groupe de travail international (11) et les résultats d'un essai comparatif interlaboratoires international (12).

6. Cet essai s'applique aux substances chimiques organiques neutres, stables, qui ont tendance à s'associer aux sédiments. Cette méthode permet également de mesurer la bioaccumulation de composés organométalliques stables, associés à des sédiments (12). Elle ne s'applique pas aux métaux et autres

© OCDE, (2008).

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.

éléments présents à l'état de traces (11), sans modification de la conception de l'essai en ce qui concerne les volumes de substrat et d'eau, et probablement la dimension des échantillons de tissu.

PRÉREQUIS ET INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

7. Il existe quelques relations structure-activité quantitatives (RSAQ) bien établies, disponibles, concernant les processus de bioaccumulation (14). La relation la plus largement utilisée est la corrélation entre la bioaccumulation et la bioconcentration de substances organiques stables et leur lipophilie respective (exprimée comme le logarithme du coefficient de partage octanol-eau ($\log K_{ow}$)); voir la définition en Annexe 1), qui a été développée pour la description d'une substance se répartissant entre l'eau et les poissons. Cette relation a également permis d'établir des corrélations pour le compartiment sédimentaire (15) (16) (17) (18). La corrélation $\log K_{ow}$ - \log FBC, principale RSAQ, peut être utile pour une estimation préliminaire du potentiel de bioaccumulation de substances chimiques associées à un sédiment. Toutefois, le FBA peut être influencé par la teneur en lipide de l'organisme d'essai et la teneur en carbone organique du sédiment. Par conséquent, il est également possible d'utiliser le coefficient de partage carbone organique/eau (K_{oc}) comme déterminant principal de la bioaccumulation de composés organiques associés à un sédiment.

8. Cet essai s'applique :

- aux substances organiques, stables, dont les valeurs de $\log K_{ow}$ sont comprises entre 3,0 et 6,0 (5) (19) et aux substances superlipophiles dont le $\log K_{ow}$ est supérieur à 6,0 (5) ;
- aux substances appartenant à la classe des substances organiques connues pour leur potentiel de bioaccumulation dans les organismes vivants, p. ex. les agents tensioactifs ou les substances fortement adsorbantes (p. ex. de K_{oc} élevée).

9. Avant de débiter toute étude, il convient de se procurer certaines informations sur la substance d'essai, comme les mesures de sécurité, les conditions de stockage convenables, la stabilité et les méthodes analytiques. Des conseils pour la réalisation d'essais rendus difficiles par les propriétés physico-chimiques des substances d'essai sont donnés dans (20) et (21). Avant de conduire un essai de bioaccumulation sur des oligochètes aquatiques, il est nécessaire de réunir les informations suivantes à propos du composé d'essai :

- le nom courant, le nom chimique (de préférence le nom IUPAC), la formule structurale, le n° CAS, la pureté ;
- la solubilité dans l'eau [Ligne directrice 105 ; (22)] ;
- le coefficient de partage octanol-eau, K_{ow} [Lignes directrices 107, 117 ; (22)] ;
- le coefficient de partage sédiment-eau, exprimé par K_d ou K_{oc} [Ligne directrice 121 (22)] ;
- les propriétés vis-à-vis de l'hydrolyse [Ligne directrice 111 ; (22)] ;
- la phototransformation dans l'eau [(23)] ;
- la tension de vapeur [Ligne directrice 104 ; (22)] ;
- la biodégradabilité immédiate [Lignes directrices 301A à F et 310 ; (22)] ;
- la tension de surface [Ligne directrice 115 ; (22)] ;
- la concentration micellaire critique (24).

Par ailleurs, les informations suivantes, lorsqu'elles sont disponibles, sont pertinentes :

- la biodégradation en environnement aquatique [Lignes directrices 308 et 309 ; (22)] ;
- la constante de la loi de Henry.

10. Des substances d'essai radiomarquées peuvent faciliter l'analyse de l'eau, du sédiment et des échantillons biologiques et peuvent être employées afin de déterminer si l'identification et la quantification

des produits de dégradation doivent être conduites. La méthode décrite ici a été validée par un essai comparatif interlaboratoires international (12), pour des composés marqués au ^{14}C . Si l'ensemble des résidus marqués est mesuré, le facteur de bioaccumulation (FBA) est basé sur le composé parent incluant les éventuels produits de dégradation retenus. Il est également possible de combiner une étude du métabolisme et une étude de bioaccumulation par l'analyse et la quantification du pourcentage du composé parent et de ses produits de dégradation dans des échantillons prélevés à la fin de la phase d'absorption ou au niveau du pic de bioaccumulation. Dans tous les cas, il est recommandé que le calcul du FBA se base sur la concentration du composé parent dans les organismes et pas uniquement sur le total des résidus radioactifs.

11. En plus des propriétés de la substance d'essai, une autre information nécessaire est la toxicité envers les espèces oligochètes devant être utilisées dans l'essai, comme la concentration létale médiane (CL_{50}) pour la durée nécessaire à la phase d'absorption, afin de s'assurer que les concentrations d'exposition retenues sont bien inférieures aux niveaux toxiques. Si elles sont disponibles, la préférence devrait être donnée aux valeurs de toxicité issues d'études sur le long terme sur des critères d'évaluation sublétaux (CE_{50}). En cas d'indisponibilité de ces données, un test de toxicité aiguë dans des conditions identiques à celles de l'essai de bioaccumulation, ou des données toxicologiques concernant d'autres espèces substitutives peuvent fournir des informations utiles.

12. Une méthode analytique appropriée, d'incertitude, de précision et de sensibilité connues pour la quantification de la substance dans les solutions, le sédiment et le matériau biologique d'essai doit être disponible, ainsi que les détails de la préparation et du stockage des échantillons et les fiches de données de sécurité des substances. Les limites de détection analytiques de la substance d'essai dans l'eau, le sédiment et les tissus du ver devraient également être connues. Si une substance d'essai radiomarquée est utilisée, la radioactivité spécifique (c.-à-d. en $\text{Bq}\cdot\text{mol}^{-1}$), la position de l'atome marqué et le pourcentage de radioactivité associé aux impuretés doivent également être connus. La radioactivité spécifique du composé d'essai devrait être aussi élevée que possible afin de permettre la détection de concentrations aussi faibles que possible (11).

13. Des informations sur les caractéristiques du sédiment utilisé (p. ex. l'origine du sédiment ou de ses constituants, son pH et la concentration en ammoniacque de l'eau interstitielle (sédiments naturels) la teneur en carbone organique (COT), la distribution de taille des particules (le pourcentage de sable, de limon et d'argile) et le pourcentage de masse sèche) devraient être accessibles (6).

PRINCIPE DE L'ESSAI

14. L'essai consiste en deux phases, la phase d'absorption (exposition) et la phase d'élimination (post-exposition). Durant la phase d'absorption, des vers sont exposés au sédiment enrichi avec la substance d'essai, recouverts d'eau reconstituée et convenablement équilibrée (11). Des groupes de vers témoins sont conservés dans des conditions identiques, sans la substance d'essai.

15. Pour la phase d'élimination les vers sont transférés dans un système sédiment-eau ne contenant pas la substance d'essai. Une phase d'élimination est nécessaire afin de recueillir des informations sur la vitesse à laquelle la substance d'essai est excrétée par l'organisme d'essai (19) (25). Une phase d'élimination est toujours nécessaire sauf si l'absorption de la substance d'essai au cours de la phase d'exposition s'avère être non significative (p. ex. aucune différence statistique entre la concentration de la substance d'essai dans les vers d'essai et dans les vers témoins). Si un état quasi stationnaire n'a pas été atteint durant la phase d'absorption, il est possible de réaliser une détermination de la cinétique - constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, FBA_k , en utilisant les résultats de la phase d'élimination. Une évolution de la concentration de la substance d'essai dans/sur les vers est suivie sur l'ensemble des deux phases de l'essai.

16. Durant la phase d'absorption, on conduit des mesures jusqu'à ce que le FBA atteigne un plateau ou un état quasi stationnaire. Par défaut, la durée de la phase d'absorption devrait être de 28 jours. La pratique a montré qu'une phase d'absorption de 12 à 14 jours suffit, pour plusieurs substances organiques neutres stables, à atteindre un état quasi stationnaire (6) (8) (9).

17. Toutefois, si l'état quasi stationnaire n'est pas atteint dans les 28 jours, la phase d'élimination est démarrée en transférant les oligochètes exposés dans des récipients contenant le même milieu sans la substance d'essai. La phase d'élimination est achevée soit lorsqu'on atteint un niveau de 10 % de la concentration mesurée dans les vers au 28^e jour de la phase d'absorption, soit après une durée de 10 jours au maximum. Le niveau résiduel dans les vers à la fin de la phase d'élimination est relevé comme un critère d'évaluation supplémentaire, p. ex. comme résidus non éliminés (RNE). Le facteur de bioaccumulation (FBA_{ss}) est calculé de préférence à la fois comme le rapport de la concentration dans les vers (C_a) à celle dans le sédiment (C_s) à un état quasi stationnaire apparent, et comme un facteur de bioaccumulation cinétique, FBA_k comme le rapport de la constante de vitesse d'absorption à partir du sédiment (k_s) à la constante de vitesse d'élimination (k_e) en supposant une cinétique du premier ordre. Si aucun état quasi stationnaire n'est atteint dans les 28 jours, calculer FBA_k à partir des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination. Pour les calculs, voir l'Annexe 2. Si une cinétique du premier ordre ne s'applique pas, des modèles plus complexes devront être utilisés (Annexe 2 et référence (26)).

18. Si aucun état quasi stationnaire n'est atteint dans les 28 jours, de manière facultative, la phase d'absorption peut être prolongée en soumettant les groupes de vers exposés - s'ils sont disponibles - à des mesures supplémentaires jusqu'à atteindre un état quasi stationnaire. En parallèle, la phase d'élimination devrait néanmoins débiter au 28^e jour de la phase d'absorption.

19. La constante de vitesse d'absorption, la constante de vitesse d'élimination (ou les constantes, dans le cas de modèles plus complexes), le facteur de bioaccumulation cinétique (FBA_k), et lorsque cela est possible, les limites de confiance de chacun de ces paramètres sont calculés à partir des équations du modèle numérique (voir les modèles en Annexe 2). La pertinence d'un modèle peut être déterminée à partir du coefficient de corrélation ou du coefficient de détermination (des coefficients proches de 1 indiquent un bon accord).

20. Pour réduire la dispersion des résultats pour des substances organiques de lipophilie élevée, les facteurs de bioaccumulation devraient être exprimés en plus en relation avec la teneur en liquide des organismes d'essai et avec la teneur en carbone organique (COT) du sédiment (facteur d'accumulation biote-sédiment ou BSAF en kg de sédiment COT kg^{-1} de teneur en lipide des vers). Cette approche se base sur des corrélations expérimentales et théoriques pour le compartiment aquatique, où - pour certaines classes chimiques - il existe une relation claire entre le potentiel d'une substance à être bioaccumulée et sa lipophilie, laquelle a été clairement établie pour des organismes modèles comme le poisson (14) (26) (27). Il existe également une relation entre la teneur en lipide du poisson d'essai et la bioaccumulation observée de ces substances. Pour les organismes benthiques, des corrélations similaires ont été trouvées (15) (16) (17) (18). Si on dispose de suffisamment de tissu de vers, il est possible de déterminer la teneur en lipide des animaux d'essai sur le même matériau biologique que celui utilisé pour déterminer la concentration de la substance d'essai. Toutefois, il est plus pratique d'utiliser des animaux témoins acclimatés au moins pour démarrer ou - de préférence - à la fin de la phase d'absorption pour mesurer la teneur en lipide, laquelle peut ensuite être utilisée pour normaliser les valeurs de FBA.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

21. Pour qu'un essai soit valable, les conditions suivantes doivent être satisfaites :

- La mortalité cumulée des vers (témoins et traités) jusqu'à la fin de l'essai, ne devrait pas dépasser 20 % du nombre initial.
- De plus, il devrait être prouvé que les vers s'enfouissent dans le sédiment pour prendre en compte une exposition maximum. Voir le paragraphe 28 pour les détails.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Espèces d'essai

22. Différentes espèces d'oligochètes aquatiques se prêtent à l'essai. Les espèces les plus couramment employées sont listées en Annexe 6.

23. Les essais de toxicité (96 h, dans l'eau seule) devraient être conduits à intervalles réguliers (p.ex. chaque mois) par rapport à un composé toxique de référence tel que le chlorure de potassium (KCl) ou le sulfate de cuivre (CuSO_4) (1) afin de démontrer l'état de santé des animaux d'essai (1) (6). Si aucun essai de toxicité de référence n'est conduit à intervalles réguliers, le lot d'organismes devant être utilisés dans un essai de bioaccumulation sédimentaire doit être vérifié à l'aide d'un composé toxique de référence. La mesure de la teneur en lipide pourrait également fournir des informations utiles sur l'état des animaux.

Culture des organismes d'essai

24. Afin de disposer d'un nombre suffisant de vers pour conduire les essais de bioaccumulation, il pourra être nécessaire de conserver les vers dans une culture de laboratoire mono-espèce permanente. Les méthodes de culture en laboratoire pour les espèces d'essai retenues sont résumées en Annexe 6. Pour les détails, voir les références (8) (9) (10) (18) (28) (29) (30) (31) (32).

Appareillage

25. On doit veiller à tout moment à ne pas utiliser pour l'appareillage, de matériaux susceptibles de dissoudre ou absorber les substances d'essai ou pouvant libérer des substances ayant un effet délétère sur les animaux d'essai. Des chambres rectangulaires ou cylindriques standards, en un matériau chimiquement inerte et de capacité adaptée, conforme au taux de charge, c.-à-d. au nombre de vers d'essai pouvant être utilisés. Il convient d'éviter l'utilisation de tubes en plastique souples pour l'administration d'eau ou d'air. Du téflon[®], de l'acier inoxydable et/ou du verre devront être utilisés pour tout équipement entrant en contact avec le milieu faisant l'objet de l'essai. Du verre silanisé peut s'avérer nécessaire pour des substances de coefficient d'adsorption élevé comme les pyrèthroïdes synthétiques. Dans de tels circonstances, l'équipement devra être jeté après usage (5). Pour des substances radiomarquées et pour des substances chimiques volatiles, on doit prendre soin d'éviter l'évaporation et la perte des substances d'essai. Il convient d'utiliser des pièges (p. ex. des flacons de lavage des gaz) contenant un absorbant permettant de capter d'éventuels résidus s'évaporant des chambres d'essai (11).

Eau

26. L'eau surjacente doit être d'une qualité permettant la survie des espèces d'essai durant les périodes d'acclimatation et d'essai, sans qu'elle ne présente un aspect ou un comportement anormal. Pour l'eau surjacente, tant pour les essais que pour les cultures de laboratoire, il est recommandé d'utiliser une eau reconstituée selon la ligne directrice 203 de l'OCDE (33). Il a été démontré que plusieurs espèces d'essai peuvent survivre, croître et se reproduire dans cette eau (8) ; une normalisation maximum des conditions d'essai et de culture est proposée. L'eau devrait être caractérisée au moins par son pH, sa conductivité et sa dureté. La recherche de micropolluants dans l'eau, préalablement à son utilisation pourrait fournir des informations utiles (Annexe 4).

27. L'eau devrait être de qualité constante sur toute la durée de l'essai. Le pH de l'eau surjacente devrait être compris entre 6 et 9. La dureté totale devrait être comprise entre 90 et 400 mg de CaCO₃ par litre au début de l'essai (7). Les plages de pH et de dureté dans l'eau reconstituée mentionnée sont données dans la ligne directrice 203 de l'OCDE (33). Si une interaction est suspectée entre la dureté de certains ions et la substance d'essai, une eau moins dure devrait être utilisée. L'Annexe 4 résume des critères supplémentaires pour une eau de dilution acceptable selon la ligne directrice 210 de l'OCDE (34).

Sédiment

28. Le sédiment doit être d'une qualité permettant la survie et de préférence la reproduction des organismes d'essai durant les périodes d'acclimatation et d'essai, sans qu'ils ne présentent un aspect ou un comportement anormal. Les vers devront s'enfouir dans le sédiment. Le comportement d'enfouissement peut avoir une influence sur l'exposition et donc sur le FBA. Par conséquent, la tendance à éviter le sédiment ou comportement fouisseur des organismes d'essai devra être observée, lorsque la turbidité de l'eau surjacente le permet. Les vers (témoins et traités) devront s'enfouir dans le sédiment dans les 24 h à compter de leur addition au récipient d'essai. Si on observe de manière permanente un défaut d'enfouissement ou un évitement du sédiment (p. ex. plus de 20 % sur plus de la moitié de la phase d'absorption), ceci indique soit que les conditions de l'essai ne sont pas appropriées, soit que les organismes d'essai ne sont pas en bonne santé, soit encore que la concentration de la substance chimique d'essai provoque ce comportement. Dans ce cas, l'essai devra être arrêté et répété en améliorant les conditions. Il est possible d'obtenir des informations supplémentaires sur l'ingestion du sédiment en utilisant les méthodes décrites dans (35) et (36), qui précisent l'ingestion de sédiments ou la sélection de particules par les organismes d'essai. Si elles sont observables, au moins la présence ou l'absence de coprolithes à la surface du sédiment, qui indiquent l'ingestion du sédiment par les vers, devraient être relevées et prises en compte dans l'interprétation des résultats de l'essai du point de vue du trajet d'exposition.

29. On recommande l'utilisation d'un sédiment artificiel basé sur le sol artificiel décrit dans la ligne directrice 207 de l'OCDE (40) à la fois pour l'essai et pour les cultures des vers en laboratoire (Annexe 5), puisque des sédiments naturels de qualité appropriée ne sont pas disponibles tout au long de l'année. De plus, l'essai pourrait être influencé par la présence éventuelle d'organismes indigènes ainsi que de micropolluants dans des sédiments naturels. Le sédiment artificiel permet à différentes espèces d'essai de survivre, croître et se reproduire (8).

30. Le sédiment artificiel devrait être caractérisé au moins par l'origine de ses constituants, la distribution de taille de particule, (le pourcentage de sable, de limon et d'argile), la teneur en carbone organique (COT), la teneur en eau et le pH. La mesure du potentiel redox est facultative. Toutefois, il est possible d'utiliser des sédiments naturels, provenant de sites non pollués, comme sédiment d'essai et/ou de culture (1). Les sédiments naturels devraient être caractérisés au moins par leur origine (le site de prélèvement), le pH et la teneur en ammoniacque de l'eau interstitielle, la teneur en carbone organique (COT), la distribution de taille de particule, (le pourcentage de sable, de limon et d'argile), et la teneur en eau (6). Si un dégagement d'ammoniacque est attendu, on recommande de conditionner le sédiment naturel durant sept jours dans les conditions du test à venir, avant de l'enrichir avec la substance d'essai. À la fin de cette période de conditionnement, l'eau surjacente devra être enlevée et éliminée. La recherche de micropolluants dans le sédiment ou ses constituants, préalablement à son utilisation pourrait fournir des informations utiles.

Préparation

31. La manipulation des sédiments naturels préalablement à leur utilisation en laboratoire est décrite dans (1) (6) (44). La préparation du sédiment artificiel est décrite en Annexe 5.

Stockage

32. Le stockage de sédiments naturels au laboratoire devrait être aussi court que possible. L'Agence de Protection de l'Environnement américaine (6) recommande une durée maximum de stockage de 8 semaines à 4 ± 2 °C à l'abri de la lumière. Aucun espace libre ne doit être présent au-dessus du sédiment dans le récipient de stockage. L'Annexe 5 donne des recommandations concernant le stockage de sédiments artificiels.

Application de la substance d'essai

33. La substance d'essai est dispersée sur le sédiment. La procédure de dispersion implique le revêtement d'un ou plusieurs des constituants du sédiment avec la substance d'essai. Par exemple, le sable de quartz, ou une portion de celui-ci (p. ex. 10 g de sable de quartz par récipient d'essai), peut être trempé dans une solution de la substance d'essai dans un solvant adapté, lequel est ensuite lentement évaporé à sec. La fraction revêtue peut ensuite être mélangée avec le sédiment mouillé. La quantité de sable apportée avec la substance d'essai et le mélange de sable doivent être pris en compte lors de la préparation du sédiment, c.-à-d. que le sédiment doit alors être préparé avec moins de sable (6).

34. Pour un sédiment naturel, la substance d'essai peut être ajoutée par dispersion sur une portion séchée du sédiment ainsi que cela est décrit plus haut pour le sédiment artificiel, ou par mélange avec le sédiment mouillé, puis évaporation de l'agent de solubilisation éventuellement utilisé. Des solvants adaptés à la dispersion sur sédiment mouillé sont l'éthanol, le méthanol, l'éthylène glycol monométhyl éther, l'éthylène glycol diméthyl éther, le diméthylformamide et le triéthylène glycol (5) (34). La toxicité et la volatilité du solvant et la solubilité de la substance d'essai dans le solvant choisi doivent être les principaux critères de sélection d'un agent de solubilisation adapté. Des conseils supplémentaires sur les procédures de dispersion sont donnés dans Environment Canada (1995) (41). On doit prendre des précautions pour s'assurer que la substance chimique d'essai ajoutée au sédiment est distribuée régulièrement et dans l'ensemble du sédiment. Des sous-échantillons du sédiment enrichi, d'expériences identiques, devraient être analysés afin de vérifier les concentrations en substance d'essai dans le sédiment et afin de déterminer le degré d'homogénéité de la distribution de la substance d'essai.

35. Une fois le sédiment enrichi préparé, avec une couche d'eau surjacent, il est souhaitable de laisser la substance d'essai se partager entre le sédiment et la phase aqueuse. Ceci devrait de préférence être réalisé dans les conditions de température et d'aération de l'essai. La durée d'équilibration appropriée dépend du sédiment et de la substance chimique et peut être de l'ordre de quelques heures à quelques jours, et dans quelques rares cas jusqu'à plusieurs semaines (4 à 5 semaines) (28) (42). Dans cet essai, on n'attend pas l'équilibre mais une période d'équilibration de 48 h à 7 jours est recommandée. Selon l'objectif de l'étude, p. ex. lorsqu'il s'agit de simuler des conditions environnementales, il peut être nécessaire d'équilibrer ou de vieillir le sédiment enrichi plus longtemps (11).

PERFORMANCE DE L'ESSAI

Essai préliminaire

36. Il peut être utile de conduire une expérience préliminaire afin d'optimiser les conditions de l'essai définitif, p. ex. choix des concentrations des substances testées et durées des phases phase d'absorption et d'élimination. Le comportement des vers, par exemple évitement du sédiment, c.-à-d. que les vers quittent le sédiment, ce qui peut être dû au composé chimique d'essai et/ou au sédiment lui-même, devrait être observé et noté durant un essai préliminaire. L'évitement du sédiment peut également être utilisé comme paramètre subléthal dans un essai préliminaire pour l'estimation des concentrations des substances d'essai à utiliser dans un essai de bioaccumulation.

Conditions d'exposition

Durée de la phase d'absorption

37. Les organismes d'essai sont exposés à la substance d'essai durant la phase d'absorption. Le premier échantillon devrait être prélevé entre 4 et 24 h après le début de la phase d'absorption. La phase d'absorption devrait être conduite durant 28 jours au plus (1) (6) (11), sauf s'il peut être démontré qu'un équilibre a été atteint plus rapidement. On identifie un état quasi stationnaire par : (i) un tracé des facteurs de bioaccumulation pour chaque période d'échantillonnage en fonction du temps, parallèle à l'axe du temps, (ii) trois analyses successives de FBA réalisées sur des échantillons prélevés à des intervalles d'au moins deux jours ne différant pas de plus de $\pm 20\%$ l'une par rapport à l'autre, et (iii) une absence de différence significative entre les trois périodes d'échantillonnage (sur la base de comparaisons statistiques, p. ex. l'analyse de la variance et une analyse par régression). Si l'état quasi stationnaire n'a pas été atteint après 28 jours, il est possible de clore la phase d'absorption en démarrant la phase d'élimination et il est possible de calculer le FBA_K à partir des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination (voir également les paragraphes 16 à 18).

Durée de la phase d'élimination

38. Le premier échantillon devrait être prélevé entre 4 et 24 h après le début de la phase d'élimination car des modifications peuvent survenir dans les résidus de tissu durant de la période initiale. Il est recommandé de clore la phase d'élimination soit lorsque la concentration de substance d'essai est inférieure à 10 % de la concentration de l'état quasi stationnaire, soit après une durée de 10 jours. Le niveau résiduel dans les vers à la fin de la phase d'élimination est relevé comme un critère d'évaluation secondaire. La période peut toutefois être définie par la durée pendant laquelle la concentration de la substance d'essai dans les vers est supérieure à la limite de détection analytique.

Organismes d'essai

Nombre de vers d'essai

39. Le nombre de vers par échantillon doit fournir une masse de tissu de vers telle que la masse de la substance d'essai par échantillon au début de la phase d'absorption et à la fin de la phase d'élimination soient, significativement supérieures à la limite de détection de la substance d'essai dans le matériau biologique. Dans les phases mentionnées d'absorption et d'élimination la concentration dans les animaux d'essai est généralement relativement faible (6) (8) (18). Comme le poids individuel de nombreuses espèces d'oligochètes aquatiques est très faible (5 à 10 mg de poids humide par individu pour *Lumbriculus variegatus* et *Tubifex tubifex*), il est possible de réunir les vers de chambres d'essai d'expériences identiques données pour la pesée et l'analyse de la substance d'essai. Pour les espèces d'essai de poids individuel supérieur (p. ex. *Branchiura sowerbyi*), il est possible d'utiliser des expériences identiques contenant un unique individu, mais dans ce cas le nombre d'expériences identiques doit être augmenté à cinq par point d'échantillonnage (11). On doit toutefois avoir à l'esprit que *B. sowerbyi* ne faisait pas partie de l'essai comparatif interlaboratoires (12) et il ne fait par conséquent pas partie des espèces préférables de la ligne directrice préliminaire.

40. Des vers de taille similaire devraient être utilisés (pour *L. variegatus* voir l'Annexe 6). Ils devraient provenir de la même source et devraient être des animaux adultes ou gros de la même classe d'âge (voir l'Annexe 6). Le poids et l'âge d'un animal peuvent avoir un effet significatif sur les valeurs de FBA (p. ex. du fait d'une teneur en lipide différente et/ou de la présence d'œufs) ; ces paramètres devraient être relevés avec précision. Afin de mesurer le poids moyen et le poids sec, un sous échantillon de vers devrait être pesé avant de débiter l'essai.

41. Avec *Tubifex tubifex* et *Lumbriculus variegatus*, on peut s'attendre à observer une reproduction sur la durée de l'essai. Une absence de reproduction lors d'un essai de bioaccumulation devrait être relevée et prise en compte lors de l'interprétation des résultats.

Charge

42. Il est recommandé d'utiliser des rapports sédiment/vers et eau/vers élevés afin de minimiser la réduction de la concentration de la substance d'essai dans le sédiment durant la phase d'absorption et d'éviter une réduction de la concentration en oxygène dissous. Les taux de charge choisis devraient également correspondre à des densités de population observées dans la nature pour l'espèce choisie (43). Par exemple, pour *Tubifex tubifex*, on recommande un taux de charge de 1 à 4 mg de tissu de ver (poids humide) par gramme de sédiment humide (8) (11). Les références (1) et (6) recommandent un taux de charge ≤ 1 g de poids sec de tissu de ver pour 50 g de carbone organique sédimentaire, pour *L. variegatus*.

43. Les vers utilisés lors d'un essai sont extraits de la culture par tamisage du sédiment de culture. Les animaux (adultes ou gros vers sans signes de fragmentation récente) sont transférés dans des récipients en verre (p. ex. des boîtes de Petri) contenant une eau propre. Si les conditions de l'essai diffèrent des conditions de culture, une phase d'acclimatation de 24 h devrait suffire. Avant la pesée, l'excès d'eau doit être séparé des vers. Ceci peut être fait en plaçant les vers avec précaution sur un mouchoir en papier pré-humidifié. Il est déconseillé d'utiliser un papier absorbant pour sécher les vers car celui-ci peut provoquer un stress ou abîmer les vers. Brunson et al. (1998) recommandent l'utilisation de vers non éponnés d'environ 1,33 fois la biomasse cible. Ces 33 % supplémentaires correspondent à la différence entre des vers éponnés et non éponnés (28).

44. Au début de la phase d'absorption (jour 0 de l'essai), les organismes d'essai sont transférés depuis la chambre d'acclimatation et distribués aléatoirement dans des récipients (p. ex. des boîtes de Petri) contenant de l'eau reconstituée, en ajoutant les vers par deux dans chaque récipient, jusqu'à ce que chaque récipient en contienne dix. Chacun de ces groupes de vers est ensuite aléatoirement transféré dans des récipients d'essai séparés, p. ex. en utilisant une pince en acier souple. Les récipients d'essai sont ensuite incubés dans les conditions de l'essai.

Alimentation

45. Compte tenu de la faible teneur en nutriment du sédiment artificiel, le sédiment devra être complété d'une source alimentaire. Afin de ne pas sous-estimer l'exposition des organismes d'essai, p. ex. en apportant sélectivement une alimentation non contaminée, la nourriture nécessaire à la reproduction et à la croissance des organismes d'essai devrait être ajoutée au sédiment en une fois, avant ou durant l'application de la substance d'essai (voir l'Annexe 5).

Rapport sédiment/eau

46. Le rapport sédiment/eau recommandé est de 1:4 (45). On considère que ce rapport permet de conserver les concentrations en oxygène à des niveaux convenables et d'éviter l'accumulation d'ammoniaque dans l'eau surnageante. La teneur en oxygène dans l'eau surjacente devrait être conservée à une valeur ≥ 40 % de la saturation. L'eau surjacente des récipients d'essai devrait être doucement aérée (p. ex. 2 à 4 bulles par seconde) via une pipette pasteur située environ 2 cm au-dessus de la surface du sédiment de sorte à minimiser la perturbation du sédiment.

Éclairage et température

47. La photopériode de la culture et de l'essai est de 16 heures (1) (6). L'intensité lumineuse dans la zone de l'essai devrait être maintenue à environ 500 à 1000 lux. La température devrait être de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ sur toute la durée de l'essai.

Concentrations d'essai

48. L'une des concentrations d'essai (aussi faible que possible) est utilisée pour la détermination de la cinétique d'absorption, mais il est possible d'utiliser une seconde concentration (supérieure) (p. ex. (46)). Dans ce cas, des échantillons sont prélevés et analysés à l'état quasi stationnaire ou après 28 jours afin de confirmer le FBA mesuré à la concentration la plus basse (11). La concentration supérieure devrait être choisie de sorte à ne pas provoquer d'effets délétères (p. ex; en se plaçant à environ 1 % en dessous de la concentration de toxicité chronique la plus basse connue EC_x provenant d'études de toxicité chronique pertinentes). La concentration d'essai la plus basse devrait être significativement supérieure à la limite de détection dans le sédiment et dans les échantillons biologiques selon la méthode analytique employée. Si la concentration d'effet de la substance d'essai est voisine de la limite de détection analytique, on recommande l'utilisation d'une substance d'essai radiomarkée, de radioactivité spécifique élevée.

Expériences identiques traitées et témoins

49. Le nombre minimum d'expériences identiques traitées pour les mesures de cinétique devrait être de trois par point d'échantillonnage (11), pour l'ensemble des phases d'absorption et d'élimination. Des expériences identiques supplémentaires devraient être utilisées p. ex. pour des dates d'échantillonnage supplémentaires facultatives. Pour la phase d'élimination, un nombre correspondant d'expériences identiques est préparé avec un sédiment et une eau surjacentes non enrichies, de sorte que les vers traités puissent être transférés depuis des récipients traités vers des récipients non traités à la fin de la phase d'absorption. Le nombre total d'expériences identiques traitées devrait être suffisant à la fois pour la phase d'absorption et pour la phase d'élimination.

50. En variante, il est possible d'exposer les vers destinés à être échantillonnés durant la phase d'élimination dans un grand container contenant un sédiment enrichi, du même lot que celui utilisé pour la cinétique d'absorption. Il doit être prouvé que les conditions de l'essai (p. ex. la profondeur du sédiment, le rapport sédiment/eau, la charge, la température, la qualité de l'eau) sont comparables aux expériences identiques destinées à la phase d'absorption. Une fois la phase d'absorption terminée, l'eau, le sédiment et les échantillons de vers devraient être prélevés de ce container pour analyse et un nombre suffisant de grands vers, ne présentant pas de signes de fragmentation récents, devraient être soigneusement extraits et transférés vers les expériences identiques préparées pour la phase d'élimination (p. ex. dix organismes par récipient d'expérience identique).

51. Si aucun solvant autre que l'eau n'a été utilisé, au moins 9 expériences identiques d'un contrôle négatif (au moins 3 échantillons au démarrage, 3 à la fin de la phase d'absorption et 3 à la fin de la phase d'élimination) devraient être fournies pour analyse biologique et du bruit de fond. Si un agent de solubilisation est utilisé pour l'application de la substance d'essai, il convient de contrôler le solvant (au moins 3 échantillons d'expériences identiques devraient être échantillonnés au démarrage, 3 à la fin de la phase d'absorption et 3 à la fin de la phase d'élimination). Dans ce cas, au moins 4 expériences identiques d'un contrôle négatif (sans solvant) devraient être fournies pour échantillonnage à la fin de la phase d'absorption. Ces expériences identiques peuvent être comparées biologiquement au contrôle du solvant afin d'obtenir des informations sur une éventuelle influence du solvant sur les organismes d'essai. L'Annexe 3 donne plus de détails.

Fréquence des mesures de la qualité de l'eau

52. Durant les phases d'absorption et d'élimination, l'eau surjacente devrait faire l'objet de mesures de qualité, au minimum selon les paramètres suivants :

- Température dans un récipient de chaque niveau de traitement par date d'échantillonnage, et dans un récipient témoin, une fois par semaine et au départ et à la fin des phases d'absorption et d'élimination ; la température peut également être enregistrée, p. ex. en continu ou à intervalles d'une heure, dans l'environnement (air ambiant ou bain d'eau) ou dans un récipient d'essai représentatif ;
- Teneur en oxygène dissous dans un récipient de chaque niveau de traitement et dans un récipient témoin par date d'échantillonnage, exprimée en mg/l et en % de la saturation à l'air ;
- Alimentation en air contrôlée au moins une fois par jour (travaillé) et au besoin ajustée ;
- pH dans un récipient traité de chaque niveau de traitement par date d'échantillonnage et dans un récipient témoin une fois par semaine et au début et à la fin des phases d'absorption et d'élimination ;
- Dureté totale de l'eau au moins dans un récipient traité et dans un récipient témoin au début et à la fin des phases d'absorption et d'élimination, exprimée en mg de CaCO_3/l ;
- Teneur totale en ammoniacque au moins dans un récipient traité et dans un récipient témoin au début et à la fin des phases d'absorption et d'élimination, exprimée en mg de NH_4^+ ou de NH_3 ou d'azote ammoniacal total.

Échantillonnage et analyse des vers, du sédiment et de l'eau

Programme d'échantillonnage

53. L'Annexe 3 donne des exemples de programme d'échantillonnage pour une phase d'absorption de 28 jours et une phase d'élimination de 10 jours.

54. Échantillonner l'eau et le sédiment des chambres d'essai pour la détermination de la concentration de la substance d'essai avant addition des vers et durant les phases d'absorption et d'élimination. Durant l'essai, les concentrations de la substance d'essai sont déterminées dans les vers, le sédiment et l'eau, afin de suivre la distribution de la substance d'essai dans le compartiment du système d'essai.

55. Échantillonner les vers, le sédiment et l'eau à au moins six reprises durant la phase d'absorption, comme dans la phase d'élimination.

56. Poursuivre l'échantillonnage en continu jusqu'à atteindre un plateau (état quasi stationnaire) (voir l'Annexe 1) ou durant 28 jours. Si le plateau n'a pas été atteint dans les 28 jours, débuter la phase d'élimination. Au démarrage de la phase d'élimination, transférer les vers voulus vers des chambres des expériences identiques contenant un sédiment non traité et de l'eau (voir également les paragraphes 17 et 18).

Échantillonnage et préparation des échantillons

57. Les échantillons d'eau sont obtenus par décantation, siphonnage ou pipetage d'un volume suffisant pour la mesure de la quantité de la substance d'essai dans l'échantillon.

58. L'eau surjacente restante est soigneusement décantée ou siphonnée de la ou des chambres d'essai. Les échantillons de sédiment doivent être prélevés avec le plus grand soin, en dérangeant les vers au minimum.

59. Enlever tous les vers des expériences d'essai identiques au moment de l'échantillonnage, p. ex. en mettant en suspension le sédiment avec l'eau surjacente et en étalant le contenu de chaque expérience identique sur un plateau peu profond et en prélevant les vers à l'aide d'une pince en acier souple. Les rincer rapidement à l'eau dans un récipient peu profond en verre ou en acier. Enlever l'eau en excès. Transférer délicatement les vers dans un récipient préalablement taré, et les peser. Sacrifier les vers par congélation (p. ex. ≤ -18 °C). La présence et le nombre de cocons et/ou de jeunes devraient être relevés.

60. De manière générale, les vers devraient être pesés et sacrifiés immédiatement après l'échantillonnage, sans phase de purge de l'intestin, afin d'obtenir un FBA classique incluant le contenu de l'intestin contaminé et afin d'éviter des pertes de résidus corporels durant une éventuelle phase de purge de l'intestin dans de l'eau seule (8). Les composés de $\log K_{ow}$ supérieur à 5 ne sont pas censés être significativement éliminés durant une phase de purge des intestins dans l'eau seule, alors que les substances chimiques de $\log K_{ow}$ inférieur à 4 peuvent être perdues en quantités significatives (47).

61. Durant la phase d'élimination, les vers purgent leur intestin dans le sédiment propre. Ceci signifie que les mesures réalisées immédiatement avant la phase d'élimination incluent le sédiment avec l'intestin contaminé, alors qu'après les 4 à 24 h initiales de la phase d'élimination, l'essentiel du contenu de l'intestin contaminé est supposé avoir été remplacé par du sédiment propre (11) (47). La concentration dans les vers de cet échantillon peut alors être considérée comme la concentration dans les tissus après la purge de l'intestin. Pour tenir compte de la dilution de la substance d'essai par du sédiment non contaminé durant la phase d'élimination, il est possible d'estimer le poids du contenu de l'intestin à partir des rapports poids des vers humides/poids des cendres de vers ou poids des vers secs/poids des cendres de vers.

62. Si l'objectif de l'étude est la mesure de la biodisponibilité et des résidus réels dans les tissus des organismes d'essai, alors au moins un sous-échantillon des animaux traités (provenant p. ex. de trois récipients d'expériences identiques supplémentaires), de préférence échantillonné durant l'état quasi stationnaire, devrait être pesé, purgé dans de l'eau propre durant 6 heures (47), et pesé de nouveau avant analyse. Les données de poids des vers et de concentrations corporelles de ces sous-échantillons peuvent ensuite être comparées aux valeurs obtenues à partir de vers purgés. Les vers destinés à une mesure d'élimination ne devraient pas être purgés avant le transfert vers le sédiment propre afin de minimiser le stress subi par les animaux.

63. Analyser de préférence l'eau, le sédiment et les échantillons de vers immédiatement (c.-à-d. dans les 1 à 2 jours) après extraction afin d'éviter une dégradation ou autres pertes et de calculer les vitesses d'absorption et d'élimination approximatives pendant le déroulement de l'essai. Une analyse immédiate permet également de déterminer sans retard l'atteinte du plateau.

64. Si les analyses ne sont pas réalisées immédiatement, les échantillons devront être stockés dans des conditions appropriées. Il convient d'obtenir les informations sur la stabilité et les conditions de stockage appropriées (p. ex. la durée et la température de stockage, les procédures d'extraction, etc.) pour la substance d'essai donnée, avant de débiter l'étude. Si ces informations ne sont pas disponibles et qu'elles

sont jugées nécessaires, des tissus témoins contaminés peuvent être étudiés en parallèle afin de déterminer la stabilité au stockage.

Qualité de la méthode analytique

65. Comme l'ensemble de la procédure est essentiellement gouverné par l'incertitude, la précision et la sensibilité de la méthode analytique employée pour la substance d'essai, il convient de vérifier expérimentalement que la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique, ainsi que la récupération de la substance d'essai à partir de l'eau, du sédiment ou des échantillons de vers sont satisfaisantes pour la méthode donnée. Vérifier également que la substance d'essai n'est pas détectable dans les chambres témoins, en concentrations supérieures au bruit de fond. Si nécessaire, corriger les valeurs de C_w , C_s et C_a pour les valeurs des récupérations et du bruit de fond du témoin. Pour l'ensemble de l'essai, manipuler tous les échantillons de manière à minimiser les contaminations et les pertes (résultant p. ex. d'une adsorption de la substance d'essai sur le dispositif d'échantillonnage).

66. La récupération globale et la récupération de la substance d'essai dans les vers, le sédiment, l'eau et le cas échéant, dans les pièges contenant des absorbants permettant de retenir la substance d'essai évaporée, devraient être enregistrées et consignées.

67. Puisque l'utilisation de substances radiomarquées est recommandée, il est possible d'analyser la radioactivité totale (c.-à-d. celle du produit parent et des produits de dégradation). Toutefois, si ceci est faisable du point de vue analytique, une quantification du composé parent et des produits de dégradation à l'état quasi stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption peuvent fournir des informations importantes. Si on envisage de réaliser de telles mesures, les échantillons devraient alors être soumis à des procédures d'extraction appropriées de sorte que le composé parent puisse être quantifié séparément. Lorsqu'un produit de dégradation détecté représente un pourcentage significatif (p. ex. > 10 %) de la radioactivité mesurée dans les organismes d'essai à l'état quasi stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption, on recommande l'identification de ces produits de dégradation (5).

68. Du fait de la faible biomasse individuelle, il est souvent impossible de déterminer la concentration de la substance d'essai dans chacun des vers, sauf à utiliser l'espèce d'essai *Branchiura sowerbyi* (poids humide : 40 à 50 mg par ver) (11). Par conséquent, le regroupement d'individus échantillonnés à partir d'un récipient d'essai donné est acceptable, mais ceci restreint les procédures statistiques pouvant s'appliquer aux données. Si une procédure et une puissance statistiques spécifiques sont des considérations importantes, alors l'essai devrait comprendre un nombre adéquat de chambres d'essai, d'animaux d'essais et/ou d'expériences identiques adapté aux quantités, à la procédure et à la puissance voulues.

69. On recommande d'exprimer le FBA à la fois comme une fonction du poids total humide, du poids total sec et si nécessaire (p. ex. pour des substances fortement lipophiles), comme une fonction de la teneur en lipide et du COT du sédiment. La teneur en lipide doit être déterminée par des méthodes adaptées (48) (49). On peut recommander la technique d'extraction au chloroforme/méthanol (50) comme une méthode standard (48). Toutefois, afin d'éviter l'utilisation de solvants chlorés, il est possible d'utiliser une modification, qui a fait l'objet d'un essai comparatif interlaboratoires, de la méthode de Bligh & Dyer (50) ; celle-ci est décrite dans (51). Comme les diverses méthodes ne conduisent pas à des valeurs identiques (48), il est important de détailler la méthode employée. Lorsque cela est possible, c.-à-d. si on dispose de suffisamment de tissu de vers, la teneur en lipide est mesurée dans le même échantillon ou extrait que celui produit pour l'analyse de la substance d'essai, puisqu'il est souvent nécessaire d'éliminer les lipides de l'extrait avant de pourvoir le chromatographe (5). Toutefois, il est plus pratique d'utiliser des animaux témoins acclimatés au moins pour démarrer ou - de préférence - à la fin de la phase d'absorption pour mesurer la teneur en lipide, p. ex. dans trois échantillons.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

70. On obtient la courbe d'absorption de la substance d'essai en portant, en échelle linéaire, la concentration de la substance d'essai dans/ sur les vers durant la phase d'absorption en fonction du temps. Si la courbe a atteint un plateau, calculer le FBA_{ss} à l'état quasi stationnaire :

$$\frac{C_a \text{ à l'état quasi stationnaire ou au } 28^{\text{e}} \text{ jour (moyenne)}}{C_s \text{ à l'état quasi stationnaire ou au } 28^{\text{e}} \text{ jour (moyenne)}}$$

71. Déterminer le facteur de bioaccumulation cinétique (FBA_K) comme le rapport de k_s/k_e . La constante d'élimination (k_e) est généralement déterminée à partir de la courbe d'élimination (c.-à-d. d'un tracé de la concentration de la substance d'essai dans les vers durant la phase d'élimination). La constante de vitesse d'absorption k_s est ensuite calculée à partir de la cinétique de la courbe d'absorption. La méthode préférée pour l'obtention du FBA_K et des constantes de vitesse, k_s , et k_e , consiste à utiliser des méthodes d'estimation des paramètres non linéaires à l'aide d'un ordinateur (voir l'Annexe 2). Si l'élimination n'est à l'évidence pas du premier ordre, alors des modèles plus complexes devraient être utilisés (26) (27) (52).

72. Le facteur d'accumulation biote-sédiment (BSAF) est déterminé en normalisant le FBA_K par rapport à la teneur en lipide des vers et à la teneur en carbone organique total du sédiment.

Interprétation des résultats

73. Les résultats devraient être interprétés avec précaution lorsque les concentrations mesurées lors des essais sont à des niveaux proches de la limite de détection de la méthode analytique employée.

74. Des courbes d'absorption et d'élimination clairement définies sont une indication de données de bioaccumulation de bonne qualité. En général, pour des études bien conçues, les limites de confiance des valeurs de FBA ne devraient pas dépasser 25 % (5).

Rapport d'essai

75. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes.

Substance d'essai

- nature physique et propriétés physico-chimiques, p. ex. $\log K_{ow}$, solubilité dans l'eau ;
- données sur l'identification de la substance ; provenance de la substance d'essai, identités et concentrations des solvants éventuellement utilisés ;
- dans le cas de radiomarquage, la position précise des atomes marqués, la radioactivité spécifique et le pourcentage de radioactivité associé aux impuretés.

Espèces d'essai

- nom scientifique, souche, origine, pré-traitement éventuel, acclimatation, âge, plage de taille, etc.

Conditions de l'essai

- procédure utilisée pour l'essai (p. ex. statique, semi-statique, ou dynamique) ;
- type et caractéristiques de l'éclairage utilisé et photopériode(s) ;

- conception de l'essai (p. ex. nombre, matériau et dimension des chambres d'essai, volume d'eau, masse et volume de sédiment, vitesse de remplacement de l'eau (pour les procédures dynamiques ou semi-statiques), éventuelle aération utilisée avant et durant l'essai, nombre d'expériences identiques, nombre de vers par expérience identique, nombre de concentrations d'essai, durée des phases d'absorption et d'élimination, fréquence d'échantillonnage) ;
- méthode de préparation de la substance d'essai et d'application ainsi que les raisons du choix d'une méthode donnée ;
- concentrations testées nominales ;
- source des constituants de l'eau et du sédiment artificiels ou - si un milieu naturel est utilisé - origine de l'eau et du sédiment, description d'un éventuel prétraitement, résultats d'une éventuelle démonstration de l'aptitude des animaux d'essai à vivre et/ou à se reproduire dans le milieu utilisé, caractéristiques du sédiment (pH et teneur en ammoniacque de l'eau interstitielle (pour les sédiments naturels), teneur en carbone organique (COT), distribution de taille de particule (pourcentage de sable, de limon et d'argile), teneur en eau en pourcentage et toutes autres mesures réalisées) et caractéristiques de l'eau (pH, dureté, conductivité, température, concentration en oxygène dissous, niveaux de chlore résiduels (s'il est mesuré) et toutes autres mesures réalisées) ;
- poids sec mesuré et nominal en % du poids humide (ou rapport poids sec/poids humide) du sédiment artificiel, poids sec mesuré en % du poids humide (ou rapport poids sec/poids humide) pour les sédiments naturels ;
- qualité de l'eau dans les chambres d'essai, caractérisée par sa température, son pH, sa teneur en ammoniacque, sa dureté totale et sa concentration en oxygène dissous ;
- informations détaillées sur le traitement des échantillons d'eau, de sédiment et de vers, y compris les détails concernant la préparation, le stockage, les procédures d'enrichissement en substance d'essai, l'extraction et les procédures analytiques (et leur précision) pour la substance d'essai et la teneur en lipide, et les méthodes de récupération de la substance d'essai.

Résultats

- mortalité des vers témoins et des vers dans chaque chambre d'essai et éventuels effets sous-létaux observés, y compris un comportement anormal (p. ex. évitement du sédiment, présence ou absence de coprolithes, absence de reproduction) ;
- mesure du poids sec en % du poids humide (ou rapport poids sec/poids humide) du sédiment et des organismes d'essai (utiles pour la normalisation) ;
- teneur en lipide des vers ;
- courbe montrant les cinétiques d'absorption et d'élimination de la substance d'essai chez les vers, et la durée pour atteindre l'état quasi stationnaire ;
- C_a , C_s et C_w (avec écart type et étendue, si nécessaire) pour toutes les dates d'échantillonnage (C_a exprimé en g.kg^{-1} de poids humide et sec du poids de l'ensemble du corps, C_s exprimé en g.kg^{-1} du poids humide et sec de sédiment, et C_w en mg.l^{-1}). Si un facteur d'accumulation biote-sédiment (BSAF, voir la définition en Annexe 1) est nécessaire (p. ex. pour une comparaison des résultats entre deux essais ou plus réalisés avec des animaux de teneur en lipide différente), C_a devrait en plus être exprimé en g.kg^{-1} de teneur en lipide de l'organisme et C_s devrait être exprimé en g.kg^{-1} de carbone organique (CO) du sédiment ;
- on peut également rapporter en plus les données suivantes : FBA (exprimé en kg de sédiment humide kg^{-1} de ver humide), constante de vitesse d'absorption sédimentaire k_s (exprimée en g de sédiment humide kg^{-1} de vers humides j^{-1}), et la constante de vitesse d'élimination k_e (exprimée en j^{-1}) ; BSAF (exprimé en kg de CO du sédiment kg^{-1} de teneur en lipide des vers) ;

- résidus non éliminés (RNE) à la fin de la phase d'élimination ;
- le cas échéant : les pourcentages de composé parent, les produits de dégradation et les résidus liés (c.-à-d. le pourcentage de substance d'essai ne pouvant être extraite par les méthodes d'extractions courantes) détectés dans les animaux d'essai ;
- méthodes utilisées pour les analyses statistiques des données.

Évaluation des résultats

- conformité des résultats avec les critères de validité tels qu'ils sont listés au paragraphe 21 ;
- résultats inattendus ou inhabituels, p. ex. élimination incomplète de la substance d'essai des animaux d'essai ; dans ce cas, les résultats d'une éventuelle étude préliminaire peuvent fournir des informations utiles.

ANNEXE 1

DÉFINITIONS ET UNITÉS

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

La bioaccumulation est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant. La bioaccumulation est le résultat combiné des processus de bioconcentration et de bioamplification (voir ci-dessous).

Le facteur de bioaccumulation (FBA) est, à tout instant durant la phase d'absorption d'un essai de bioaccumulation, la concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai (C_a en g.kg^{-1} de poids humide ou sec) divisée par la concentration de la substance dans le milieu environnant (C_s en g.kg^{-1} de poids de sédiment humide ou sec). Afin de conserver le lien avec C_a et C_s , le FBA a pour unité des kg de sédiment kg^{-1} de ver (15).

Les facteurs de bioaccumulation calculés directement à partir du rapport de la constante de vitesse d'absorption sédimentaire divisée par la constante de vitesse d'élimination (k_s et k_e , respectivement - voir ci-dessous), sont appelés facteur de bioaccumulation cinétique (FBA_K).

La bioconcentration est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, résultant exclusivement de l'absorption via la surface du corps, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant.

La bioamplification est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, résultant principalement de l'absorption d'aliments ou de proies contaminés, par rapport à la concentration de la substance d'essai dans l'alimentation ou la proie. La bioamplification peut conduire à un transfert ou à une accumulation de la substance d'essai dans les réseaux trophiques.

Le facteur d'accumulation biote-sédiment (BSAF) est la concentration de la substance d'essai à l'état quasi stationnaire normalisée par rapport aux lipides dans/sur l'organisme d'essai divisée par la concentration de la substance normalisée par rapport au carbone organique, dans le sédiment à l'état quasi stationnaire. C_a est alors exprimée en g kg^{-1} de teneur en lipides de l'organisme, et C_s en g kg^{-1} de teneur en carbone organique du sédiment.

La période de conditionnement sert à stabiliser le composant microbien du sédiment et à enlever p. ex. l'ammoniaque provenant des composants du sédiment ; elle a lieu avant l'enrichissement du sédiment avec la substance d'essai. Généralement, une fois le conditionnement terminé, l'eau surjacente est éliminée.

L'élimination d'une substance est la perte de cette substance par les tissus de l'organisme d'essai selon des processus actifs ou passifs survenant indépendamment de la présence ou de l'absence de la substance d'essai dans le milieu environnant.

La phase d'élimination est la durée, suite au transfert des organismes d'essai depuis un milieu contaminé dans un milieu ne contenant pas la substance d'essai, durant laquelle est étudiée l'élimination (ou la perte nette) de la substance par les organismes.

La constante de vitesse d'élimination (k_e) est la valeur numérique définissant la vitesse de réduction de la concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai, suite au transfert des organismes d'essai depuis un milieu contenant la substance d'essai vers un milieu ne contenant pas la substance, k_e est exprimé en j^{-1} .

La période d'équilibration est utilisée afin de tenir compte de la distribution de la substance d'essai entre la phase solide, l'eau interstitielle et l'eau surjacente ; elle a lieu après l'enrichissement du sédiment avec la substance d'essai et avant l'addition des organismes d'essai.

Le coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}) est le rapport des solubilités de la substance dans le n-octanol et dans l'eau à l'équilibre ; il est parfois exprimé par P_{ow} . Le logarithme de K_{ow} ($\log K_{ow}$) est utilisé comme indicateur du potentiel de bioaccumulation de la substance par les organismes aquatiques.

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

L'eau surjacente est l'eau se trouvant au-dessus du sédiment dans le récipient d'essai.

Un plateau ou état quasi stationnaire est défini comme l'équilibre entre les processus d'absorption et d'élimination survenant simultanément durant la phase d'exposition. L'état quasi stationnaire est atteint, dans le tracé du FBA pour chaque période d'échantillonnage en fonction du temps, lorsque la courbe devient parallèle à l'axe des temps et que trois analyses successives de FBA réalisées sur des échantillons pris à intervalles d'au moins deux jours se tiennent dans 20 % et qu'il n'y a pas de différence statistique significative entre les trois périodes d'échantillonnage. Pour les substances d'essai absorbées lentement, des intervalles plus appropriés seraient de sept jours (5).

L'eau interstitielle, ou eau des pores, est l'eau occupant l'espace entre les particules du sédiment ou du sol.

La constante de vitesse d'absorption sédimentaire (k_s) est la valeur numérique définissant la vitesse d'augmentation de la concentration de la substance d'essai dans/sur l'organisme d'essai résultant de l'absorption de la phase sédimentaire. k_s est exprimé en g de sédiment kg^{-1} de ver j^{-1} .

Un sédiment enrichi est un sédiment auquel une substance d'essai a été ajoutée.

Le facteur de bioaccumulation à l'état quasi stationnaire (FBA_{ss}) est le FBA à l'état quasi stationnaire et n'évolue pas significativement dans le temps, la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant (C_s en $g\ kg^{-1}$ de poids de sédiment humide ou sec) étant constante sur cette durée.

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

ANNEXE 2

Calcul des paramètres d'absorption et d'élimination

Le critère d'évaluation principal d'un essai de bioaccumulation est le facteur de bioaccumulation, FBA. Il est possible de calculer le FBA en divisant la concentration de la substance d'essai dans l'organisme d'essai, C_a , par la concentration de la substance d'essai dans le sédiment, C_s , à l'état quasi stationnaire. Si l'état quasi stationnaire n'est pas atteint durant la phase d'absorption, le FBA est calculé de la même manière pour le jour 28. Toutefois, on doit indiquer si le FBA est basé, ou non, sur des concentrations à l'état quasi stationnaire.

Les méthodes préférées pour l'obtention du facteur de bioaccumulation cinétique (FBA_K), de la constante de vitesse d'absorption sédimentaire (k_s) et de la constante de vitesse d'élimination (k_e) consistent à utiliser des méthodes d'estimation des paramètres non linéaires de manière informatique. Pour une série temporelle de facteurs d'accumulation (FA) moyens donnée (C_a , valeurs moyennes pour chaque date d'échantillonnage/ C_s , valeurs moyennes pour chaque d'échantillonnage = FA) de la phase d'absorption basée sur le poids humide de ver et de sédiment, et l'équation modèle

$$FA(t) = FBA \times (1 - e^{-k_e t}) \quad \text{[équation 1]}$$

où $FA(t)$ est le rapport de la concentration de la substance d'essai dans les vers et de sa concentration dans le sédiment à un instant (t) quelconque de la phase d'absorption, ces programmes informatiques calculent les valeurs de FBA_K , k_s et k_e .

Lorsqu'on a atteint un état quasi stationnaire durant la phase d'absorption (c.-à-d. $t = \infty$), il est possible de réduire l'équation 1 à :

$$FBA_K = \frac{k_s}{k_e} \quad \text{[équation 2]}$$

où k_s = constante de vitesse d'absorption [en g de sédiment kg^{-1} de ver j^{-1}].
 k_e = constante de vitesse d'élimination [j^{-1}]

Ensuite $k_s/k_e \times C_s$ donne une valeur approchée de la concentration de la substance d'essai dans le tissu du ver à l'état quasi stationnaire ($C_{a,ss}$).

Le facteur d'accumulation biote-sédiment (BSAF) doit être calculé comme suit :

$$BSAF = FBA_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

où f_{oc} est la fraction de carbone organique dans le sédiment sur la base du poids sec, et f_{lip} est la fraction de lipide dans le ver, toutes deux basées soit sur le poids sec, soit sur le poids humide.

Pour une série temporelle donnée de valeurs de concentrations, il est possible de modéliser les cinétiques d'élimination en utilisant les équations du modèle suivantes et un calcul informatique fondé sur une méthode d'estimation des paramètres non linéaire.

On recommande d'utiliser le résidu corporel moyen mesuré à la fin de la phase d'absorption comme point de départ par défaut. L'utilisation de la valeur modélisée/estimée à partir de la phase d'absorption ne devrait être utilisée que, p. ex. si la valeur mesurée s'écarte significativement du résidu corporel modélisé. Voir également le paragraphe 50 pour une variante de pré-exposition des vers destinés à l'élimination ; avec cette approche, des échantillons de ces vers pré-exposés au jour 0 de la phase d'élimination sont supposés fournir une valeur du résidu corporel réaliste, avec laquelle il est possible de démarrer la cinétique d'élimination.

Si le tracé des données en fonction du temps indique une décroissance exponentielle constante de la concentration de la substance d'essai dans les animaux, l'évolution temporelle de l'élimination peut être décrite par un modèle à un compartiment (équation 4).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad \text{[équation 3]}$$

Les processus d'élimination semblent parfois évoluer en deux étapes, en montrant une décroissance rapide de C_a au cours des premières étapes, qui évolue vers une perte plus lente des substances d'essai dans les étapes ultérieures de l'élimination (8) (19) (26)). Les deux étapes peuvent être interprétées en faisant l'hypothèse de l'existence de deux compartiments dans l'organisme ; compartiments à partir desquels la substance d'essai est éliminée à différentes vitesses. Dans ces cas particuliers, il convient d'étudier attentivement la littérature (15) (16) (17) (26).

L'équation (26) p. ex. décrit une élimination à deux compartiments :

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{-k_b \times t} \quad \text{[équation 4]}$$

A et B représentent les dimensions des compartiments (en pourcentage du résidu de tissu total), où A est le compartiment éliminant rapidement la substance et B est le compartiment où l'élimination de la substance d'essai est la plus lente. La somme de A et de B fait 100 % de l'ensemble du volume du compartiment animal à l'état quasi stationnaire. k_a et k_b représentent les constantes d'élimination correspondantes [j^{-1}]. Si le modèle à deux compartiments correspond aux données de dépuración, il est possible de calculer la constante de vitesse d'absorption k_s comme suit (53) (54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times FBA}{A + B} \quad \text{[équation 5]}$$

Quoi qu'il en soit, ces équations modèles doivent être utilisées avec précaution, en particulier lorsque des modifications de la biodisponibilité de la substance d'essai surviennent durant l'essai (42).

En variante aux équations modélisées décrites ci-dessus, il est également possible de calculer les cinétiques (k_s et k_e) en un essai, en appliquant un modèle de cinétique du premier ordre à toutes les données des phases d'absorption et d'élimination ensemble. Pour une description d'une méthode pouvant permettre un tel calcul combiné des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, consulter les références (55), (56) et (57).

Les résidus non éliminés (RNE) devraient être calculés comme un critère d'évaluation secondaire en multipliant le rapport de la concentration moyenne dans les vers (C_a) au dixième jour de la phase

d'élimination à la concentration moyenne dans les vers (C_a) à l'état quasi stationnaire (28^e jour de la phase d'absorption) par 100 :

$$RNE_{10j} [\%] = \frac{C_a \text{ à la fin de l'élimination (moyenne)} \times 100}{C_a \text{ à l'état quasi stationnaire (moyenne)}}$$

ANNEXE 3

Exemple de planning d'échantillonnage pour un essai de bioaccumulation sur 28 jours

a) Phase d'absorption (incluant une phase d'équilibration de 4 jours)

Jour	Activités
-6	Préparation d'une suspension de tourbe pour le sédiment, conditionnement de la suspension durant 48 h ;
-4	Enrichissement du sédiment ou d'une fraction du sédiment ; mélange de tous les constituants du sédiment ; prélèvement d'échantillons de sédiment des sédiments témoins traité et solvant pour détermination de la concentration en élément d'essai ; ajout d'eau surjacente ; incubation dans les conditions de l'essai (phase d'équilibration) ;
-3/-2	Séparation des organismes d'essai de la culture pour acclimatation ;
0	Mesure de la qualité de l'eau (voir paragraphe 52) ; retrait d'expériences identiques pour la prise d'échantillons d'eau et de sédiment pour la détermination de la concentration en substance d'essai ; distribution aléatoire des vers dans les chambres d'essai ; conservation de suffisamment de sous-échantillons de vers pour la détermination des valeurs de bruit de fond analytique ; contrôle de l'alimentation en air, dans le cas d'un système fermé ;
1	Retrait d'expériences identiques pour échantillonnage ; contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers, de la qualité de l'eau (voir le paragraphe 56) ; prélèvement d'échantillons d'eau, de sédiment et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai ;
2	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température ;
3	Comme au 1 ^e jour ;
4 - 6	Comme au 2 ^e jour ;
7	Comme au 1 ^e jour ; si nécessaire, compenser l'évaporation de l'eau ;
8 - 13	Comme au 2 ^e jour ;
14	Comme au 1 ^e jour ; si nécessaire, compenser l'évaporation de l'eau ;
15 - 20	Comme au 2 ^e jour ;
21	Comme au 1 ^e jour ; si nécessaire, compenser l'évaporation de l'eau ;
22 - 27	Comme au 2 ^e jour ;
28	Comme au 1 ^e jour ; mesure de la qualité de l'eau (voir paragraphe 52) ; fin de la phase d'absorption ; conservation de suffisamment de sous-échantillons de vers pour la détermination des valeurs de bruit de fond analytique, du poids sec et humide et de la teneur en lipide ; transfère des vers depuis les expériences identiques exposées restantes vers des récipients contenant du sédiment propre pour la phase d'élimination (sans purge de l'intestin) ; échantillonnage de l'eau, du sédiment et des vers des témoins solvants ; échantillonnage des solutions pièges, le cas échéant.

Les activités de pré-exposition (phase d'équilibration) devraient être programmées en tenant compte des propriétés de la substance d'essai. Si nécessaire, conditionnement du sédiment préparé sous de l'eau surjacente à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durant 7 jours ; dans ce cas, préparation préalable du sédiment !

Les activités décrites pour le 2^e jour devraient être réalisées quotidiennement (au moins les jours travaillés).

b) Phase d'élimination

Jour	Activités
-6	Préparation d'une suspension de tourbe pour le sédiment, conditionnement de la suspension durant 48 h ;
-4	Mélange de tous les constituants du sédiment ; prélèvement d'échantillons de sédiment des sédiments témoins traité et solvant pour détermination de la concentration en élément d'essai ; ajout d'eau surjacente ; incubation dans les conditions de l'essai ;
0 (28 ^e jour de la phase d'absorption)	Mesure de la qualité de l'eau (voir le paragraphe 52) ; transfert des vers depuis les expériences identiques exposées restantes vers les récipients contenant du sédiment propre ; après 4 à 6 h , retrait d'expériences identiques pour la prise d'échantillons d'eau, de sédiment et de vers pour la détermination de la concentration en substance d'essai ; répartition aléatoire des vers dans les chambres d'essai ;
1	Retrait d'expériences identiques pour échantillonnage ; contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers, de la qualité de l'eau (voir le paragraphe 52) ; prélèvement d'échantillons d'eau, de sédiment et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai ;
2	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température ;
3	Comme au 1 ^e jour ;
4	Comme au 2 ^e jour ;
5	Comme au 1 ^e jour ;
6	Comme au 2 ^e jour ;
7	Comme au 1 ^e jour ; si nécessaire, compenser l'évaporation de l'eau ;
8 - 9	Comme au 2 ^e jour ;
10	Comme au 1 ^e jour ; fin de la phase d'élimination ; mesure de la qualité de l'eau (voir le paragraphe 52) ; échantillonnage d'eau, de sédiment et de vers des témoins solvants ; échantillonnages des solutions piège, le cas échéant.

La préparation du sédiment avant de débiter la phase d'élimination doit être conduite de la même manière que préalablement à la phase d'absorption.

Les activités décrites pour le 2^e jour devraient être réalisées quotidiennement (au moins les jours travaillés).

ANNEXE 4

Quelques caractéristiques physico-chimiques d'une eau de dilution acceptable

SUBSTANCE	CONCENTRATIONS
Matière particulaire	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 µg/l
Ammoniaque non ionisée	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux plus biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

COMPOSITION DE L'EAU RECONSTITUÉE RECOMMANDÉE (33)

- (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 déionisée ; ajuster à 1 l avec de l'eau déionisée
- (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 déionisée ; ajuster à 1 l avec de l'eau déionisée
- (c) Solution de bicarbonate de sodium
Dissoudre 2,59 g de NaHCO_3 dans de l'eau déionisée ; ajuster à 1 l avec de l'eau déionisée
- (d) Solution de chlorure de potassium
Dissoudre 0,23 g de KCl dans de l'eau déionisée ; ajuster à 1 l avec de l'eau déionisée

Tous les produits chimiques doivent être de qualité analytique.

La conductivité de l'eau distillée ou déionisée ne doit pas dépasser $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

25 ml de chacune des solutions (a) à (d) sont mélangés et le volume total est ajusté à 1 l avec de l'eau déionisée. La somme des concentrations en ions calcium et magnésium dans cette solution est de 2,5 mmol/l.

Le rapport ionique Ca:Mg est de 4:1 et Na:K est de 10:1. La capacité acide $\text{K}_{\text{S4,3}}$ de cette solution est de 0,8 mmol/l.

Aérer l'eau de dilution jusqu'à atteindre la saturation en oxygène, puis la stocker durant approximativement deux jours sans aération supplémentaire avant utilisation.

Le pH d'une eau de dilution acceptable doit être dans la plage de 6 à 9.

ANNEXE 5

SÉDIMENT ARTIFICIEL - RECOMMANDATIONS POUR LA PRÉPARATION ET LE STOCKAGE

En contraste avec les exigences de la ligne directrice 207 de l'OCDE (40), on recommande une teneur en tourbe de 2 % pour le sédiment artificiel plutôt que de 10 %, du poids sec, afin de correspondre à une teneur organique faible à modérée des sédiments naturels (58).

Pourcentage des constituants secs du sédiment artificiel :

Constituant	Caractéristiques	% du sédiment sec
Tourbe	Tourbe de sphaigne, degré de décomposition : « moyen », séchée à l'air, pas de résidus végétaux visibles, finement broyée (taille de particules $\leq 0,5$ mm)	$2 \pm 0,5$
Sable de quartz	Taille de grains : ≤ 2 mm, mais > 50 % des particules doivent être dans la plage de 50 à 200 μm	76
Argile kaolinique	Teneur en kaolinite ≥ 30 %	22 ± 1
Aliments	<i>Folia urticae</i> , poudre de feuilles d' <i>Urtica sp.</i> (ortie brûlante), finement broyées (taille de particules $\leq 0,5$ mm), ou un mélange de feuille en poudre d' <i>Urtica sp.</i> avec de la cellulose alpha (1:1); conformément aux normes de pharmacie, pour la consommation humaine ; en plus du sédiment sec	0,4 – 0,5 %
Carbonate de calcium	CaCO_3 , pulvérisé, chimiquement pur, en plus du sédiment sec	0,05 - 1
Eau déionisée	Conductivité $\leq 10 \mu\text{S/cm}$, en plus du sédiment sec	30 - 50

Si on s'attend à une concentration élevée en ammoniacque, p. ex. si la substance d'essai est connue pour inhiber la nitrification, il peut être utile de remplacer 50 % de la poudre d'ortie riche en azote par de la cellulose (p. ex., de la poudre de cellulose α , chimiquement pure, taille de particule $\leq 0,5$ mm).

Préparation

La tourbe est séchée à l'air et broyée en une poudre fine (taille de grain $\leq 0,5$ mm, pas de résidus végétaux visibles). Une suspension de la quantité de tourbe voulue est préparée en utilisant une partie de l'eau déionisée devant être ajoutée au sédiment sec (un volume d'eau de 11,5 x le poids sec de tourbe a donné

une suspension de tourbe qui a pu être agitée (8)) en utilisant un dispositif d'homogénéisation haute performance.

Le pH de cette suspension est ajusté à $5,5 \pm 0,5$ avec CaCO_3 . La suspension est conditionnée durant au moins deux jours sous agitation douce à 20 ± 2 °C, afin de stabiliser le pH et d'établir une composante microbienne stable. Le pH est de nouveau mesuré et ajusté à $6,0 \pm 0,5$ avec CaCO_3 si nécessaire. Ensuite l'ensemble de la suspension est mélangé aux autres constituants secs, en prenant en compte l'éventuelle part utilisée pour l'enrichissement. L'eau déionisée restante est ajoutée afin d'obtenir un sédiment homogène. Le pH est de nouveau mesuré et ajusté à 6,5 à 7,5 avec CaCO_3 si nécessaire. Toutefois, si on s'attend à un dégagement d'ammoniac, il peut être utile de conserver le pH du sédiment inférieur à 7,0 (p. ex. entre 6,0 et 6,5). Des échantillons du sédiment sont prélevés afin d'en déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Si on s'attend à un dégagement d'ammoniac, le sédiment artificiel peut être conditionné durant sept jours dans les conditions des essais à venir (p. ex. rapport sédiment:eau de 1:4, hauteur de la couche de sédiment comme dans les récipients d'essai) avant enrichissement avec la substance d'essai, c.-à-d. il doit être recouvert d'eau, laquelle doit être aérée. À la fin de la période de conditionnement, l'eau surjacente devra être enlevée et éliminée. Des échantillons du sédiment sont prélevés afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique total (p. ex. 3 échantillons).

Après quoi, le sable de quartz enrichi est mélangé au sédiment pour chaque niveau de traitement, le sédiment est réparti dans les récipients d'essai d'expériences identiques et recouvert avec l'eau d'essai (p. ex. avec un rapport sédiment:eau de 1:4, une hauteur de la couche de sédiment comme dans les récipients d'essai). Les récipients sont ensuite incubés dans les conditions de l'essai à venir. Ceci définit le point de départ de la période d'équilibration. L'eau surjacente doit être aérée.

La source de nourriture choisie (voir p 23) doit être ajoutée avant ou durant l'enrichissement du sédiment avec la substance d'essai. Elle peut être mélangée dès le départ à la suspension de tourbe (voir plus haut). Toutefois, il est possible d'éviter une dégradation excessive de la source de nourriture avant addition des organismes d'essai - p. ex. en cas de période d'équilibration longue - en réduisant autant que possible la durée entre l'addition des aliments et le début de l'exposition. Afin d'assurer que la nourriture est en contact suffisant avec le composé d'essai, la source de nourriture ne doit pas être mélangée avec le sédiment plus d'une journée après l'enrichissement du sédiment avec la substance d'essai. On peut faire une exception lorsque la durée de la période d'équilibration conduit à une dégradation microbienne excessive des aliments avant ajout des organismes d'essai. Des échantillons du sédiment sont prélevés afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique total (p. ex. 3 échantillons de sédiment enrichis ou témoins).

Le poids sec des composants (tourbe, sable, kaolin) devrait être rapporté en g et en pourcentage du poids sec total.

Le volume d'eau devant être ajouté aux composants secs durant la préparation du sédiment devrait également être rapporté en pourcentage du poids total (p. ex. 100 % de poids sec + 46 % d'eau signifie qu'un poids sec de 1000 g reçoit un total de 460 ml d'eau, ce qui conduit à 1460 g de sédiment humide).

Stockage

Les constituants secs du sédiment artificiel peuvent être stockés dans un endroit frais, sec à température ambiante. Le sédiment humide préparé peut être stocké (uniquement pour un usage en culture) à 4 ± 2 °C à l'abri de la lumière durant 2 à 4 semaines à compter du jour de la préparation (8).

Un sédiment enrichi avec la substance d'essai devrait être utilisé immédiatement, sauf si des informations spécifient qu'il est possible de stocker ce sédiment sans affecter la toxicité et la biodisponibilité de la substance d'essai. Des échantillons de sédiment enrichi peuvent être stockés dans les conditions recommandées pour la substance d'essai donnée jusqu'à analyse.

ANNEXE 6

ESPÈCES OLIGOCHÈTES RECOMMANDÉES POUR LES ESSAIS DE BIOACCUMULATION

***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, oligochaeta**

L'oligochète tubificidé (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) vie dans les sédiments d'eau douce dans des tubes enduits de mucus. Les vers vivent dans ces tubes, la tête en bas, ingérant les particules de sédiment en utilisant les micro-organismes et les débris organiques associés. La portion postérieure ondule généralement dans l'eau surjacent pour permettre au ver de respirer. Bien que cette espèce se rencontre dans une grande variété de sédiments sur tout l'hémisphère nord, *Tubifex tubifex* affectionne particulièrement les grains fins (59). Les raisons de l'adéquation de cette espèce pour des essais écotoxicologiques sont décrites, par exemple, dans (8) (29) (31) (39) (60) (62) (63).

Méthodes de culture

Afin de disposer d'un nombre suffisant de *Tubifex tubifex* pour conduire les essais de bioaccumulation, les vers devront être conservés dans une culture de laboratoire permanente. Un système consistant en un sédiment artificiel basé sur le sol artificiel de la ligne directrice 207 (40) et une eau reconstituée conformément à la ligne directrice 203 de l'OCDE (33) est recommandé pour la culture de *T. tubifex* (8).

Des récipients en verre ou en acier inoxydable d'une hauteur de 12 à 20 cm peuvent être utilisés comme récipients de culture. Chaque récipient de culture est chargé d'une couche de sédiment artificiel humide préparé selon la description de l'Annexe 5. L'épaisseur de la couche de sédiment doit permettre aux vers d'adopter un comportement d'enfouissement naturel (au minimum 2 cm de profondeur pour *T. tubifex*). Une eau reconstituée est ajoutée au système. Opérer soigneusement afin de ne pas perturber le sédiment. Le volume d'eau est doucement aéré (p. ex. 2 bulles par seconde avec un air filtré à 0,45 µm) via une pipette pasteur placée 2 cm au-dessus de la surface du sédiment. La température de culture recommandée est de 20 ± 2 °C.

Les vers sont ajoutés au système de culture avec une charge maximum de 20 000 individus/m² de surface de sédiment. Une charge supérieure peut provoquer une réduction des vitesses de croissance et de reproduction (43).

Dans des cultures en sédiment artificiel, les vers doivent être nourris. Un régime alimentaire consistant en du poisson finement broyé, p. ex. du TetraMin[®], peut servir de nutriment supplémentaire (8) ; Klerks 1994, communication personnelle. La fréquence de l'alimentation doit permettre une croissance et une reproduction suffisantes et doit maintenir au minimum l'accumulation d'ammoniaque et la croissance de champignons dans la culture. La nourriture peut être administrée deux fois par semaine (p. ex. à 0,6 à 0,8 mg par cm² de surface sédimentaire). L'expérience a montré que l'utilisation de nourriture mise en suspension et homogénéisée dans de l'eau déionisée peut faciliter une distribution homogène de la nourriture sur la surface du sédiment, dans les récipients de culture.

Afin d'éviter l'accumulation d'ammoniaque, l'eau surjacente devrait être renouvelée en utilisant un système dynamique ou, manuellement, au moins une fois par semaine. Dans les cultures de réserve, le sédiment devrait être remplacé tous les trois mois.

Si seuls des vers adultes sont nécessaires, il est possible de réaliser l'échantillonnage des vers à partir de la culture en tamisant le sédiment de culture au travers d'un tamis de 1 mm. Pour conserver des cocons, il convient d'utiliser un tamis de 0,5 mm et pour les jeunes, un tamis de 0,25 mm. Une fois que le sédiment est passé au travers, les tamis peuvent être placés dans de l'eau reconstituée. Les vers quittent le tamis et peuvent ensuite être prélevés dans l'eau en utilisant une pince en acier souple ou une pipette dont l'extrémité a été adoucie à la flamme.

Seuls des spécimens intacts et clairement identifiés de *Tubifex tubifex* (p. ex. (64)) sont utilisés pour démarrer l'essai ou de nouvelles cultures. Les vers malades ou blessés ainsi que les cocons infestés par une mycose doivent être éliminés.

Une culture synchronisée peut fournir des vers d'un âge spécifique à intervalles adaptés à la demande. De nouveaux récipients de culture sont mis en place aux intervalles voulus (p. ex. toutes les deux semaines), en démarrant avec des animaux d'âge connu (p. ex. des cocons). Dans les conditions de culture décrites ici, les vers sont adultes après 8 à 10 semaines. Les cultures peuvent être « récoltées » lorsque les vers ont formé de nouveaux cocons, p. ex. après dix semaines. Les adultes échantillonnés peuvent être utilisés pour les essais, et de nouvelles cultures peuvent être démarrées avec les cocons.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, oligochaeta**

Lumbriculus variegatus (Lumbriculidae, Oligochaeta) est également un habitant des sédiments d'eau douce présent partout sur terre et il est largement utilisé dans des essais écotoxicologiques. On peut trouver des informations sur la biologie, les conditions de culture et la sensibilité de l'espèce dans (1) (6) (9) (36). Il est également possible de cultiver *Lumbriculus variegatus* dans le sédiment artificiel recommandé pour *T. tubifex* conformément à (8) avec certaines limitations. Comme, dans la nature, *L. variegatus* préfère des sédiments plus grossiers que *T. tubifex* (59), les cultures de laboratoire avec le sédiment artificiel utilisé pour *T. tubifex* peuvent s'éteindre après 4 à 6 mois. L'expérience a montré que *L. variegatus* peut être conservé dans un substrat sableux (p. ex. du quartz, des graviers fins) dans un système dynamique, en utilisant une alimentation à base de poissons, durant plusieurs années sans renouvellement du substrat. Un avantage majeur de *L. variegatus* par rapport à d'autres espèces d'oligochètes est sa rapidité de reproduction, qui conduit à une augmentation rapide de la biomasse des populations cultivées en laboratoire (1) (6) (9) (10).

Méthodes de culture

Les conditions de culture pour *Lumbriculus variegatus* sont détaillées par Phipps et al. (1993) (10), Brunson et al. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Un bref résumé de ces conditions est donné ci-dessous.

Les vers peuvent être cultivés dans de grands aquariums (57 à 80 l) à 23 °C avec une photopériode de 16L:8O (100 à 1000 lux) en utilisant une eau naturelle renouvelée quotidiennement (45 à 50 l par aquarium). Le substrat est préparé en découpant des serviettes en papier brun non blanchi en rubans, lesquels peuvent ensuite être mélangés à l'eau de culture durant quelques secondes pour donner de petits morceaux de substrat de papier. Ce substrat peut ensuite être utilisé directement dans les aquariums de culture de *Lumbriculus* en couvrant le fond du récipient, ou être stocké congelé dans de l'eau déionisée pour une utilisation ultérieure. Un substrat neuf dans le réservoir durera généralement environ deux mois.

Chaque culture de vers démarre avec 500 à 1000 vers et est alimentée par 10 ml d'une suspension contenant 6 g d'un starter à base de truite, 3 fois par semaine, en conditions dynamiques. Les cultures statiques ou semi-statiques devraient être alimentées moins fréquemment afin d'éviter le développement de bactéries et de champignons. Le substrat de nourriture et de papier devrait être analysé en y recherchant les produits chimiques utilisés dans les essais de bioaccumulation.

Dans ces conditions, le nombre d'individus de la culture double généralement en environ 10 à 14 jours.

Lumbriculus variegatus peut être sorti des cultures p. ex. en transférant soit le substrat avec un filet à mailles fines, soit les organismes en utilisant une pipette de verre à grande ouverture (environ 5 mm de diamètre) dont l'extrémité a été adoucie à la flamme, vers un béccher indépendant. Si du substrat est transféré dans ce béccher, le béccher contenant des vers et du substrat est laissé une nuit dans des conditions dynamiques, ce qui permet d'évacuer le substrat du béccher, alors que les vers restent dans le fond du récipient. Ils peuvent ensuite être introduits dans des récipients de culture fraîchement préparés, ou traités pour l'essai comme cela est indiqué dans (1) et (6). Il conviendra d'éviter de blesser ou de provoquer une autotomie des vers, p. ex. en utilisant des pipettes dont les bords ont été adoucis à la flamme ou des pinces en acier inoxydable, pour la manipulation de ces vers.

Un problème critique lors de l'utilisation de *L. variegatus* dans des essais de bioaccumulation concerne son mode de reproduction (architomie suivie de morphallaxie). Cette reproduction asexuée conduit à deux fragments qui, pendant un certain temps, ne s'alimentent pas jusqu'à ce que la partie tête ou queue soit régénérée (p. ex. (36) (37)). Ceci signifie que l'absorption de sédiment et de contaminant par ingestion ne peut avoir lieu en continu chez *L. variegatus* comme chez les tubificidés, qui ne se reproduisent pas par fragmentation.

Par conséquent, une synchronisation doit être réalisée afin de minimiser une reproduction et une régénération non contrôlée, qui s'ensuivraient d'une variation importante des résultats des essais. Une telle variation peut survenir, lorsque certains individus, qui se sont fragmentés et par conséquent ne s'alimentent pas durant un certain temps, sont moins exposés à la substance d'essai que les autres individus, qui ne se sont pas fragmentés durant l'essai, p. ex. (38). 10 à 14 jours avant le début de l'exposition, les vers devraient être fragmentés artificiellement (synchronisation) (65). Il est préférable d'utiliser des grands vers, ne montrant, de préférence, pas de signes de fragmentation récente. Ces vers peuvent être placés sur une lame de verre dans une goutte d'eau de culture, et disséqués dans la région médiane du corps avec un scalpel. Il convient de veiller à ce que les extrémités postérieures soient de taille similaire. On doit ensuite laisser les extrémités postérieures régénérer de nouvelles têtes dans un récipient de culture contenant un substrat identique à celui utilisé dans la culture et de l'eau reconstituée, jusqu'au début de l'exposition. La régénération de nouvelles têtes est indiquée par l'enfouissement des vers synchronisés, dans le substrat (la présence des têtes régénérées peut être confirmée par inspection d'un sous échantillon représentatif au microscope binoculaire). Les organismes d'essai sont par la suite supposés être dans un état physiologique similaire. Ceci signifie que, lorsque de la régénération par morphallaxie survient chez des vers synchronisés en cours d'essai, virtuellement tous les animaux sont supposés être également exposés au sédiment enrichi. L'alimentation des vers synchronisés devrait être réalisée dès que les vers commencent à s'enfouir dans le substrat, ou 7 jours après dissection. Le régime alimentaire devra être comparable à celui des cultures classiques, mais il est recommandé d'alimenter les vers synchronisés avec la même source de nourriture que celle utilisée durant l'essai. Les vers devraient être conservés à la température de l'essai, soit $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Après régénération, des vers complets, intacts, de taille similaire, nageant ou rampant activement lors d'une stimulation douce, devraient être utilisés pour l'essai. Il conviendra d'éviter les blessures ou l'autotomie des vers, p. ex. en utilisant des pipettes dont les bords ont été adoucis à la flamme, ou des pinces en acier inoxydable pour la manipulation de ces vers.

Lorsque *Lumbriculus variegatus* est utilisé pour les essais, du fait du mode de reproduction particulier de cette espèce, le nombre de vers devrait augmenter durant l'essai, si les conditions le permettent (6). Une

absence de reproduction lors d'un essai de bioaccumulation avec *L. variegatus* devrait être relevée et prise en compte lors de l'interprétation des résultats.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, oligochaeta (non validé par des essais comparatifs interlaboratoires)**

On trouve *Branchiura sowerbyi* dans une variété de type de sédiment de réservoirs, de lacs, d'étangs et de rivières, initialement dans les régions tropicales. On peut également les trouver dans des zones d'eau chaude de l'hémisphère nord. Toutefois, ils sont plus abondants dans les sédiments de boue argileuse à forte teneur en matière organique. En outre, les vers vivent dans la couche de sédiment. Même l'extrémité postérieure des vers est généralement enfouie. Cette espèce est facilement identifiée par les filaments branchiaux sur la partie postérieure. Les adultes peuvent atteindre une longueur de 9 à 11 cm et un poids humide de 40 à 50 mg. Les vers ont un taux de reproduction élevé, avec un temps de doublement de la population inférieur à 2 semaines, dans les conditions de température et d'alimentation décrites ci-dessous (Aston et al., 1982, (65)). *B. sowerbyi* a été utilisé à la fois dans des études de toxicité et de bioaccumulation (Marchese & Brinkhurst 1996, (31), Roghair et al. 1996, (67) respectivement).

Méthodes de culture

Un résumé des conditions de culture est donné ci-dessous pour *Branchiura sowerbyi* (fourni par Mercedes R. Marchese, INALI, Argentine, et Carla J. Roghair, RIVM, Pays-Bas).

Il n'existe pas une technique unique pour la culture des organismes d'essai. Il est possible de cultiver les organismes en utilisant un sédiment naturel non contaminé (31). L'expérience a montré qu'un milieu consistant en un sédiment naturel et du sable améliore l'état des vers par rapport au sédiment naturel pur (32) (67). Des béciers de 3 l contenant 1500 ml de milieu sédiment/eau, consistant en 375 ml de sédiment naturel non contaminé (environ 10 % de carbone organique total ; environ 17 % de particules fines $\leq 63 \mu\text{m}$), 375 ml de sable propre (M32), et 750 ml d'eau reconstituée ou d'eau du robinet déchlorée peuvent être utilisés pour la culture (31) (32) (67). Il est également possible d'utiliser des serviettes en papier comme substrat de culture, mais la croissance de population est plus lente que dans un sédiment naturel. Dans des systèmes semi-statiques, la couche d'eau, dans le bécier, est lentement aérée, et l'eau surjacente doit être renouvelée chaque semaine.

Pour démarrer, chaque bécier contient 25 jeunes vers. Après deux mois, les grands vers sont prélevés dans le sédiment avec une pince et sont placés dans un nouveau bécier avec un milieu sédiment/eau fraîchement préparé. L'ancien bécier contient également des cocons et des jeunes vers. De cette manière, il est possible de récolter jusqu'à 400 jeunes vers par bécier. Des vers adultes peuvent être utilisés pour la reproduction durant au moins un an.

Les cultures devraient être maintenues à une température de 21 à 25 °C. Les variations de température devraient être maintenues entre ± 2 °C. Le temps nécessaire au développement embryonnaire à partir de la ponte d'un œuf jusqu'à ce que le jeune quitte le cocon est d'environ trois semaines à 25 °C. La production d'œufs obtenue par un vers survivant de *B. sowerbyi* s'est avérée être dans la plage de 6,36 (31) à 11,2 (30) dans la boue à 25 °C. Le nombre d'œufs par cocon va de 1,8 à 2,8 (66) (69) ou jusqu'à 8 (68).

L'oxygène dissous, la dureté de l'eau, la température et le pH devraient être mesurés chaque semaine. Une alimentation à base de poisson (p. ex. TetraMin[®]) peut être ajoutée en suspension deux ou trois fois par semaine *ad libitum*. Les vers peuvent également être nourris avec de la salade décongelée *ad libitum*.

Un avantage majeur de cette espèce est la biomasse individuelle élevée (jusqu'à 40 à 50 mg de poids humide par individu). Par conséquent, cette espèce peut être utilisée pour des essais de bioaccumulation de

composés d'essai non radiomarqués. Elle peut être exposée dans les systèmes utilisés pour *T. tubifex* ou *L. variegatus* avec un unique individu par expérience (11). Le nombre d'expériences identiques devra toutefois être augmenté, à moins d'utiliser des chambres d'essai plus grandes (11). Par ailleurs, le critère de validité concernant le comportement fouisseur doit être ajusté pour cette espèce.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. Dans ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (2) EC (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Règlement de la Commission (CE) n° 1488/94 sur l'évaluation des risques des substances existantes, Directive 98/8/EC du Parlement européen et du Conseil concernant la mise sur le marché des produits biocides; Sections I à IV. Office des publications officielles des Communautés européennes (Commission européenne), Luxembourg.
- (3) OCDE (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OCDE Monographie No. 60. Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), Paris.
- (4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. et Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.
- (5) OCDE (1996a). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques : Bioconcentration : Essai dynamique chez le poisson. Ligne directrice n° 305. OCDE, Paris.
- (6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (7) OCDE (2004). Ligne directrice pour les essais de produits chimiques n° 218: « Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment chargé ». OCDE, Paris.
- (8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.
- (9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. et Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.
- (10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on "Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.
- (13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a *Thalassia* seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301-310.

- (14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow} /log BCF correlations. Dans : R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim
- (15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1709-1725.
- (16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. *Wat. Res.* 23, 1443-1450.
- (17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24, 1225-1231.
- (18) Kukkonen, J. et Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. et Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29, 1501-1514.
- (20) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications de l'OCDE sur l'environnement, la santé et la sécurité, Série de l'OCDE sur les essais et évaluations, n° 23.
- (21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.
- (22) Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris.
<http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (23) OCDE (1996c). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OCDE, Paris.
- (24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. *Microchem. J.* 43, 165-172.
- (25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. Dans Hutzinger, O. (editor), *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J* (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22, 701-707.
- (28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1061-1072.
- (30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. *Aquaculture* 26, 155-160.
- (31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia* 334, 163-168.

- (32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719102027.
- (33) OCDE (1992b). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques n° 203. Poisson, essai de toxicité aiguë. OCDE, Paris.
- (34) OCDE (1992c). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques n° 210. Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie. OCDE, Paris.
- (35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.
- (36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- (39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* 8, 111-124.
- (40) OCDE (1984). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques n° 207. Ver de terre, essais de toxicité aiguë. OCDE, Paris.
- (41) Environnement Canada (1995). Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiments de contrôle dopé avec un produit toxique de référence. Série de la protection de l'environnement. Rapport SPE 1/RM/30.
- (42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23, 588-595.
- (43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): *Aquatic Oligochaeta Biology*, 175-184. Plenum Press, New York.
- (44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.
- (45) Hoofman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.
- (46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. *Chemosphere* 32, 1897-1905.
- (47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.
- (48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1431-1436.
- (49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography*, 30, 1099-1105.

- (50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- (51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- (53) Zok, S., Gorge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Sci. Total Environment* 109/110, 411-421
- (54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische - Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.
- (55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.
- (57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. *Arch. Hydr.* 63, 310-386.
- (60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. *Environ. Sci. Technol.* 21, 785-790.
- (61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 47-67.
- (62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 69-78.
- (63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. Dans : A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ.* No. 22.
- (65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. *Aquaculture* 29, 137-145.
- (67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to

the midge *Chironomus riparius* and the tubificid oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719101026.

- (68) Aston, R.J. (1984). The culture of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. *Aquaculture* 40, 89-94.
- (69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 278, 267-274

Pièces jointes 2: Liste de référence des étapes importantes

Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Schallnaß, H., Meller, M., Nagel, R. (1997a). Entwicklung und Erprobung eines Bioakkumulationstests mit endobenthischen Organismen. F + E-Vorhaben 106 03 106, im Auftrag des Umweltbundesamtes, Februar 1997, 130 p., Report in German.

Egeler, Ph., J. Römbke, M. Meller, Th. Knacker, C. Franke, G. Studinger and R. Nagel (1997b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) under standardised laboratory conditions. *Chemosphere* 35: 835-852.

Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., & Nagel, R. (1999a). Bioaccumulation test with tubificid sludgeworms in artificial media – development of a standardisable method. *Hydrobiologia* 406: 271-280.

Egeler Ph. & Römbke J. (1999b). Workshop on "Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report. R + D-Project 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin, Germany.

UBA (1999). Entwicklung und Erprobung eines Bioakkumulationstests mit endobenthischen Organismen. UBA-Texte 2/99. ISSN 0722-186X.

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.