

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

### Bioaccumulation chez les oligochètes terrestres

#### INTRODUCTION

1. Parmi les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques relatives au devenir environnemental, celles intitulées « Bioconcentration: essai dynamique chez le poisson » (LD 305) et « Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fouisseurs » (LD 315) ont été publiées, respectivement, en 1996 et en 2008. Il est difficile voire impossible d'extrapoler aux organismes terrestres comme les vers de terre les données sur la bioaccumulation en milieu aquatique. Des calculs de modèles fondés sur la lipophilie d'un composé, voir par exemple (15) ou (35), sont actuellement utilisés pour évaluer la bioaccumulation des substances chimiques dans le sol, notamment dans le document d'orientation technique de l'UE (13). La nécessité d'appliquer une méthode d'essai comportant des compartiments spécifiques a déjà été exposée (56). Une telle méthode est particulièrement importante pour évaluer l'empoisonnement secondaire dans les chaînes alimentaires terrestres (4). Plusieurs méthodes d'essai nationales portent sur la bioaccumulation chez les organismes autres que les poissons, par exemple (2) et (72). Une méthode d'évaluation de la bioaccumulation chez les vers de terre (*Eisenia fetida*, Savigny) et les enchytrées dans des sols contaminés a été élaborée par l'American Society for Testing and Materials (ASTM) (3). Une méthode d'essai internationalement reconnue visant à déterminer la bioaccumulation dans un sol chargé permettra de mieux évaluer les risques des produits chimiques pour les écosystèmes terrestres, notamment (27) et (53).

2. Les invertébrés géophages sont exposés aux substances présentes dans le sol. Au nombre de ces animaux, les oligochètes terrestres jouent un rôle important dans la structure et la fonction des sols (18) (20). Les oligochètes terrestres vivent dans le sol et, partiellement, à sa surface (notamment sur la litière) ; ils représentent fréquemment l'espèce la plus abondante en termes de biomasse (54). Leur rôle dans la bioturbation du sol et leur fonction de proies confèrent à ces animaux une influence considérable sur la biodisponibilité des substances pour d'autres organismes comme les prédateurs invertébrés (dont les acariens et les coléoptères ; voir notamment (64)) ou vertébrés (dont les renards et les mouettes) (19) (62). Certaines espèces d'oligochètes terrestres actuellement utilisées dans les essais écotoxicologiques sont décrites à l'annexe 5.

3. Le guide de l'ASTM sur les essais en laboratoire consacrés à la toxicité du sol ou à la bioaccumulation chez les vers de terre *Eisenia fetida* et les enchytrées *Enchytraeus albidus* (3) fournit nombre d'informations essentielles qui ont servi à mettre en œuvre la méthode d'essai exposée ici sur la bioaccumulation dans le sol. Parmi les autres références utilisées figurent les Lignes directrices n° 305 et n° 315 de l'OCDE, respectivement intitulées « Bioconcentration : essai dynamique chez le poisson » (48) et « Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fouisseurs » (52). Des expériences pratiques tirées d'études et de diverses publications sur la bioaccumulation dans le sol, dont (1) (6) (11) (12) (26) (37) (41) (43) (57) (60) (76) (78) (79), ont également largement inspiré la présente Ligne directrice.

4. Cette méthode d'essai s'applique essentiellement aux substances chimiques organiques neutres, stables, qui ont tendance à être adsorbées dans le sol. Elle permet également d'évaluer la bioaccumulation de composés organométalliques stables, associés au sol. Cette méthode s'applique aussi aux métaux et autres éléments présents à l'état de traces.

© OCDE, (2010).

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.

## PRÉREQUIS

5. Les essais visant à mesurer la bioaccumulation d'une substance dans les oligochètes terrestres ont été réalisés avec des métaux lourds (voir notamment (63)) et des substances organiques persistantes dont le  $\log K_{ow}$  ( $K_{oc}$ ) se situe entre 3.0 et 6.0 (37). Ces essais s'appliquent également aux :

- Substances dont le  $\log K_{ow}$  est supérieur à 6.0 (substances super-hydrophobes);
- Substances appartenant à la classe des substances organiques connues pour leur potentiel de bioaccumulation dans les organismes vivants, par exemple les substances fortement adsorbantes ou tensio-actives;
- Substances qui présentent un potentiel de bioaccumulation de par leurs caractéristiques structurelles (analogues des substances dont le potentiel de bioaccumulation est connu);
- Métaux.

6. Avant de débiter toute étude, il convient de disposer de certaines informations sur la substance d'essai, comme le nom courant, le nom chimique (de préférence le nom IUPAC), la formule structurale, le numéro CAS, la pureté, les mesures de sécurité, les conditions de stockage appropriées et les méthodes d'analyse. Il faut aussi connaître les propriétés suivantes de la substance:

- (a) solubilité dans l'eau;
- (b) coefficient de partage octanol-eau,  $K_{ow}$ ;
- (c) coefficient de partage sol-eau, exprimé par  $K_{oc}$ ;
- (d) pression de vapeur;
- (e) dégradabilité (dans le sol ou l'eau notamment);
- (f) métabolites connus.

7. Il est possible d'utiliser des substances d'essai radiomarquées ou non. Cependant, l'utilisation de substances radiomarquées est recommandée car elle facilite l'analyse. La décision d'y recourir dépendra des limites de détection ou de la nécessité de mesurer le composé parent et les métabolites. Dans le cas où une substance radiomarquée est utilisée et où le total des résidus radioactifs est mesuré, il est important que les résidus radiomarqués tant dans le sol que dans les organismes d'essai soient définis en pourcentages du composé parent et du composé marqué non-parent, par exemple dans des échantillons prélevés à un état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption, pour permettre de calculer le facteur de bioaccumulation (FBA) pour le composé parent et les métabolites du sol pertinents (voir paragraphe 50). Il peut s'avérer nécessaire de modifier la méthode décrite ici, en particulier en vue de disposer d'une biomasse suffisante pour mesurer les substances d'essai organiques non-radiomarquées ou les métaux. Lorsque le total des résidus radioactifs est mesuré (par comptage en scintillation liquide après extraction, combustion ou solubilisation des tissus), le facteur de bioaccumulation est basé sur le composé parent et sur les métabolites. Il est préférable que le FBA soit calculé sur la base de la concentration du composé parent dans les organismes et du total des résidus radioactifs. Ensuite, le facteur d'accumulation biota-sol (BSAF) [biota-soil accumulation factor], normalisé par rapport à la teneur en lipides des vers et à la teneur en carbone organique (CO) du sol, est calculé à partir du FBA pour garantir la comparabilité des résultats de différents essais de bioaccumulation.

8. Il convient que la toxicité de la substance d'essai envers les espèces utilisées dans l'essai soit connue, notamment la concentration d'effet ( $EC_x$ ) ou la concentration létale ( $CL_x$ ) pour la durée de la phase d'absorption ((13) par exemple). La concentration de la substance d'essai représente de préférence environ 1 % de sa  $CL_{50}$  aiguë asymptotique, et elle est au moins dix fois supérieure à sa limite de détection dans le sol par la méthode d'analyse utilisée. La préférence est donnée, lorsqu'elles sont disponibles, aux valeurs

de toxicité issues d'études à long terme sur les effets sublétaux observés (50) et (51). Si ces données ne sont pas disponibles, un essai de toxicité aiguë apportera des informations utiles (voir notamment (22)).

9. Il est nécessaire de disposer d'une méthode d'analyse appropriée, dont on connaît l'exactitude, la précision et la sensibilité pour quantifier la substance dans les solutions d'essai, dans le sol et dans le matériel biologique; il est aussi nécessaire de disposer des détails de la préparation et du stockage des échantillons, et des fiches de données de sécurité des substances. Il convient également de connaître les limites de détection analytiques de la substance d'essai dans le sol et les tissus du ver. Si une substance d'essai marquée au  $^{14}\text{C}$  est utilisée, il est nécessaire de connaître aussi la radioactivité spécifique (c'est-à-dire en  $\text{Bq}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) et le pourcentage de radioactivité associé aux impuretés. La radioactivité spécifique de la substance d'essai sera suffisamment élevée pour faciliter l'analyse et les concentrations d'essai utilisées ne provoqueront pas d'effets toxiques.

10. L'essai peut être réalisé sur sol naturel ou artificiel. Avant le début de l'essai, il convient de connaître les caractéristiques du sol naturel utilisé, par exemple son origine ou ses constituants, son pH, sa teneur en carbone organique, sa distribution granulométrique (pourcentages de sable, de limon et d'argile), et sa capacité de rétention d'eau (CRE) (3) (47).

### PRINCIPE DE L'ESSAI

11. Les paramètres qui caractérisent la bioaccumulation d'une substance se composent du facteur de bioaccumulation (FBA), de la constante de vitesse d'absorption ( $k_a$ ) et de la constante de vitesse d'élimination ( $k_e$ ). L'annexe 1 donne des définitions détaillées de ces paramètres.

12. L'essai consiste en deux phases, la phase d'absorption (exposition) et la phase d'élimination (post-exposition). Durant la phase d'absorption, des groupes répliqués de vers sont exposés au sol chargé avec la substance d'essai. En plus des animaux d'essai, des groupes témoins de vers sont conservés dans des conditions identiques, sans la substance d'essai. Le poids sec et la teneur en lipides des organismes d'essai sont mesurés. Pour ce faire, on peut utiliser des vers du groupe témoin. Les valeurs de fond analytiques (essai à blanc) peuvent être obtenues en analysant des échantillons des vers et du sol témoins. Pour la phase d'élimination, les vers sont transférés dans un sol dépourvu de la substance d'essai. 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. Elle permet de recueillir des informations sur la vitesse à laquelle la substance d'essai est excrétée par l'organisme d'essai (25). Si un état stationnaire n'a pas été atteint durant la phase d'absorption, il est préférable de déterminer les paramètres cinétiques – constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, facteur de bioaccumulation cinétique  $\text{FBA}_k$  – en s'appuyant sur l'ajustement simultané des résultats des phases d'absorption et d'élimination. La concentration de la substance d'essai dans ou sur les vers est contrôlée pendant toute la durée des deux phases de l'essai.

13. Durant la phase d'absorption, des mesures sont effectuées pendant des temps de prélèvement pouvant durer jusqu'à 14 jours (enchytrées) ou 21 jours (vers de terre) jusqu'à ce que l'état stationnaire soit atteint (11) (12) (67). On identifie un état stationnaire lorsque le tracé de la concentration dans les vers en fonction du temps est parallèle à l'axe du temps, et lorsque trois analyses successives de la concentration réalisées sur des échantillons prélevés à des intervalles d'au moins deux jours ne diffèrent pas de plus de  $\pm 20\%$  l'une par rapport à l'autre sur la base de comparaisons statistiques (par exemple, analyse de la variance, analyse de la régression).

14. La phase d'élimination consiste à transférer les organismes d'essai dans des récipients qui contiennent un substrat identique, mais sans la substance d'essai. Durant la phase d'élimination, les mesures sont réalisées pendant des durées pouvant aller jusqu'à 14 jours (enchytrées) ou 21 jours (vers de terre), à moins qu'une détermination analytique antérieure n'ait mis en évidence une diminution de 90 %

des résidus de substance d'essai dans les vers. La concentration de la substance d'essai dans les vers à la fin de la phase d'élimination est consignée comme résidus non éliminés. Le facteur de bioaccumulation à l'état stationnaire [Steady State] ( $FBA_{ss}$ ) est calculé de préférence à la fois comme le rapport de la concentration dans les vers ( $C_a$ ) à celle dans le sol ( $C_s$ ) à un état stationnaire apparent, et comme un facteur de bioaccumulation cinétique ( $FBA_K$ ), c'est-à-dire comme le rapport de la constante de vitesse d'absorption à partir du sol ( $k_s$ ) à la constante de vitesse d'élimination ( $k_e$ ) (voir l'annexe 1 pour les définitions) en supposant une cinétique du premier ordre (voir l'annexe 2 pour les calculs). Si la cinétique du premier ordre n'est manifestement pas applicable, il convient d'employer d'autres modèles.

15. La constante de vitesse d'absorption, la constante de vitesse d'élimination (ou les constantes, si d'autres modèles ont été utilisés), 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 d'équations de modèles à l'aide de programmes informatiques (voir l'annexe 2). La qualité de l'ajustement d'un modèle peut être déterminée à partir du coefficient de corrélation ou du coefficient de détermination (des coefficients proches de 1 indiquent une bonne qualité d'ajustement) ou de la loi du chi-deux. De plus la grandeur de l'écart-type ou de l'intervalle de confiance autour des paramètres estimés peut donner une bonne indication de la qualité de l'ajustement du modèle.

16. Pour réduire la variabilité des résultats pour les substances de lipophilie élevée, les facteurs de bioaccumulation sont exprimés par rapport à la teneur en lipides et à la teneur en carbone organique (teneur en Kg de carbone organique (CO) du sol par teneur en kg de lipides des vers). Cette approche s'appuie sur le fait que, pour certaines classes chimiques, il existe une relation claire entre le potentiel de bioaccumulation et la lipophilie; cette relation a été clairement établie pour le poisson (45). Il existe une relation entre la teneur en lipides du poisson et la bioaccumulation de ces substances. Pour les organismes benthiques, des corrélations similaires ont été trouvées (voir notamment (28) (42)). Cette corrélation a également été démontrée pour les oligochètes terrestres (5) (6) (7) (15). Si on dispose de suffisamment de tissu de vers, il est possible de déterminer la teneur en lipides des animaux d'essai sur le même matériel biologique que celui utilisé pour déterminer la concentration de la substance d'essai. Il est également possible de mesurer la teneur en lipides en utilisant des animaux témoins.

## VALIDITÉ DE L'ESSAI

17. Pour qu'un essai soit valable, les critères suivants seront remplis tant concernant les animaux témoins que les animaux traités:

- A l'issue de l'essai, la mortalité totale au cours des phases d'absorption et d'élimination ne dépasse pas 10 % (vers de terre) ou 20 % (enchytrées) du nombre total de vers introduits;
- Avec *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*, la perte de poids moyenne mesurée à la fin des phases d'absorption et d'élimination ne dépasse pas 20 % du poids frais initial au début de chaque phase.

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

### *Espèces d'essai*

18. Différentes espèces d'oligochètes terrestres sont recommandées pour les essais sur la bioaccumulation. Les espèces les plus couramment employées, *Eisenia fetida* ou *Eisenia andrei* (vers de terre) ou encore *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* ou *Enchytraeus luxuriosus* (enchytrées), sont décrites à l'annexe 5.

### *Appareillage*

19. Il convient d'éviter avec soin d'utiliser pour l'appareillage des matériaux susceptibles de dissoudre ou d'adsorber la substance d'essai ou de laisser s'échapper des substances ayant un effet délétère sur les animaux d'essai. Il est possible d'utiliser des récipients rectangulaires ou cylindriques standard, faits dans un matériau chimiquement inerte et d'une capacité adaptée, conforme au taux de charge, c'est-à-dire au nombre de vers d'essai. De l'acier inoxydable, du plastique ou du verre peut être utilisé pour tout équipement entrant en contact avec le milieu d'essai. Les récipients d'essai devront être fermés de manière appropriée, pour éviter que les vers ne s'échappent, tout en assurant un apport d'air suffisant. Du verre silanisé peut s'avérer nécessaire pour des substances de coefficient d'adsorption élevé comme les pyréthroides synthétiques. Dans ces cas de figure, l'équipement devra être jeté après usage (48). Il conviendra d'éviter l'évaporation des substances radiomarquées et des substances chimiques volatiles. On utilisera des pièges (par exemple des flacons de lavage des gaz) contenant un absorbant permettant de capter d'éventuels résidus susceptibles de s'évaporer des récipients d'essai.

### *Sol*

20. Il convient que le sol d'essai soit 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 pouvoir s'enfouir dans le sol.

21. Il est recommandé d'utiliser comme substrat lors des essais le sol artificiel décrit dans la Ligne directrice n° 207 de l'OCDE (47). La préparation du sol artificiel en vue d'essais sur la bioaccumulation est décrite à l'annexe 4, où figurent également des recommandations relatives au stockage de ce sol artificiel. Tout sol artificiel séché à l'air peut être stocké à température ambiante jusqu'à son utilisation.

22. Toutefois, il est possible d'utiliser des sols naturels provenant de sites non pollués comme sol d'essai et/ou d'élevage. Les sols naturels sont caractérisés au moins par leur origine (site de prélèvement), leur pH, leur teneur en carbone organique, leur distribution granulométrique (pourcentage de sable, de limon et d'argile), leur capacité maximale de rétention d'eau ( $CRE_{max}$ ), et leur teneur en eau (3). La recherche de micropolluants dans le sol ou dans ses constituants, préalablement à son utilisation, devrait fournir des informations utiles. En cas d'utilisation d'un sol naturel prélevé sur des terres agricoles, il convient que ce dernier n'ait pas été traité avec des produits phytopharmaceutiques ou n'ait pas fait l'objet d'un épandage de fumier d'animaux traités pendant au moins un an avant l'échantillonnage, ou d'un épandage d'engrais organiques pendant au moins six mois avant l'échantillonnage (49). Les procédures de manipulation des sols naturels avant utilisation dans le cadre d'essais écotoxicologiques sur des oligochètes en laboratoire sont décrites dans le document de l'ASTM (3). La durée de stockage des sols naturels au laboratoire est aussi courte que possible.

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

23. La substance d'essai est incorporée dans le sol. Il convient de prendre en compte les propriétés physico-chimiques de cette substance. Une substance d'essai soluble dans l'eau est entièrement dissoute dans l'eau avant d'être mélangée au sol. La procédure de chargement recommandée pour les substances d'essai peu solubles dans l'eau consiste à enrober un ou plusieurs des constituants du sol (artificiel) avec la substance d'essai. Par exemple, le sable de quartz, ou une portion de celui-ci, peut être trempé dans une solution de la substance d'essai dans un solvant organique adapté, lequel est ensuite lentement évaporé jusqu'à dessiccation. La fraction enrobée peut ensuite être mélangée avec le sol mouillé. Cette procédure a pour principal avantage de n'introduire aucun solvant dans le sol. En cas d'utilisation d'un sol naturel, la substance d'essai peut être ajoutée soit par chargement d'une portion du sol séchée à l'air comme décrit précédemment pour le sol artificiel, soit par mélange avec le sol mouillé, puis évaporation si un agent de

solubilisation est utilisé. En règle générale, il conviendra d'éviter autant que possible tout contact du sol mouillé avec les solvants. Les éléments suivants sont à prendre en considération (3):

- Si un solvant autre que l'eau est utilisé, il convient qu'il soit miscible à l'eau et/ou puisse être éliminé (par évaporation notamment) pour ne laisser que la substance chimique d'essai sur le sol ;
- Si un témoin solvant est utilisé, aucun témoin négatif n'est nécessaire. Le témoin solvant présentera la plus forte concentration de solvant ajouté au sol et le solvant en question sera issu du même lot que celui utilisé pour la solution mère. La toxicité et la volatilité du solvant ainsi que la solubilité de la substance d'essai dans le solvant sélectionné constituent les principaux critères de choix pour l'agent de solubilisation.

24. Pour les substances peu solubles dans l'eau et les solvants organiques, 2.0 à 2.5 g de sable quartzique finement broyé par récipient d'essai peuvent être mélangés, au moyen d'un mortier et d'un pilon par exemple, à la quantité nécessaire de la substance d'essai pour obtenir la concentration expérimentale voulue. Ce mélange de sable quartzique et de la substance d'essai est ajouté au sol préhumidifié, auquel il est mélangé complètement après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est réparti entre les récipients d'essai. On répète la procédure pour chaque concentration expérimentale et on prépare un témoin approprié de 2.0 à 2.5 g de sable quartzique finement broyé par récipient d'essai.

25. La concentration de la substance d'essai dans le sol est déterminée après chargement. La répartition homogène de la substance d'essai dans le sol est contrôlée avant l'introduction des organismes d'essai. La méthode de chargement choisie et les raisons de ce choix sont notées (23).

26. Idéalement, il convient d'établir un équilibre entre le sol et l'eau interstitielle avant l'ajout des organismes ; une période de quatre jours à 20 °C est recommandée. Pour un grand nombre de substances chimiques organiques faiblement solubles dans l'eau, le laps de temps nécessaire pour qu'un véritable équilibre soit atteint entre les parties adsorbées et dissoutes peut s'étendre sur plusieurs jours ou plusieurs mois. Selon l'objectif de l'étude, par exemple lorsqu'il s'agit de simuler des conditions environnementales, il peut être nécessaire de « vieillir » plus longtemps le sol chargé (trois semaines à 20 °C pour les métaux notamment (21)).

### *Élevage des organismes d'essai*

27. Il est préférable de conserver les vers en élevage de laboratoire permanent. Des conseils sur les méthodes d'élevage en laboratoire concernant *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*, et les espèces enchytrées figurent à l'annexe 5 (voir aussi (47) (50) et (51)).

28. Il convient que les vers utilisés dans les essais ne présentent pas de maladies, anomalies ou parasites observables.

### **DÉROULEMENT DE L'ESSAI**

29. Les organismes d'essai sont exposés à la substance d'essai durant la phase d'absorption. La phase d'absorption dure 14 jours (enchytrées) ou 21 jours (vers de terre) sauf s'il est prouvé que l'état stationnaire a été atteint.

30. Pour la phase d'élimination, les vers sont transférés sur un sol dépourvu de la substance d'essai. Le premier échantillon est prélevé de 4 à 24 h après le début de la phase d'élimination. L'annexe 3 donne

des exemples de programme d'échantillonnage pour une phase d'absorption de 21 jours et une phase d'élimination de 21 jours.

### *Organismes d'essai*

31. Chez de nombreuses espèces d'oligochètes terrestres, le poids individuel est très faible (5 à 10 mg de poids humide par individu pour *Enchytraeus albidus* et moins pour *Enchytraeus crypticus* ou *Enchytraeus luxuriosus*); la pesée et l'analyse chimique peuvent nécessiter de réunir les vers des récipients de réplicats (tous les vers d'un récipient de réplikat sont utilisés afin d'obtenir un seul résultat pour les tissus analysés). Vingt enchytrées sont ajoutés à chaque réplikat, et au moins trois réplicats sont utilisés. Si la limite de détection analytique de la substance d'essai est élevée, il peut être nécessaire d'utiliser un plus grand nombre de vers. Pour les espèces d'essai de poids individuel supérieur (*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*), il est possible de recourir à des récipients de réplicats contenant un seul individu.

32. Il convient que les vers de terre utilisés lors d'un essai soient de poids similaire (*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* ont par exemple un poids individuel de 250 à 600 mg). Les enchytrées (*Enchytraeus albidus* notamment) mesurent environ 1 cm de long. Tous les vers utilisés pour un même essai proviennent de la même source et sont adultes (avec un clitellum) (annexe 5). Le poids et l'âge d'un animal pouvant influencer sur les valeurs de FBA (par exemple, du fait d'une teneur en lipides variable et/ou de la présence d'œufs), ces paramètres sont consignés avec précision, et pris en compte dans l'interprétation des résultats. De plus, des cocons sont susceptibles d'apparaître pendant la période d'exposition, ce qui a également des répercussions sur les valeurs de FBA. Il est recommandé de peser un sous-échantillon des vers avant l'essai afin d'estimer les poids humides et secs moyens.

33. Un rapport sol/vers élevé est utilisé afin de minimiser la baisse de la concentration de la substance d'essai dans le sol durant la phase d'absorption. Il est recommandé que ce rapport s'élève au minimum, pour *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei*, à 50 g de poids sec de sol par ver et, pour les enchytrées, à 10-20 g de poids sec de sol par récipient d'essai. La couche de sol contenu dans les récipients a une épaisseur de 2 à 3 cm (enchytrées) ou de 4 à 5 cm (vers de terre).

34. Les vers utilisés lors d'un essai sont extraits du milieu d'élevage (les enchytrées par exemple à l'aide de pinces de joaillier). Les animaux adultes sont transférés pour acclimatation sur un sol d'essai non traité, puis nourris (voir le paragraphe 36). Si les conditions d'essai diffèrent des conditions d'élevage, une phase d'acclimatation de 24 à 72 h devrait suffire à l'adaptation des vers aux conditions d'essai. Une fois acclimatés, les vers de terre sont transférés dans des récipients en verre (des boîtes de Petri par exemple) contenant une eau propre pour y être rincés, puis ils sont pesés avant d'être déposés sur le sol d'essai. Avant la pesée, tout excès d'eau est enlevé en tapotant délicatement les vers contre le bord du récipient ou en les séchant précautionneusement à l'aide d'une serviette en papier légèrement humidifiée.

35. Le comportement d'enfouissement des organismes d'essai est observé et consigné. Dans les essais menés avec des vers de terre, les animaux (témoins et traités) s'enfouissent dans le sol normalement en quelques heures; ceci est vérifié 24 h maximum après l'ajout des vers dans le récipient d'essai. Si ce n'est pas le cas (par exemple, plus de 10 % ne s'enfouissent pas pendant plus de la moitié de la phase d'absorption), soit les conditions d'essai ne sont pas appropriées, soit les organismes d'essai ne sont pas en bonne santé. Il conviendra alors d'arrêter l'essai et de le répéter. Les enchytrées vivant essentiellement dans les pores interstitiels du sol, il arrive souvent que leur tégument soit seulement partiellement en contact avec le substrat environnant. On suppose que l'exposition des enchytrées enfouies et non enfouies est équivalente, et le non-enfouissement des enchytrées n'exige pas nécessairement de répéter l'essai.

### *Alimentation*

36. L'alimentation des organismes d'essai est envisagée si le sol utilisé présente une faible teneur en carbone organique total. Avec un sol artificiel, il est recommandé d'alimenter les vers suivant une fréquence hebdomadaire (une fois par semaine) à raison de 7 mg de fumier séché par gramme de masse sèche du sol pour les vers de terre, et de 2 à 2.5 mg de flocons d'avoine moulue par gramme de masse sèche du sol pour les enchytrées (11). La première ration est mélangée au sol immédiatement avant l'ajout des organismes d'essai. Il convient d'employer, de préférence, le même type d'alimentation que pour l'élevage (annexe 5).

### *Régime d'éclairage et température*

37. Les essais sont menés suivant un cycle contrôlé de 16/8 heures de lumière/obscurité, avec une intensité lumineuse comprise de préférence entre 400 et 800 lx au niveau des récipients d'essai (3). La température est maintenue à  $20 \pm 2$  °C tout au long de l'essai.

### *Concentrations d'essai*

38. Une seule concentration est utilisée. Les cas où une ou plusieurs concentrations seraient requises font l'objet d'une justification. Si la toxicité ( $EC_x$ ) de la substance d'essai est voisine de la limite de détection analytique, on recommande l'utilisation d'une substance d'essai radiomarquée, de radioactivité spécifique élevée. Pour les métaux, la concentration devra être supérieure à la concentration de fond dans les tissus et le sol.

### *Réplicats*

39. Concernant les mesures de cinétique (phase d'absorption et d'élimination), le nombre minimum de récipients de réplicats traités devra être de trois par point d'échantillonnage. Le nombre total de réplicats préparés suffira à couvrir tous les temps de prélèvement prévus au cours des phases d'absorption et d'élimination.

40. Pour les observations et les mesures biologiques (rapport poids sec/poids humide, teneur en lipides) et pour l'analyse des concentrations de fond dans les vers et le sol, au moins 12 récipients de réplicats d'un témoin négatif (quatre échantillons prélevés au démarrage, quatre à la fin de la phase d'absorption et quatre à la fin de la phase d'élimination) sont fournis, si aucun solvant autre que l'eau n'a été utilisé. Si un agent de solubilisation est utilisé pour l'application de la substance d'essai, il convient de prévoir, en plus des réplicats traités, des témoins solvant (quatre récipients de réplicats devront faire l'objet d'un prélèvement au démarrage, quatre à la fin de la phase d'absorption et quatre à la fin de la phase d'élimination) contenant tous les constituants, à l'exception de la substance d'essai. Dans ce cas, quatre récipients supplémentaires de réplicats d'un témoin négatif (sans solvant) pourront également être fournis pour procéder à un nouvel échantillonnage à la fin de la phase d'absorption. Ces réplicats pourront être comparés biologiquement avec le témoin solvant afin d'obtenir des informations sur une éventuelle influence du solvant sur les organismes d'essai. Il est recommandé de prévoir un nombre suffisant de récipients supplémentaires de réplicats de réserve (huit, par exemple) pour les vers traités et les vers témoins.

### *Fréquence des mesures de la qualité du sol*

41. Le pH et le taux d'humidité du sol sont mesurés au début et à la fin des phases d'absorption et d'élimination. La température de la chambre d'essai est relevée en continu. Il convient de contrôler l'humidité du sol une fois par semaine en pesant les récipients d'essai et en comparant leur poids au



moment des contrôles avec leur poids en début d'essai. Les pertes d'humidité sont compensées par l'ajout d'eau désionisée.

### Échantillonnage et analyse des vers et du sol

42. L'annexe 3 donne un exemple de programme d'échantillonnage pour les phases d'absorption et d'élimination des essais de bioaccumulation sur les vers de terre et les enchytrées.

43. Un échantillon du sol est prélevé dans les récipients d'essai pour déterminer la concentration de la substance d'essai avant l'introduction des vers, puis durant les phases d'absorption et d'élimination. Pendant l'essai, les concentrations de la substance d'essai sont déterminées dans les vers et dans le sol. En règle générale, on mesure les concentrations totales dans le sol. On peut également mesurer les concentrations dans l'eau interstitielle; dans ce cas, il convient de justifier ce choix et de décrire les méthodes appropriées prévues avant le début de l'étude, puis de consigner ces informations dans le rapport.

44. Les vers et le sol sont échantillonnés au moins à six reprises durant les phases d'absorption et d'élimination. Si la stabilité d'une substance d'essai est démontrée, le nombre d'analyses du sol peut être réduit. Il est recommandé d'analyser au moins trois réplicats au début et à la fin de la phase d'absorption. Si la concentration mesurée dans le sol à la fin de la phase d'absorption s'écarte de la concentration initiale de plus de 30%, les échantillons de sol prélevés à d'autres dates sont également analysés.

45. Enlever du sol les vers d'un réplikat donné à chaque temps de prélèvement (par exemple, après avoir étalé le sol du réplikat sur un plateau peu profond et prélevé les vers à l'aide d'une pince de joaillier), les rincer rapidement à l'eau dans un récipient peu profond en verre ou en acier. Enlever l'eau en excès (voir le paragraphe 34). Transférer délicatement les vers dans un récipient préalablement taré, et les peser immédiatement, en incluant le contenu de l'intestin.

46. Les vers de terre (*Eisenia sp.*) doivent pouvoir purger leur intestin pendant la nuit, par exemple sur un papier filtre humide dans une boîte de Petri fermée (voir paragraphe 34). Après la purge, il convient de déterminer le poids des vers afin d'évaluer la perte éventuelle de biomasse pendant l'essai (voir les critères de validité au paragraphe 17). La pesée et l'analyse des tissus des enchytrées sont effectuées sans purge, ceci étant techniquement difficile en raison de la petite taille de ces vers. Une fois le poids final déterminé, les vers sont tués immédiatement, en utilisant la méthode la plus appropriée (par exemple avec de l'azote liquide, ou en congelant les vers à une température inférieure à -18 °C).

47. Durant la phase d'élimination, les vers remplacent le contenu contaminé de leur intestin par des éléments du sol propre. Autrement dit, les mesures réalisées sur un échantillon de vers qui ne se sont pas purgés (les enchytrées en l'occurrence) immédiatement avant la phase d'élimination incluent le sol contaminé présent dans l'intestin. S'agissant des oligochètes aquatiques, on suppose qu'après les 4 à 24 h initiales de la phase d'élimination, l'essentiel du contenu intestinal contaminé a été remplacé par du sédiment propre (voir notamment (44)). Des observations similaires ont été rapportées pour les vers de terre lors d'études sur l'accumulation de cadmium et de zinc radiomarqués (78). Chez les enchytrées ne s'étant pas purgés, la concentration de ce premier échantillon de la phase d'élimination peut être considérée comme la concentration dans les tissus après la purge de l'intestin. Pour tenir compte de la dilution de la concentration de la substance d'essai par du sol 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.

48. Il est préférable d'analyser les échantillons de sol et de vers immédiatement après extraction (c'est-à-dire dans les 1 à 2 jours suivants) afin d'éviter des dégradations ou d'autres pertes, et il est recommandé de calculer les vitesses approximatives d'absorption et d'élimination pendant le déroulement

de l'essai. Si l'analyse est retardée, les échantillons devront être stockés suivant une méthode appropriée, par exemple, en procédant à leur congélation ( $\leq -18$  °C).

49. Il conviendra de vérifier que la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique, ainsi que la récupération de la substance d'essai dans les échantillons de sol et de vers sont satisfaisantes pour la méthode donnée; l'efficacité d'extraction, la limite de détection et la limite de quantification devront être consignées. De même, il faudra s'assurer que la substance d'essai n'est pas détectable dans les récipients témoins à des concentrations supérieures à la concentration de fond. Si la concentration de la substance d'essai dans l'organisme d'essai  $C_a$  est  $> 0$  pour les vers témoins, il faudra l'inclure au calcul des paramètres cinétiques (annexe 2). Pendant toute la durée de l'essai, tous les échantillons sont manipulés de façon à réduire au minimum les contaminations et les pertes (résultant, par exemple, de l'adsorption de la substance d'essai sur le dispositif d'échantillonnage).

50. En cas d'utilisation de substances radiomarquées, il est possible d'analyser le produit parent et les métabolites. Une quantification du composé parent et des métabolites à l'état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption fournit des informations importantes. Les échantillons sont alors nettoyés de façon à pouvoir quantifier séparément le composé parent. Si des métabolites simples excèdent 10 % de la radioactivité totale du ou des échantillons analysés, l'identification de ces métabolites est recommandée.

51. La récupération globale et la récupération de la substance d'essai dans les vers, le sol, et le cas échéant, dans les pièges contenant des absorbants permettant de retenir la substance d'essai évaporée, sont consignées et rapportées.

52. Le regroupement d'individus échantillonnés à partir d'un récipient d'essai donné est acceptable pour les enchytrées, plus petits que les vers de terre. Si ce regroupement implique de réduire le nombre de réplicats, cela restreint les procédures statistiques pouvant s'appliquer aux données. Si une procédure et une puissance statistiques spécifiques sont requises, alors l'essai comprend un nombre adéquat de récipients de réplicats, adapté aux quantités, à la procédure et à la puissance voulues.

53. Il est recommandé d'exprimer le FBA à la fois comme une fonction du poids sec total et, si nécessaire (à savoir pour des substances fortement hydrophobes), comme une fonction de la teneur en lipides. La teneur en lipides est déterminée par des méthodes appropriées (certaines méthodes existantes, voir par exemple (29) ou (58), ont besoin d'être adaptées à cette fin). Ces méthodes s'appuient sur une technique d'extraction au chloroforme/méthanol. Toutefois, afin d'éviter l'utilisation de solvants chlorés, il convient d'utiliser une version modifiée de la méthode de Bligh et Dyer (9) qui est décrite dans (16). Comme les diverses méthodes ne conduisent pas forcément à des valeurs identiques, il est important de détailler la méthode employée. Lorsque cela est possible, c'est-à-dire si on dispose de suffisamment de tissu de vers, la teneur en lipides est, idéalement, analysée à partir du même échantillon ou extrait que la substance d'essai, l'extrait devant souvent être débarrassé de ses lipides avant d'être analysé par chromatographie (48). Une autre possibilité consiste à mesurer la teneur en lipides sur des animaux témoins et à utiliser la valeur obtenue pour normaliser les valeurs de FBA. Cette dernière approche réduit la contamination de l'équipement par la substance d'essai.

## RÉSULTATS ET RAPPORT

### Traitement des résultats

54. On obtient la courbe d'absorption de la substance d'essai en portant la concentration de la substance d'essai dans/sur les vers durant la phase d'absorption en fonction du temps, en échelle arithmétique. Lorsque la courbe atteint un plateau ou état stationnaire (voir les définitions à l'annexe 1), le facteur de bioaccumulation à l'état stationnaire ( $FBA_{ss}$ ) est calculé à l'aide de la formule suivante:

$C_a$  à l'état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption (moyenne)

---

$C_s$  à l'état stationnaire ou à la fin de la phase d'absorption (moyenne)

où

$C_a$  représente la concentration de la substance d'essai dans l'organisme d'essai, et

$C_s$  la concentration de la substance d'essai dans le sol.

55. Si la courbe n'atteint pas de plateau, le  $FBA_k$ , fondé sur les constantes de vitesse, devra être déterminé à la place du  $BAF_{ss}$  comme suit :

- Déterminer le facteur d'accumulation ( $FBA_k$ ) comme le rapport de  $k_s/k_e$ .
- Les vitesses d'absorption et d'élimination sont calculées de préférence simultanément (voir l'équation 11 à l'annexe 2).
- La constante de vitesse d'élimination ( $k_e$ ) est généralement déterminée à partir de la courbe d'élimination (c'est-à-dire du 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 en fonction de  $k_e$  et d'une valeur de  $C_a$  qui est dérivée de la courbe d'absorption – voir la description de ces méthodes à l'annexe 2. La méthode préférée pour l'obtention du  $FBA_k$  et des constantes de vitesse,  $k_s$  et  $k_e$ , consiste à utiliser des méthodes informatisées non linéaires d'estimation des paramètres. Si la courbe d'élimination n'obéit manifestement pas à une cinétique du premier ordre, des modèles plus complexes devront alors être utilisés.

### Rapport d'essai

56. Le rapport d'essai comporte les informations suivantes:

#### Substance d'essai :

- toute information disponible sur la toxicité aiguë ou à long terme (par exemple  $CE_x$ ,  $CL_x$ , CSEO) de la substance d'essai vis-à-vis des oligochètes fousseurs;
- pureté, état physique et propriétés physico-chimiques, par exemple  $\log K_{ow}$ , solubilité dans l'eau;
- données d'identification de la substance; provenance de la substance d'essai, identité et concentration des solvants éventuellement utilisés;
- en cas d'utilisation d'une substance d'essai radiomarquée, position précise des atomes marqués, radioactivité spécifique et pureté radiochimique;

#### Espèces d'essai:

- nom scientifique, souche, source, traitement préalable éventuel, acclimatation, âge, taille, etc.;

#### Conditions d'essai:

- procédure d'essai utilisée;

- type et caractéristiques de l'éclairage utilisé et photopériode(s);
- protocole d'essai (par exemple, nombre et dimension des récipients d'essai, masse du sol et épaisseur de la couche de sol, nombre de réplicats, nombre de vers par réplicat, nombre de concentrations d'essai, durée des phases d'absorption et d'élimination, fréquence d'échantillonnage);
- justification du matériau choisi pour les récipients d'essai;
- méthode de préparation et d'application de la substance d'essai, ainsi que raisons du choix de la méthode;
- concentrations d'essai nominales, moyennes et écarts-types des valeurs mesurées dans les récipients d'essai, et méthode d'obtention de ces valeurs;
- source des constituants du sol artificiel ou – si un milieu naturel est utilisé – origine du sol, description d'un éventuel traitement préalable, résultats des contrôles (survie, augmentation de la biomasse, reproduction), caractéristiques du sol [pH, teneur totale en carbone organique, distribution granulométrique (pourcentage de sable, de limon et d'argile), capacité maximale de rétention d'eau ( $CRE_{max}$ ), teneur en eau au début et à la fin de l'essai, et toutes autres mesures réalisées];
- informations détaillées sur le traitement des échantillons de sol et de vers, y compris les détails concernant la préparation, le stockage, les procédures de chargement en substance d'essai, l'extraction et les procédures analytiques (et leur précision) pour la substance d'essai dans les vers et le sol, la teneur en lipides (si mesurée), et les méthodes de récupération de la substance d'essai.

#### Résultats:

- mortalité des vers témoins et des vers dans chaque récipient d'essai et éventuel comportement anormal observé (par exemple, évitement du sol, absence de reproduction lors d'un essai de bioaccumulation chez les enchytrées);
- rapport poids sec/poids humide du sol et des organismes d'essai (utiles pour la normalisation);
- poids humides des vers à chaque temps de prélèvement; pour les vers de terre, poids humides au début de l'essai, et à chaque temps de prélèvement avant et après la purge de l'intestin;
- teneur en lipides des organismes d'essai (si déterminée);
- courbes montrant les constantes cinétiques d'absorption et d'élimination de la substance d'essai chez les vers, et la durée pour atteindre l'état stationnaire;
- $C_a$  et  $C_s$  (avec écart-type et fourchette, si nécessaire) pour tous les temps de prélèvement ( $C_a$  exprimé en  $g.kg^{-1}$  de poids humide et sec du corps entier,  $C_s$  exprimé en  $g.kg^{-1}$  du poids humide et sec). Si un facteur d'accumulation biote-sol (BSAF, voir la définition à l'annexe 1) est nécessaire (par exemple, pour une comparaison des résultats entre deux essais ou plus réalisés avec des animaux de teneurs en lipides différentes),  $C_a$  est en plus être exprimé en  $g.kg^{-1}$  de teneur en lipides de l'organisme et  $C_s$  est exprimé en  $g.kg^{-1}$  de carbone organique (CO) du sol;

- FBA (exprimé en kg de sol  $\text{kg}^{-1}$  de ver), constante de vitesse d'absorption du sol  $k_s$  (exprimée en g de sol  $\text{kg}^{-1}$  de vers  $\text{j}^{-1}$ ), et constante de vitesse d'élimination  $k_e$  (exprimée en  $\text{j}^{-1}$ ); éventuellement, BSAF (exprimé en kg de CO du sol  $\text{kg}^{-1}$  de teneur en lipides des vers);
- le cas échéant: pourcentages de composé parent, de métabolites et de résidus liés (c'est-à-dire le pourcentage de substance d'essai ne pouvant être extraite par les méthodes d'extraction courantes) détectés dans le sol et 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'énoncés au paragraphe 17;
- résultats inattendus ou inhabituels, par exemple élimination incomplète de la substance d'essai des animaux d'essai.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) Amorim, M. (2000), Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane ( $\gamma$ -HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*, Mémoire de master, University Coimbra.
- (2) ASTM (2000), Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.
- (3) ASTM International (2004), Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*, ASTM International, E1676-04: 26 p.
- (4) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke et G. Studinger (2000), The assessment of bioaccumulation, In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (5) Belfroid, A., Meiling, J., Drenth, H., Hermens, J., Seinen, W., Van Gestel, C. (1995), Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*), Ecotox. Environ. Safety 31, 185-191.
- (6) Belfroid, A., Sikkenk, M., Seinen, W., Van Gestel, C. et Hermens (1994), The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil, Environ. Toxicol. Chem. 13, 93-99.
- (7) Belfroid, A., Van Wezel, A., Sikkenk, M., Van Gestel, C., Seinen, W. et Hermens, J. (1993), The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water, Ecotox. Environ. Safety 25, 154-165.
- (8) Bell, A.W. (1958), The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*, Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.
- (9) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.
- (10) Bouché, M. (1972), Lombriciens de France. Ecologie et Systématique, INRA, Annales de zoologie-écologie animale, Paris. 671 p.
- (11) Bruns, E., Egeler, Ph., Moser, T., Römbke, J., Scheffczyk, A. et Spörlein, P. (2001a), Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten, Rapport remis à l'Agence fédérale allemande de l'environnement (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.
- (12) Bruns, E., Egeler, Ph., Römbke, J. Scheffczyk, A. et Spörlein, P. (2001b), Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida), Hydrobiologia 463, 185-196.
- (13) CE (2006), Document d'orientation technique à l'appui du Règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH) (JO L 396, 30.12.2006).
- (14) Conder, J.M. et Lanno, R.P. (2003), Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*, J. Soils Sediments 3: 13-20.
- (15) Connell, D.W. et Markwell, R.D. (1990), Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System, Chemosphere 20, 91-100.
- (16) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. et 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.

- (17) Didden, W. (2003), Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors, Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (dir. pub.), Elsevier Science Ltd., Pays-Bas, p. 555-576.
- (18) Didden, W.A.M. (1993), Ecology of Terrestrial Enchytraeidae, *Pedobiologia* 37, 2-29.
- (19) Dietrich, D.R., Schmid, P., Zweifel, U., Schlatter, C., Jenni-Eiermann, S., Bachmann, H., Bühler, U. et Zbinden, N. (1995), Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29, 140-145.
- (20) Edwards, C.A. et Bohlen, P.J. (1996), Biology and ecology of earthworms, Troisième édition, Chapman & Hall, Londres. 426 p.
- (21) Egeler, Ph., Gilberg, D., Scheffczyk, A., Moser, Th. et Römbke, J. (2009), Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten), Rapport remis à l'Agence fédérale allemande de l'environnement (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No. : 204 67 458: 149 p. Téléchargeable à l'adresse: <http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf>.
- (22) Elmegaard, N. et Jagers op Akkerhuis, G.A.J.M. (2000), Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations, National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 p.
- (23) 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.
- (24) Franke, C. (1996), How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* 32, 1897-1905.
- (25) 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.
- (26) Füll, C. (1996), Bioakkumulation und Metabolismus von  $\gamma$ -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae), Thèse, Université de Mayence, 156 p.
- (27) Füll, C., Schulte, C. et Kula, C. (2003), Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer, *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* 15: 78-84.
- (28) Gabric, A.J., Connell, D.W. et Bell, P.R.F. (1990), A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes, *Wat. Res.* 24, 1225-1231.
- (29) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. et Parrish, C.C. (1985), Micromethods for lipids in aquatic invertebrates, *Limnology and Oceanography* 30, 1099-1105.
- (30) Hawker, D.W. et Connell, D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish, *Wat. Res.* 22, 701-707.
- (31) Hund-Rinke, K., Römbke, J., Riepert, F. et Achazi R. (2000), Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests, In: *Toxikologische Beurteilung von Böden*, Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (éd.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.
- (32) Hund-Rinke, K. et H. Wiechering (2000), Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests, *J. Soils Sediments* 1, 15-20.
- (33) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1998), Qualité du sol -- Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*), Partie 2 : Détermination des effets sur la reproduction, n° 11268-2. ISO, Genève.
- (34) Jaenike, J. (1982), "*Eisenia foetida*" is two biological species, *Megadrilogica* 4, 6-8.
- (35) Jager, T. (1998), Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta), *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 2080-2090.

- (36) Jager, T., Baerselman, R., Dijkman, E., De Groot, A. C., Hogendoorn, E. A., DeJong, A., Kruitbosch, J. A. W. et Peijnenburg, W. J. G. M (2003a), Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures, *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 767-775.
- (37) Jager, T., Fleuren R.L.J., Hoogendoorn, E. et de Korte, G. (2003b), Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta), *Environ. Sci. Technol.* 37, 3399-3404.
- (38) Jager, T., Sanchez, P.A., Muijs, B., van der Welde, E. et Posthuma, L. (2000), Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil, *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 953-961.
- (39) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries et Van Straalen, N.M. (1991), Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (40) Kasprzak, K. (1982), Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23, 217-232.
- (41) Khalil, A.M. (1990), Aufnahme und Metabolismus von <sup>14</sup>C-Hexachlorbenzol und <sup>14</sup>C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern, Thèse, Université de Munich, 137 p.
- (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) Marinussen, M.P.J.C., Van der Zee, S.E.A.T.M. et De Haan, F.A. (1997), Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions, *Ecotox. Environ. Safety* 36, 17-26.
- (44) Mount, D.R., Dawson, T.D. et 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.
- (45) Nendza, M. (1991), QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K<sub>ow</sub>/log BCF correlations. In: R. Nagel et R. Loskill (éd.) : Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Actes d'un atelier international, Berlin 1990, VCH, Weinheim.
- (46) OCDE (2007), Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fouisseurs, Projet de Ligne directrice, 21 décembre 2007, document de travail interne, Direction de l'environnement, OCDE, Paris.
- (47) OCDE (1984), *Ver de terre, essai de toxicité aiguë*, Ligne directrice No. 207, Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- (48) OCDE (1996), *Bioconcentration : Essai dynamique chez le poisson*, Ligne directrice No. 305, Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- (49) OCDE (2000), *Micro-organismes du sol : essai de transformation de l'azote*, Ligne directrice No. 216, Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- (50) OCDE (2004a), *Essai de reproduction chez l'enchytrée*, Ligne directrice No. 220, Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- (51) OCDE (2004b), *Essai de reproduction chez le lombric (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*, Ligne directrice No. 222, Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- (52) OCDE (2008), *Bioaccumulation chez les oligochètes benthiques fouisseurs*, Lignes directrice No. 315, Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- (53) OEPP (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes) (2003), Système pour l'évaluation du risque des produits phytosanitaires pour l'environnement, Soil organisms and functions, Normes OEPP, Bull, OEPP/EPPO 33 : 195-208.
- (54) Petersen, H. et Luxton, M. (1982), A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes, *Oikos* 39, 287-388.



- (55) Pflugmacher, J. (1992), Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffizienten UWSF- Z. Umweltchem, Ökotox. 4, 77-81.
- (56) Phillips, D.J.H. (1993), Bioaccumulation, In: Handbook of Ecotoxicology, Vol. 1. Calow, P. (éd.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.
- (57) Posthuma, L., Weltje, L. et Anton-sanchez, F.A. (1996), Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*, RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.
- (58) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. et Pruell, R.J. (1991), Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation, Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431-1436.
- (59) Römbke, J. et Moser, Th. (1999), Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test, UBA-Texte 4/99, 373 p.
- (60) Römbke, J., Egeler, P. et Füll, C. (1998), Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium, UBA-Texte 28/98, 84 S.
- (61) Römbke, J., Riepert, F. et Achazi R. (2000), Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. et Eisentraeger, A. (éd.), Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.
- (62) Romijn, C.A.F.M., Luttik, R., Van De Meent, D., Slooff, W. et Canton, J.H. (1993), Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains, Ecotox. Envir. Safety 27, 107-127.
- (63) Sample, B.E., Suter, D.W., Beauchamp, J.J. et Efroymsen, R.A. (1999), Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation, Environ. Toxicol. Chem. 18, 2110-2120.
- (64) Schlosser H-J. et Riepert F. (1992), Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34, 413-433.
- (65) Schmelz, R. et Collado, R. (1999), *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida), Carolinae 57: 93-100.
- (66) Sims, R. W. et Gerard, B. M. (1985), Earthworms. In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. Londres : E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.
- (67) Sousa J.P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A.J.A. et Soares A.M.V.M. (2000), Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod, Environ. Toxicol. Chem. 19, 2557-2563.
- (68) Spacie, A. et Hamelink, J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish, Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.
- (69) Stephenson, G.L., Kaushik, A., Kaushik, N.K., Solomon, K.R., Steele, T. et Scroggins, R.P. (1998), Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms, In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (éd.). Setac Press, Pensacola, 67-81.
- (70) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. et 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.
- (71) UBA (Umweltbundesamt) (1991), Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug, UBA-Texte 42/91. Berlin.
- (72) US EPA (2000), Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

- (73) Van Brummelen, T.C. et 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.
- (74) Van Gestel C.A.M. (1992), The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In : Ecotoxicology of Earthworms (éd. : Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW et Heimbach, F), Intercept Press, Andover (RU).
- (75) Van Gestel, C.A. et Ma, W.-C. (1990), An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies, Chemosphere 21, 1023-1033.
- (76) Van Straalen, N.M., M.H. Donker, M.G. Vijver et C.A.M. van Gestel (2005), Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates, Environmental Pollution, 136, 409-417.
- (77) Venter, J.M. et Reinecke, A.J. (1988), The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta), South African J. Zool. 23, 161-165.
- (78) Vijver, M.G., Vink, J.P.M., Jager, T., Wolterbeek, H.T., van Straalen, N.M. et van Gestel, C.A.M. (2005), Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil, Soil Biol. Biochem. 37: 1843-1851.
- (79) Widianarko B. et Van Straalen NM. (1996), Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15, 402-406.

## ANNEXE 1

## DÉFINITIONS ET UNITÉS

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).

La bioconcentration est l'augmentation de concentration de la substance d'essai dans ou sur un organisme, résultant de l'absorption de la substance exclusivement depuis le milieu environnant (à savoir via la surface du corps et le sol ingéré), 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.

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.

Le facteur de bioaccumulation (FBA) à n'importe quel instant de la phase d'absorption de l'essai de bioaccumulation, est la concentration de la substance d'essai dans ou sur l'organisme d'essai ( $C_a$  en  $\text{g.kg}^{-1}$  de poids humide ou sec de ver) divisée par la concentration de la substance dans le milieu environnant ( $C_s$  en  $\text{g.kg}^{-1}$  de poids de sol humide ou sec). Le FBA est exprimé en  $\text{kg de sol kg}^{-1}$  de ver.

Le facteur de bioaccumulation à l'état stationnaire ( $\text{FBA}_{ss}$ ), qui est le FBA à l'état stationnaire, ne varie pas de façon significative pendant une longue période, la concentration de la substance d'essai dans le milieu environnant ( $C_s$  en  $\text{g kg}^{-1}$  de poids de sol sec) étant constante pendant cette période.

Les facteurs de bioaccumulation calculés directement à partir du rapport de la constante de vitesse d'absorption du sol divisée par la constante de vitesse d'élimination ( $k_s$  et  $k_e$ , voir ci-dessous), sont appelés facteurs de bioaccumulation cinétiques ( $\text{FBA}_k$ ).

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

Un plateau ou état stationnaire est défini comme l'équilibre entre les processus d'absorption et d'élimination survenant simultanément durant la phase d'exposition. L'état stationnaire est atteint, dans le

tracé du FBA 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 ne diffèrent pas de plus de 20 % les uns des autres 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 (48).

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

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.

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

La constante de vitesse d'absorption du sol ( $k_s$ ) 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 du sol.  $k_s$  est exprimé en g de sol  $kg^{-1}$  de  $ver\ j^{-1}$ .

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

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 l'élément d'essai vers un milieu dépourvu de cette substance.  $k_e$  est exprimé en  $j^{-1}$ .

## ANNEXE 2

## CALCUL DES PARAMÈTRES D'ABSORPTION ET D'ÉLIMINATION

Le principal effet observé d'un essai de bioaccumulation est le facteur de bioaccumulation, FBA. Il est possible de calculer le FBA en divisant la concentration dans l'organisme d'essai,  $C_a$ , par la concentration dans le sol,  $C_s$ , à l'état stationnaire. Si l'état stationnaire n'est pas atteint durant la phase d'absorption, le  $FBA_k$  est calculé à partir des constantes de vitesse et non du  $FBA_{ss}$ . Il convient d'indiquer si le FBA est basé, ou non, sur des concentrations à l'état stationnaire.

La procédure habituelle pour obtenir le facteur de bioaccumulation cinétique ( $FBA_k$ ), la constante de vitesse d'absorption du sol ( $k_s$ ) et la constante de vitesse d'élimination ( $k_e$ ) consiste à faire appel à des méthodes informatisées non linéaires d'estimation des paramètres, par exemple à partir des modèles décrits dans (68). D'après un ensemble de valeurs séquentielles de la concentration en fonction du temps et les équations de modèles

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} * C_s(1-e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[équation 1]}$$

ou

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} * C_s(e^{-k_e(t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad \text{[équation 2]}$$

où  $C_a$  = concentration de la substance dans les vers [ $g.kg^{-1}$  de poids humide ou sec]  
 $k_s$  = constante de vitesse d'absorption dans les tissus [ $g$  de sol  $kg^{-1}$  de ver  $j^{-1}$ ]  
 $C_s$  = concentration de la substance dans le sol [ $g.kg^{-1}$  de poids humide ou sec]  
 $k_e$  = constante de vitesse d'élimination [ $j^{-1}$ ]  
 $t_c$  = temps à la fin de la phase d'absorption,

ces programmes informatiques calculent les valeurs de  $FBA_k$ ,  $k_s$  et  $k_e$ .

Lorsque la concentration de fond dans les vers non exposés, par exemple au jour 0, diffère sensiblement de zéro (cela peut être le cas pour les métaux notamment), cette concentration ( $C_{a,0}$ ) est incluse dans ces équations comme suit :

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} * C_s(1-e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[équation 3]}$$

et

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} * C_s (e^{-k_e(t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{équation 4}]$$

Dans les cas où l'on observe une forte baisse de la concentration de la substance d'essai dans le sol durant la phase d'absorption, il est possible de recourir aux modèles suivants (par exemple, (67) et (79)):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \quad [\text{équation 5}]$$

où  $C_s$  = concentration de la substance dans le sol [g.kg<sup>-1</sup> de poids humide ou sec]  
 $k_0$  = constante de vitesse de dégradation dans le sol [d<sup>-1</sup>]  
 $C_0$  = concentration initiale de la substance dans le sol [g.kg<sup>-1</sup> de poids humide ou sec]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} * (e^{-k_0 t} - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{équation 6}]$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} * (e^{-k_0 t_c} - e^{-k_e t_c}) * e^{-k(t-t_c)} \quad t > t_c \quad [\text{équation 7}]$$

où  $C_a$  = concentration de la substance dans les vers [g.kg<sup>-1</sup> de poids humide ou sec]  
 $k_s$  = constante de vitesse d'absorption dans les tissus [g de sol kg<sup>-1</sup> de vers j<sup>-1</sup>]  
 $k_0$  = constante de vitesse de dégradation dans le sil [j<sup>-1</sup>]  
 $k_e$  = constante de vitesse d'élimination [j<sup>-1</sup>]  
 $t_c$  = temps à la fin de la phase d'absorption

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

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} * C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{équation 1}]$$

à :

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} * C_s$$

ou

$$C_a/C_s = k_s/k_e = FBA_K \quad [\text{équation 8}]$$

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

Le facteur d'accumulation biote-sol (BSAF) peut se calculer comme suit:

$$\text{BSAF} = \text{FBA}_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \quad [\text{équation 9}]$$

où  $f_{oc}$  est la fraction de carbone organique dans le sol, et  $f_{lip}$  est la fraction de lipides dans le ver, toutes deux étant déterminées, de préférence, sur des échantillons prélevés de l'essai, et basées respectivement soit sur le poids sec, soit sur le poids humide.

Il est possible de modéliser les constantes cinétiques d'élimination en utilisant les données issues de la phase d'élimination et en appliquant l'équation de modèle suivante et une méthode informatisée non linéaire d'estimation des paramètres. 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, le déroulement temporel de l'élimination peut être décrit par un modèle à un compartiment (équation 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} * e^{-k_e t} \quad [\text{équation 10}]$$

Les processus d'élimination semblent parfois se dérouler en deux étapes, montrant une décroissance rapide de  $C_a$  au cours des premières étapes, qui évolue vers une perte plus lente des éléments d'essai dans les étapes ultérieures de l'élimination (par exemple, (25) (68)). 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 la littérature pertinente (par exemple (36) (37) (38) (78)).

A l'aide des équations de modèles ci-dessus, on peut également calculer les paramètres cinétiques ( $k_s$  et  $k_e$ ) en une seule fois, en appliquant un modèle de cinétique du premier ordre à toutes les données des phases d'absorption et d'élimination simultanément. Pour une description d'une méthode pouvant permettre un tel calcul combiné des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, consulter (39), (70) et (73).

$$C_a = \left[ \frac{k_s}{k_e} * C_s (1 - e^{-k_e t}) * (m=1) \right] + \left[ \frac{k_s}{k_e} * C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) * (m=2) \right] \quad [\text{équation 11}]$$

Note : quand les paramètres d'absorption et d'élimination sont estimés simultanément à partir des données combinées d'absorption et d'élimination, « m » tel que mentionné dans l'équation 11 est un descripteur qui permet au programme informatique d'attribuer les sous-termes de l'équation aux ensembles de données de la phase correspondante et de faire une évaluation correcte (m = 1 pour la phase d'absorption ; m = 2 pour la phase d'élimination).

Quoi qu'il en soit, ces équations de modèles seront utilisées avec précaution, en particulier lorsque des modifications de la biodisponibilité de la substance d'essai, ou (bio)dégradation, surviennent durant l'essai (voir notamment (79)).

## ANNEXE 3

**EXEMPLES DE PROGRAMMES D'ÉCHANTILLONNAGE POUR DES ESSAIS DE  
BIOACCUMULATION DANS LE SOL**

**Essai sur des vers de terre**

a) Phase d'absorption avec 8 dates d'échantillonnage pour le calcul des paramètres cinétiques

<b>Jour</b>	<b>Activité</b>
-6	Conditionnement du sol préparé durant 48 h
-4	Chargement d'une fraction du sol avec la solution de la substance d'essai; évaporation de tout solvant; mélange des constituants du sol; répartition du sol dans les récipients d'essai; équilibration dans les conditions d'essai durant 4 jours (3 semaines pour les sols chargés en métaux)
-3 à -1	Séparation des organismes d'essai du milieu d'élevage pour acclimatation; préparation et humidification des constituants du sol
0	Mesure de la température et du pH du sol; retrait d'échantillons de sol des récipients traités et des témoins au solvant pour la détermination de la concentration de la substance d'essai; ajout d'une ration alimentaire; pesée et distribution aléatoire des vers dans les récipients d'essai; conservation d'un nombre suffisant de sous-échantillons de vers pour la détermination des valeurs de fond analytiques, des poids humide et sec, ainsi que de la teneur en lipides; pesée de tous les récipients d'essai pour le contrôle de l'humidité du sol; contrôle de l'alimentation en air, en cas de système en circuit fermé
1	Contrôle de l'alimentation en air, consignation du comportement des vers et de la température; prélèvement d'échantillons de sol et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai
2	Comme le 1 <sup>er</sup> jour
3	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température
4	Comme le 1 <sup>er</sup> jour
5 - 6	Comme le 3 <sup>e</sup> jour
7	Comme le 1 <sup>er</sup> jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée;
8 - 9	Comme le 3 <sup>e</sup> jour
10	Comme le 1 <sup>er</sup> jour
11 - 13	Comme le 3 <sup>e</sup> jour
14	Comme le 1 <sup>er</sup> jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée;
15 - 16	Comme le 3 <sup>e</sup> jour
17	Comme le 1 <sup>er</sup> jour
18 - 20	Comme le 3 <sup>e</sup> jour



21 Comme le 1<sup>er</sup> jour; mesure de la température et du pH du sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai; fin de la phase d'absorption; transfert des vers des réplicats exposés restants vers des récipients contenant du sol propre pour la phase d'élimination (sans purge de l'intestin); échantillonnage du sol et des vers des témoins au solvant.

---

Les activités préalables à l'exposition (phase d'équilibration) sont programmées en tenant compte des propriétés de la substance d'essai.

Les activités décrites pour le 3<sup>e</sup> jour sont réalisées quotidiennement (au moins les jours ouvrés).

---

## b) Phase d'élimination

Jour	Activité
-6	Préparation et humidification des constituants du sol; conditionnement du sol préparé durant 48 h
-4	Mélange des constituants du sol; répartition du sol dans les récipients d'essai; incubation dans les conditions d'essai durant 4 jours
0 (fin de la phase d'absorption)	Mesure de la température et du pH du sol; pesée et distribution aléatoire des vers dans les récipients d'essai; ajout d'une ration alimentaire; transfert des vers des réplicats exposés restants vers des récipients contenant du sol propre; prélèvement d'échantillons de sol et de vers après 4 à 6 h pour la détermination de la concentration de la substance d'essai
1	Contrôle de l'alimentation en air, consignation du comportement des vers et de la température ; prélèvement d'échantillons de sol et de vers pour la détermination de la concentration de la substance d'essai
2	Comme le 1 <sup>er</sup> jour
3	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température
4	Comme le 1 <sup>er</sup> jour
5 - 6	Comme le 3 <sup>e</sup> jour
7	Comme le 1 <sup>er</sup> jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée;
8 - 9	Comme le 3 <sup>e</sup> jour
10	Comme le 1 <sup>er</sup> jour
11 - 13	Comme le 3 <sup>e</sup> jour
14	Comme le 1 <sup>er</sup> jour; ajout d'une ration alimentaire; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée;
15 - 16	Comme le 3 <sup>e</sup> jour
17	Comme le 1 <sup>er</sup> jour
18 - 20	Comme le 3 <sup>e</sup> jour
21	Comme le 1 <sup>er</sup> jour; mesure de la température et du pH du sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai; échantillonnage du sol et des vers des témoins au solvant.

La préparation du sol avant le début de la phase d'élimination intervient de la même manière qu'avant la phase d'absorption.

Les activités décrites pour le 3<sup>e</sup> jour sont réalisées quotidiennement (au moins les jours ouvrés).

**Essai sur des enchytrées**

a) Phase d'absorption avec 8 dates d'échantillonnage pour le calcul des paramètres cinétiques

<b>Jour</b>	<b>Activité</b>
-6	Conditionnement du sol préparé durant 48 h
-4	Chargement d'une fraction du sol avec la solution de la substance d'essai; évaporation de tout solvant; mélange des constituants du sol; répartition du sol dans les récipients d'essai; équilibration dans les conditions d'essai durant 4 jours (3 semaines pour les sols chargés en métaux)
-3 à -1	Séparation des organismes d'essai du milieu d'élevage pour acclimatation; préparation et humidification des constituants du sol
0	Mesure de la température et du pH du sol; retrait d'échantillons de sol des récipients traités et des témoins au solvant pour la détermination de la concentration de la substance d'essai; ajout d'une ration alimentaire dans le sol; pesée et distribution aléatoire des vers dans les récipients d'essai; conservation de suffisamment de sous-échantillons de vers pour la détermination des valeurs de fond analytiques, du poids sec et humide et de la teneur en lipides; pesée de tous les récipients d'essai pour le contrôle de l'humidité du sol; contrôle de l'alimentation en air, en cas de système en circuit fermé
1	Contrôle de l'alimentation en air, consignation du comportement des vers et de la température; <u>prélèvement d'échantillons de sol et de vers</u> pour la détermination de la concentration de la substance d'essai
2	Comme le 1 <sup>er</sup> jour
3	Contrôle de l'alimentation en air, du comportement des vers et de la température
4	Comme le 1 <sup>er</sup> jour
5 - 6	Comme le 3 <sup>e</sup> jour
7	Comme le 1 <sup>er</sup> jour; ajout d'une ration alimentaire dans le sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai et en compensant l'eau évaporée
9	Comme le 1 <sup>er</sup> jour
10	Comme le 3 <sup>e</sup> jour
11	Comme le 1 <sup>er</sup> jour
12 - 13	Comme le 3 <sup>e</sup> jour
14	Comme le 1 <sup>er</sup> jour; ajout d'une ration alimentaire dans le sol; mesure de la température et du pH du sol; contrôle de l'humidité du sol en pesant de nouveau les récipients d'essai; fin de la phase d'absorption; transfert des vers des réplicats exposés restants vers des récipients contenant du sol propre pour la phase d'élimination (sans purge de l'intestin); échantillonnage du sol et des vers des témoins au solvant.
<p>Les activités préalables à l'exposition (phase d'équilibration) sont programmées en tenant compte des propriétés de la substance d'essai.</p> <p>Les activités décrites pour le 3<sup>e</sup> jour sont réalisées quotidiennement (au moins les jours ouvrés).</p>	

## ANNEXE 4

**SOL ARTIFICIEL: RECOMMANDATIONS POUR LA PRÉPARATION ET LE STOCKAGE**

Les sols naturels provenant d'une source particulière ne sont pas toujours disponibles tout au long de l'année, et des organismes indigènes ainsi que la présence de micropolluants peuvent influencer sur l'essai; il est donc recommandé d'utiliser un substrat artificiel, le sol artificiel décrit par la Ligne directrice n° 207 de l'OCDE (47). Plusieurs espèces d'essai peuvent survivre, se développer et se reproduire dans ce sol, et une normalisation maximum doublée d'une comparabilité intra- et interlaboratoire des conditions d'essai et d'élevage est proposée.

**Constituants**

Tourbe	10 %	Tourbe de sphaigne, conformément à la Ligne directrice n° 207 de l'OCDE (47)
Sable de quartz	70 %	Sable quartzique industriel (séché à l'air); taille des grains: plus de 50 % des particules seront dans une fourchette comprise entre 50 et 200 µm, mais toutes seront ≤ 2 mm
Argile kaolinique	20 %	Teneur en kaolinite ≥ 30 %
Carbonate de calcium	≤ 1 %	CaCO <sub>3</sub> , pulvérisé, chimiquement pur

Il est également possible de réduire la teneur en carbone organique du sol artificiel, notamment en abaissant la teneur en tourbe à 4-5 % de sol sec et en augmentant la teneur en sable en conséquence. Cette réduction de la teneur en carbone organique est susceptible de diminuer les possibilités d'adsorption de la substance d'essai sur le sol (carbone organique) et d'augmenter la disponibilité de la substance d'essai pour les vers (74). Il a été démontré qu'*Enchytraeus albidus* et *Eisenia fetida* peuvent satisfaire aux critères de validité concernant la reproduction lorsqu'ils sont testés sur des sols naturels dont la teneur en carbone organique est inférieure (2.7 %, par exemple) (31) et (61), et on a constaté expérimentalement qu'il pouvait en aller de même sur un sol artificiel renfermant 5 % de tourbe.

**Préparation**

Les constituants secs du sol sont soigneusement mélangés (par exemple, dans un grand mélangeur de laboratoire). Ce mélange est réalisé environ une semaine avant le début de l'essai. Le mélange sec de constituants du sol est humidifié avec de l'eau désionisée au moins 48 h avant l'application de la substance d'essai de manière à équilibrer/stabiliser l'acidité. Pour déterminer le pH, on utilisera un mélange de sol et d'une solution de 1 M KCl suivant un rapport de 1:5. Si le pH ne se trouve pas dans la plage requise (6.0 ± 0.5), soit on ajoute au sol une quantité suffisante de CaCO<sub>3</sub>, soit on prépare un nouveau lot de sol.

La capacité maximale de rétention d'eau (CRE) du sol artificiel est déterminée conformément à la norme ISO 11268-2 (33). Au moins deux jours avant de démarrer l'essai, on humidifie le sol artificiel sec

en ajoutant suffisamment d'eau désionisée ou reconstituée pour obtenir approximativement la moitié de la teneur finale en eau. Cette teneur finale en eau devrait représenter 40 % à 60 % de la CRE maximale. Au début de l'essai, on divise le sol préalablement humidifié en lots d'un nombre égal à celui des concentrations d'essai et des témoins utilisés pour l'essai, et, en employant la solution de la substance d'essai et/ou en ajoutant de l'eau désionisée ou reconstituée, on ajuste le taux d'humidité pour qu'il se trouve entre 40 et 60 % de la CRE<sub>max</sub>. Le taux d'humidité est déterminé au début et à la fin de l'essai (à 105 °C). Il sera optimal pour satisfaire les exigences des espèces (le taux d'humidité peut aussi être contrôlé comme suit: le sol légèrement pressé dans la main doit laisser apparaître de petites gouttes d'eau entre les doigts).

### **Stockage**

Les constituants secs du sol artificiel peuvent être stockés à température ambiante jusqu'à leur utilisation. Le sol préparé, pré-humidifié peut être stocké dans un endroit frais pendant maximum trois jours avant d'être chargé; il convient de veiller à minimiser l'évaporation de l'eau. Un sol chargé avec la substance d'essai sera utilisé immédiatement, sauf si des informations spécifient qu'il est possible de stocker ce sol sans affecter la toxicité et la biodisponibilité de la substance d'essai. Des échantillons de sol chargé peuvent alors être stockés dans les conditions recommandées pour la substance d'essai donnée jusqu'à l'analyse.

## ANNEXE 5

**ESPÈCES D'OLIGOCHÈTES TERRESTRES RECOMMANDÉES POUR LES ESSAIS DE BIOACCUMULATION DANS LE SOL****Vers de terre**

L'espèce d'essai recommandée est *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), qui appartient à la famille des *Lumbricidae*. Depuis 1972, on la divise en deux sous-espèces (*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* (10)). Selon Jaenike (34), il s'agit là de deux espèces à part entière. *Eisenia fetida* est facilement reconnaissable à ses larges bandes jaunes entre les segments alors qu'*Eisenia andrei* présente une couleur rouge foncé uniforme. Probablement originaires de la région de la mer Noire, elles sont aujourd'hui présentes partout dans le monde, surtout dans les habitats modifiés par les activités anthropiques comme les tas de compost. Toutes deux se prêtent à la réalisation d'essais écotoxicologiques et d'essais de bioaccumulation.

*Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* sont disponibles dans le commerce, notamment comme appât pour la pêche. Par rapport à d'autres vers de terre de la même famille, ces deux espèces ont un cycle de vie court et atteignent leur maturité en 2 à 3 mois (à température ambiante). Leur température optimale oscille entre 20 et 24 °C. Elles préfèrent les substrats relativement humides, d'un pH presque neutre et à forte teneur en matière organique. Ces espèces étant largement utilisées dans les essais écotoxicologiques normalisés depuis environ 25 ans, leur élevage est bien établi (47) (77).

Ces deux espèces peuvent être élevées dans des déjections animales très diverses. Le milieu d'élevage recommandé par l'ISO (33) est un mélange 50/50 de crottin de cheval ou de bouse de vache et de tourbe. Le milieu aura un pH d'environ 6 à 7 (ajusté avec du carbonate de calcium), une faible conductivité ionique (une concentration de sels inférieure à 0.5 % ou à 6 mS/cm) et ne sera pas trop contaminé par de l'ammoniac ou des urines animales. Il est également possible d'utiliser de la terre de jardin, vendue dans le commerce, qui soit sans additifs, un sol artificiel tel que défini par l'OCDE (47), ou encore un mélange des deux, à parts égales (50/50). Le substrat sera humide, mais pas mouillé. Des boîtes d'élevage d'une capacité de 10 à 50 litres conviennent.

Pour obtenir une population de vers homogène quant à l'âge et à la masse, il vaut mieux commencer l'élevage avec des cocons. À cet effet, des vers adultes sont ajoutés à une boîte d'élevage qui contient du substrat frais pour produire des cocons. L'expérience a montré qu'une densité démographique d'environ 100 vers adultes par kg de substrat (poids humide) donne de bons taux de reproduction. Après 28 jours, les vers adultes sont retirés. Les vers de terre éclos sont utilisés pour les essais une fois adultes, soit 2 mois plus tard au moins mais pas au-delà de 12 mois.

Les vers des espèces décrites précédemment peuvent être considérés comme sains s'ils se déplacent dans le substrat, ne tentent pas de s'en échapper et se reproduisent continuellement. Une extrémité postérieure qui bouge très lentement ou qui est jaune (s'agissant d'*E. fetida*) indique un épuisement du

substrat. Il est alors recommandé d'utiliser du substrat frais et/ou de réduire le nombre d'animaux par boîte.

#### Quelques références complémentaires

- Gerard, B.M. (1964), Synopsis of the British fauna, No. 6 Lumbricidae, Linnean Soc. Londres, 6, 1-58.  
Graff, O. (1953), Die Regenwürmer Deutschlands, Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch., 7: 1-81.  
Römbke, J., Egeler, P. et Füll, C. (1997), Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium, Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.  
Rundgren, S. (1977), Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden, Oikos, 28, 49-55.  
Satchell, J.E. (1955), Some aspects of earthworm ecology, Soil Zoology (Kevan): 180-201.  
Sims, R.W., Gerard, B.M. (1985), A synopsis of the earthworms, Linnean Soc. Londres, 31, 1-171.  
Tomlin, A.D. (1984), The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture, Satchell, J.E. (éd. Chapman & Hall, Londres. 331-338 p.

#### **Enchytrées**

L'espèce d'essai recommandée est *Enchytraeus albidus*, Henle 1837 (ver blanc). *Enchytraeus albidus* est l'une des plus grosses espèces (jusqu'à 15 mm) de la famille des annélides oligochètes (*Enchytraeidae*) et c'est la plus répandue dans le monde (8). *Enchytraeus albidus* colonise des habitats marins, dulcicoles et terrestres, constitués la plupart du temps de matière organique en décomposition (algues, compost), et fréquente rarement les prairies (40). Le fait qu'il tolère une gamme étendue de conditions écologiques et certaines variations morphologiques indiquent qu'il pourrait exister différentes races.

*Enchytraeus albidus* est disponible dans le commerce, plus particulièrement sous forme de nourriture pour les poissons. Il convient de vérifier si l'élevage est contaminé par d'autres espèces, généralement plus petites (59). Dans l'affirmative, tous les vers sont lavés à l'eau dans une boîte de Petri. De grands spécimens adultes d'*Enchytraeus albidus* sont ensuite sélectionnés (à l'aide d'un stéréomicroscope) pour commencer un nouvel élevage. Tous les autres vers sont éliminés. Le cycle de vie de ces vers est court puisqu'ils arrivent à maturité entre 33 jours (à 18 °C) et 74 jours (à 12 °C). Seuls les vers ayant été conservés en laboratoire pendant au moins 5 semaines (une génération) sans problème devront être utilisés pour des essais.

D'autres espèces du genre *Enchytraeus* conviennent également, notamment *Enchytraeus luxuriosus*. L'univers de vie de cette espèce est le sol, comme récemment décrit dans (65). Si on utilise d'autres espèces d'*Enchytraeus*, il faut les identifier clairement et justifier ce choix dans le rapport.

L'espèce *Enchytraeus crypticus* (Westheide et Graefe, 1992) appartient au même groupe qu'*E. luxuriosus*. L'existence d'*Enchytraeus crypticus* dans la nature n'est pas certaine, cette espèce n'ayant été décrite que dans les élevages de lombrics et les tas de compost (Römbke, 2003). Par conséquent, on ne connaît pas ses besoins écologiques d'origine. Cependant, des études récemment menées en laboratoire avec différents sols naturels ont confirmé la grande tolérance de cette espèce vis-à-vis de propriétés du sol telles que le pH et la texture (Jänsch *et al.*, 2005). Ces dernières années, cette espèce a souvent été utilisée dans des études écotoxicologiques en raison de sa facilité d'élevage et de mise à l'essai (Kuperman *et al.*, 2003). Néanmoins, elle est petite (3 – 12 mm ; 7 mm en moyenne) (Westheide et Müller, 1996), ce qui la rend plus difficile à manipuler qu'*Enchytraeus albidus*. Si on utilise cette espèce et non *Enchytraeus albidus*, les récipients d'essai peuvent être de plus petite taille, mais cela n'est pas nécessaire. En outre, il convient de considérer que cette espèce se reproduit très rapidement, son temps de génération étant inférieur à 20 jours à 20 ± 2 °C (Achazi *et al.*, 1999), voire encore plus court à des températures supérieures.

Les *Enchytraeidae* de l'espèce *Enchytraeus albidus* (comme d'autres espèces d'enchytrées) peuvent être élevés dans de grandes boîtes en plastique (par exemple: 30 x 60 x 10 cm ou 20 x 12 x 8 cm, ce qui convient à la culture de vers de petite taille) remplies d'un mélange de sol artificiel et d'une terre de jardin, vendue dans le commerce, non contaminée et sans additifs. L'emploi de compost, qui risque de contenir des substances toxiques, telles que des métaux lourds, est à éviter. La faune est retirée du sol d'élevage avant usage par triple congélation. Un sol entièrement artificiel est également envisageable, mais le taux de reproduction pourrait être moindre par rapport à celui obtenu avec des substrats mixtes. Il convient que le substrat présente un pH de  $6.0 \pm 0.5$ . Les vers sont conservés dans un incubateur à une température de  $15 \pm 2$  °C sans lumière. Dans tous les cas, il convient d'éviter une température supérieure à 23 °C. Ce sol artificiel/naturel sera humide, mais pas mouillé. Légèrement pressé dans la main, il laissera apparaître de petites gouttes d'eau. Dans tous les cas, on évite de créer des conditions anoxiques (si on utilise un couvercle, ce dernier devra comporter un nombre de trous suffisamment élevé pour assurer un échange d'air approprié). Il convient d'aérer le sol d'élevage en le remuant délicatement une fois par semaine.

Les vers sont nourris au moins une fois par semaine *ad libitum* avec des flocons d'avoine placés dans une cavité à la surface du sol et recouverte de sol. Si de la nourriture reste de la fois précédente, il convient d'ajuster la ration alimentaire à ajouter. Si la nourriture restante est infestée de champignons, elle est remplacée par une nouvelle ration de flocons d'avoine. Pour favoriser la reproduction, les flocons d'avoine peuvent être remplacés toutes les deux semaines par une poudre protéique du commerce, enrichie en vitamines. Après trois mois, les animaux sont transférés vers un substrat d'élevage fraîchement préparé. Les flocons d'avoine, qui sont conservés dans des récipients hermétiquement fermés, sont passés à l'autoclave ou chauffés avant l'emploi afin de prévenir toute infection par des acariens de stockage (*Glycyphagus sp.*, Astigmata, Acarina, par exemple) ou des acariens prédateurs (*Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina, par exemple). Une fois désinfectée, la nourriture est moulue de façon à pouvoir être facilement parsemée à la surface du sol. Il est également possible de nourrir les vers avec de la levure de boulanger ou de la nourriture pour poissons TetraMin®.

En règle générale, les conditions d'élevage sont satisfaisantes si les vers ne tentent pas de quitter le substrat, se déplacent rapidement dans le sol, présentent une surface brillante sur laquelle les particules de sol n'adhèrent pas, ont une couleur plus ou moins blanchâtre, et représentent diverses tranches d'âge. On peut considérer que les vers sont sains s'ils se reproduisent continuellement.

#### Quelques références

- Achazi, R.K., Fröhlich, E., Henneken, M. et Pilz, C. (1999), The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta), Newsletter on Enchytraeidae 6, 117-126.
- Jansch, S., Amorim, M.J.B. et Römbke, J. (2005), Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species, Environ. Reviews 13, 51-83.
- Kuperman, R.G., Checkai, R.T., Simini, M., Phillips, C.T., Kolakowski, J.E., Kurnas, C.W. et Sunahara, G.I. (2003), Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX, Pedobiologia 47, 651-656.
- Römbke, J. (2003), Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review, Pedobiologia 47, 607-616.
- Westheide, W. et Graefe, U. (1992), Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida), J. Nat. Hist. 26, 479-488.
- Westheide, W. et Müller, M.C. (1996), Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology, Hydrobiologia 334, 263-267.