



**Section 2**  
**Effets sur les systèmes biologiques**

**Essai n° 219:**  
Essai de toxicité sur les chironomes dans  
un système eau chargée-sédiment

4 juillet 2023

**Lignes directrices de l'OCDE pour  
les essais de produits chimiques**



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

### Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau chargée-sédiment

#### INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice est conçue pour évaluer les effets d'une exposition prolongée à des substances chimiques sur des larves de *Chironomus* sp., un diptère vivant dans les sédiments d'eau douce. Elle s'inspire principalement de la ligne directrice du BBA, dans laquelle l'exposition s'effectue à l'aide d'un système expérimental sédiment-eau, composé de sol artificiel et d'une colonne d'eau (1). Elle tient compte également des protocoles d'essais de toxicité sur *Chironomus riparius* et *Chironomus dilutus*, mis au point en Europe et en Amérique du Nord (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) et soumis (précédemment connue comme C. tentans) à des essais circulaires (1)(6)(9). D'autres espèces de chironomes bien documentées peuvent aussi être employées, par exemple *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. Le mode d'exposition mis en place dans la présente Ligne directrice consiste à mélanger la substance d'essai à l'eau. La sélection du scénario d'exposition dépend de la finalité de l'essai. Le mode d'exposition qui consiste à charger la colonne d'eau, vise à simuler soit un test avec exposition constante, ou des pertes par dispersion lors de l'épandage de pesticides et couvre le pic de concentrations initial dans l'eau interstitielle. Il s'applique également à d'autres types d'exposition (notamment des fuites de produits chimiques), à l'exclusion des processus d'accumulation d'une durée supérieure à celle de l'essai.

3. En général, les substances à tester sur des organismes vivant dans les sédiments subsistent longtemps dans ce compartiment. Ces organismes peuvent être exposés par diverses voies (c.à.d. l'eau, les sédiments et l'alimentation). L'importance relative de chaque voie d'exposition et le temps pris par chacune d'entre elles pour contribuer à l'effet toxique global dépendent des propriétés physico-chimiques de chaque substance chimique. Dans le cas des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un  $\log K_{oc} > 5$ ) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, l'ingestion d'aliments contaminés peut constituer une voie d'exposition non négligeable. Afin de ne pas sous-estimer la toxicité des substances fortement lipophiles, on envisagera d'ajouter de la nourriture au sédiment avant l'application de la substance d'essai. La présente Ligne directrice est axée sur l'exposition à long terme, de façon à couvrir toutes les voies d'exposition potentielles. L'essai dure de 20 à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et de 28 à 65 jours pour *C. dilutus*. Si l'on a besoin de données à court terme pour un motif précis, par exemple pour étudier les effets d'une substance chimique instable, des expériences identiques, rajoutées au dispositif expérimental, peuvent être retirées après 10 jours d'essai.

4. Les effets observés sont basés sur les variables biologiques suivantes : le nombre de mâles émergés, le nombre de femelles émergées (donc aussi le nombre total d'adultes émergés) ainsi que le temps écoulé jusqu'à l'émergence. Si l'on a besoin de données à court terme, la survie et la croissance des larves peuvent être mesurées après 10 jours, en ajoutant le nombre nécessaire d'expériences identiques.
5. L'utilisation d'un sédiment reconstitué (aussi appelé sédiment formulé, artificiel ou synthétique) est recommandée en raison de ses avantages par rapport aux sédiments naturels :
- la variabilité expérimentale est réduite parce que le sédiment reconstitué forme une «matrice normalisée» reproductible ; en outre, il n'est plus nécessaire de trouver des sources de sédiments non contaminés et non pollués ;
  - les essais peuvent être effectués à n'importe quel moment de l'année, la variabilité saisonnière n'intervenant plus et il n'est pas nécessaire de traiter préalablement le sédiment afin d'éliminer la faune indigène ; l'utilisation de sédiments reconstitués diminue aussi le coût associé à la collecte sur le terrain d'une quantité suffisante de sédiments pour les essais systématiques ;
  - les sédiments reconstitués permettent de comparer la toxicité des substances et de les classer en conséquence.
6. L'Annexe 1 contient les définitions applicables à la présente Ligne directrice.

## PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des chironomes au premier stade larvaire sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dans un système sédiment-eau. L'essai débute par l'introduction de larves au premier stade dans les béciers expérimentaux contenant le système sédiment-eau et l'ajout de la substance d'essai à l'eau. L'émergence des chironomes et leur vitesse de développement sont mesurées à la fin de l'essai. La survie des larves et leur poids peuvent aussi être mesurés après 10 jours si nécessaire (en ajoutant le nombre d'expériences identiques requis). Ces données sont analysées, soit à l'aide d'un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x% de l'émergence ou de la survie des larves ou de leur croissance (par exemple CE15, CE50, etc.), soit par la vérification d'une hypothèse statistique afin de déterminer une CSEO/CME0. Cette dernière requiert une comparaison entre les valeurs efficaces et les valeurs des témoins à l'aide de tests statistiques. Selon les exigences du cadre réglementaire en question, la conception de l'essai peut être optimisée pour estimer une CEx sur un effet spécifique et/ou déterminer une CSEO/CME0 (voir la section CONCEPTION DE L'ESSAI).

## INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

8. Il faudrait connaître l'hydrosolubilité de la substance d'essai, sa pression de vapeur, ses coefficients de partage octanol-eau et dans le sédiment et sa stabilité dans l'eau et le sédiment. Il convient de disposer d'une méthode d'analyse fiable pour quantifier la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, l'eau des pores et le sédiment, et pour laquelle la précision et les seuils de détection et de quantification sont connus. Il est également utile de connaître la formule structurale et la pureté de la substance d'essai ainsi que son devenir chimique (par exemple dissipation, dégradation abiotique et biotique, etc.). Des conseils pour tester les substances se prêtant difficilement à l'essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont fournis à la référence (12).

## SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

9. Des substances de référence doivent être testées régulièrement pour démontrer, le cas échéant, la fiabilité du protocole et des conditions de l'essai. Voici quelques exemples de toxiques de référence ayant fait leurs preuves dans des essais tournants et des études de validation : lindane, trifluraline, pentachlorophénol, chlorure de cadmium et chlorure de potassium (1)(2)(5)(6)(13).

## VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. Pour que l'essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies :
- l'émergence dans chacun des réplicats chez les témoins doit atteindre au moins 70% à la fin de l'essai (1)(6) ; les données devront être consignées pour chaque réplicat (voir paragraphe 54) ;
  - S'agissant de *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, l'émergence au stade adulte dans les récipients témoins doit avoir lieu entre 12 et 23 jours après leur introduction dans les récipients expérimentaux ; *C. dilutus* réclame une période de 20 à 65 jours ;
  - Tout au long de l'essai, la concentration d'oxygène dissous devrait atteindre au moins 60% de sa valeur dans l'air saturé (VAS) à la température appliquée et le pH de l'eau sus-jacente devrait être compris entre 6 et 9 ;
  - Tout au long de l'essai, la température de l'eau ne devrait pas varier de plus de  $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$ .

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

### **Récipients expérimentaux**

11. L'essai se déroule dans des béchers en verre de 600 ml, mesurant 8 cm de diamètre. D'autres récipients peuvent être utilisés à condition qu'ils permettent à l'eau sus-jacente et au sédiment d'atteindre une profondeur suffisante. Le sédiment doit offrir une superficie de 2 à 3 cm<sup>2</sup> par larve. Le quotient de la profondeur de la couche de sédiment par la profondeur de la couche d'eau sus-jacente doit être égal à 1/4. Les récipients et les autres appareils qui entreront en contact avec le système d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte (par exemple du Téflon ou du polytétrafluoroéthylène (PTFE)).

### **Sélection des espèces**

12. *Chironomus riparius* est l'espèce qui convient le mieux. *Chironomus dilutus* peut aussi être utilisé, mais il est plus difficile à manipuler et nécessite une période d'essai plus longue. *Chironomus yoshimatsui* convient également. La méthode de culture de *Chironomus riparius* est détaillée à l'Annexe 2. D'autres documents décrivent les conditions de culture d'autres espèces : *Chironomus dilutus* (4) (14) et *Chironomus yoshimatsui* (11). L'identification des espèces est à confirmer avant l'essai, mais n'est pas requise avant chaque essai si les organismes ont été cultivés sur place.

### **Sédiment**

13. Il est préférable d'employer un sédiment reconstitué. Néanmoins, si l'on opte pour un sédiment naturel, il faudrait le caractériser, au moins quant au pH et à la teneur en carbone organique ; en outre il est recommandé de déterminer d'autres paramètres, tels que le rapport C/N et la granulométrie est aussi recommandée), et s'assurer qu'il n'est pas contaminé et n'abrite pas d'autres organismes qui pourraient entrer en compétition avec les chironomes ou les consommer. Avant d'utiliser un sédiment naturel dans un essai de toxicité sur les chironomes, il est également

recommandé de le maintenir durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui régneront durant l'essai (conditionnement). Le sédiment reconstitué comme décrit ci-dessous, d'après le sol artificiel utilisée dans la Ligne directrice 222 (15) est recommandé pour utilisation dans cet essai (1)(16)(17) :

- a. 4-5% (poids sec) de tourbe (p.ex. Sphagnum), avec un pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0 ; il est important d'utiliser une tourbe sous forme de poudre, finement broyée (dimension des particules :S 1 mm) et séchée uniquement à l'air.
- b. 20% (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30%)
- c. 75-76% (poids sec) de sable quartzique (composé en majorité de sable fin, plus de 50% des particules mesurant entre 50 et 200  $\mu\text{m}$ ).
- d. ajouter de l'eau désionisée jusqu'à ce que la teneur en humidité du sédiment atteigne 30 à 50%.
- e. ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure ( $\text{CaCO}_3$ ) pour ajuster le pH du mélange final de sédiments à  $7,0 \pm 0,5$ .
- f. Il faudrait obtenir 2% ( $\pm 0,5\%$ ) de carbone organique dans le mélange final en y ajoutant les quantités appropriées de tourbe et de sable, comme indiqué en (a) et en (c).

14. Les sources de tourbe, d'argile kaolinique et de sable doivent être connues. On vérifiera que les composants du sédiment ne sont pas contaminés par des substances chimiques (par exemple des métaux lourds, des composés organochlorés, organophosphorés, etc.). Un exemple de préparation de sédiment reconstitué est décrit à l'Annexe 3. Les composants peuvent aussi être mélangés à l'état sec, à condition de démontrer qu'après l'ajout de l'eau sus-jacente, les composants du sédiment ne se séparent pas (flottement de particules de tourbe, par exemple) et que la tourbe ou le sédiment sont suffisamment conditionnés.

15. Le type de sédiment et les ses propriétés peuvent affecter de manière substantielle le devenir et la biodisponibilité de la substance chimique testée, et par conséquent l'absorption par l'organisme d'essai et la toxicité. Dans le cas où un sédiment naturel est utilisé, il est impératif que les caractéristiques du sédiment qui peuvent avoir une influence sur la biodisponibilité et donc la toxicité soient reportées. Le carbone organique total fournit normalement la phase de liaison principale pour de nombreux produits chimiques et donc sa concentration dans le sédiment naturel doit être mesurée afin de normaliser les données de toxicité par rapport au carbone organique total (18) (19) (voir paragraphe 45).

### **Eau**

16. L'eau reconstituée doit être utilisée de préférence. Cependant toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable selon les critères spécifiés aux Annexes 2 et 4 convient à l'essai. Toute eau appropriée, naturelle (eau superficielle ou souterraine), reconstituée (voir Annexe 2) ou eau du robinet déchlorée, est acceptable comme eau de culture et d'essai, si les chironomes y survivent sur toute la durée de la culture et de l'essai sans manifester de signes de stress (p. ex. une attitude inhabituelle). Au début de l'essai, le pH de l'eau d'essai se situera entre 6 et 9 et sa dureté totale ne dépassera pas 400 mg/l en  $\text{CaCO}_3$ . Néanmoins, si l'on suspecte une interaction entre les ions qui provoquent la dureté et la substance d'essai, il faudra utiliser une eau moins dure (et ne pas employer le milieu Elendt M4 dans ce cas). Le même type d'eau doit être utilisé tout au long de l'étude. Les caractéristiques de la qualité de l'eau énumérées à l'Annexe 4 sont à mesurer au moins deux fois par an si une eau courante est utilisée, ou chaque fois que ses caractéristiques sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées. Si une eau courante est utilisée, une attention particulière devra être portée sur la caractéristiques mentionnées plus haut.

### **Solutions mères – eau chargée**

17. Les concentrations expérimentales sont calculées en fonction des concentrations dans la colonne d'eau surmontant le sédiment. Les solutions d'essai sont généralement préparées aux concentrations choisies par dilution d'une solution mère. Il est préférable de préparer les solutions mères en dissolvant la substance d'essai dans le milieu d'essai. Si la substance d'essai est peu soluble dans l'eau, il sera nécessaire d'utiliser des solvants ou des dispersants pour obtenir une solution mère à la concentration voulue c.à.d. il sera nécessaire de produire une solution mère suffisamment concentrée. Dans ce cas, le Document Guide No. 23 (12) devra être suivi. Voici quelques exemples de solvants appropriés : acétone, éthanol, méthanol, éthylèneglycol, monoéthyléther, diméthyléther d'éthylèneglycol, diméthylformamide et triéthylèneglycol. Les dispersants qui peuvent être utilisés sont le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01% et l'HCO-40. La concentration de l'agent solubilisant dans le milieu d'essai final doit être minimale (:S 0,1 ml/l) et identique dans tous les traitements. L'agent solubilisant, s'il est utilisé, ne doit pas avoir d'effets significatifs sur la survie, ni d'effet nocif visible sur les larves de chironomes, et ce d'après l'observation des organismes du récipient témoin traité uniquement au solvant. Néanmoins, l'utilisation de ces substances est à éviter dans toute la mesure du possible.

### **CONCEPTION DE L'ESSAI**

18. La conception de l'essai définit le nombre et l'espacement des concentrations expérimentales, le nombre de récipients à chaque concentration et le nombre de larves par récipient. La marche à suivre pour estimer le CE ponctuelle, la CSEO et effectuer un essai limite est décrite. L'analyse de régression est préférable à la vérification d'une hypothèse.

### **Conduite d'une analyse de régression**

19. La gamme de concentrations et la concentration efficace (par exemple, CE10, CE50) auxquelles la substance d'essai produit un effet intéressant doivent être couvertes par les concentrations incluses dans l'essai. Généralement, l'exactitude, et plus particulièrement la validité, de l'estimation des concentrations efficaces (CE<sub>x</sub>) s'accroissent lorsque la concentration efficace se situe dans la gamme des concentrations testées. Il faut éviter d'extrapoler des résultats en dehors des concentrations testées. Il est utile de conduire un essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur afin de délimiter la gamme des concentrations à appliquer (voir paragraphe 28).

20. S'il faut estimer la CE<sub>x</sub>, au moins cinq concentrations et trois expériences identiques par concentration doivent être mises à l'essai. En tout état de cause, il est recommandé de tester suffisamment de concentrations pour obtenir une bonne estimation du modèle. Le facteur séparant les concentrations ne doit pas excéder deux (sauf dans les cas où la courbe dose-effet présente une pente faible). Le nombre d'expériences identiques par traitement peut être diminué dans certains cas ; notamment quand le nombre de concentrations expérimentales entraînant différents effets attendus est largement augmenté. L'augmentation du nombre d'expériences identiques ou la contraction des intervalles entre les concentrations expérimentales tend à réduire les intervalles de confiance pour l'essai. Le nombre d'expériences identiques sera augmenté s'il y a lieu d'estimer le taux de survie et la croissance des larves après dix jours.

### **Procédure d'estimation d'une CSEO/CMEO**

21. S'il faut estimer la CMEO ou la CSEO, on mettra à l'essai cinq concentrations expérimentales et au moins quatre expériences identiques par concentration, le facteur séparant les concentrations n'excédant pas deux. Le

nombre d'expériences identiques doit être tel qu'il fournit une puissance statistique permettant de détecter une différence de 20% avec le témoin, au seuil de signification statistique de 5% ( $p = 0,05$ ). S'agissant de la vitesse de développement, une analyse de la variance (ANOVA) convient généralement, telle que le test de Dunnett ou le test de Williams (20)(21)(22)(23). S'agissant des données relatives à l'émergence, le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haentzel peuvent être utilisés. Dans l'alternative, le test CPFISH (closure principle and Fisher-Freeman-Halton) peut être utilisé puisque ce test a une puissance statistique élevée (24).

### **Essai limite**

22. Si l'essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations n'a engendré aucun effet, un essai limite peut être conduit (une concentration expérimentale et un témoin). L'essai limite vise à montrer que la concentration est suffisamment élevée pour permettre une décision d'exclure des effets toxiques du produit chimique testé, et le test limite est conduit à une concentration élevée qui n'est pas susceptible de se produire dans quelconque situation. Aucune concentration ne peut être recommandée pour cette Ligne directrice, elle est laissée à l'appréciation du responsable de la réglementation. Généralement, il est nécessaire de mener au moins six expériences identiques pour les organismes traités et les témoins. Il y a lieu de démontrer que la puissance statistique est suffisante pour révéler une différence de 20% avec les témoins, au seuil de signification statistique de 5% ( $p = 0,05$ ). En ce qui concerne l'effet sur la vitesse de développement et sur le poids, le test t constitue une méthode statistique appropriée, si les données respectent les conditions exigées par ce test (normalité, variances homogènes). On pourra recourir au test t à variance inégale ou à un test non paramétrique, tel que le test de Wilcoxon-Mann-Whitney si ces conditions ne sont pas remplies. S'agissant du taux d'émergence, le test exact de Fisher est approprié.

## **MODE OPÉRATOIRE**

### **Conditions d'exposition**

#### *Préparation du système eau chargée-sédiment*

23. Une quantité appropriée de sédiment reconstitué (voir paragraphes 13-14 et Annexe 3) est déposée dans les récipients expérimentaux, de façon à former une couche de  $1,5 \pm 0,25$  cm. Le poids du sédiment ajouté à chaque récipient expérimental (ou au moins les récipients utilisés pour la confirmation analytique) doivent être enregistrés. Cette information est nécessaire au calcul du bilan massique (voir paragraphe 43). La profondeur de l'eau versée sur ce sédiment atteindra 6 cm (voir paragraphe 16). Le quotient de la profondeur du sédiment par la profondeur de l'eau devrait être 1/4 et la couche de sédiment ne dépassera pas  $1,5 \pm 0,25$  cm. Le système sédiment-eau sera laissé sous aération légère pendant 7 jours pour la stabilisation avant l'ajout des organismes d'essai (voir paragraphe 14 et Annexe 3). Afin d'éviter la séparation des ingrédients du sédiment et la resuspension des particules fines durant le remplissage de la colonne d'eau, on peut recouvrir le sédiment d'un disque (fait d'acier inoxydable ou de PTFE) et retirer le disque juste après le remplissage. D'autres dispositifs conviennent également.

24. Les récipients expérimentaux doivent être couverts (par des plaques de verre avec ouverture pour les tubes d'aération, par exemple). On prendra soin de remplacer les volumes d'eau évaporée durant l'étude, le cas échéant, et ce avec de l'eau distillée ou désionisée afin d'empêcher l'accumulation de sels.

### *Introduction des organismes d'expérience*

25. Quatre à cinq jours avant d'introduire les organismes d'expérience dans les récipients, des amas d'oeufs sont prélevés dans les cultures et déposés dans de petits flacons garnis de milieu de culture. Un milieu plus ancien issu de la culture mère tout comme un milieu fraîchement préparé peuvent être utilisés. Si ce dernier est utilisé, on ajoutera une petite quantité de nourriture, par exemple des algues vertes et/ou quelques gouttes du filtrat d'une suspension de paillettes pour poissons finement broyées, au milieu de culture (voir Annexe 2). Seuls des amas d'oeufs fraîchement pondus peuvent être utilisés. Normalement, les larves commencent à éclore quelques jours après la ponte (2 à 3 jours après éclosion pour *Chironomus riparius* à 20°C et 1 à 4 jours après éclosion pour *Chironomus dilutus* à 23°C et *Chironomus yoshimatsui* à 25°C) et le développement des larves se déroule en quatre stades, dont chacun dure 4 à 8 jours. Cet essai se pratique au premier stade larvaire (2-3 ou 1-4 jours après l'éclosion). Il est possible de vérifier le stade de développement des moucheron d'après la largeur de la capsule de la tête (6).

26. Vingt larves au premier stade, choisies au hasard, sont déposées dans chaque récipient contenant le sédiment chargé et l'eau, à l'aide d'une pipette émoussée. L'aération légère de l'eau doit être interrompue dès qu'on introduit les larves dans les récipients expérimentaux, et ce durant environ 4 heures après l'ajout des larves (voir paragraphes 25 et 33). Selon le protocole expérimental principal suivi (voir paragraphes 20 et 21), le nombre de larves utilisées par concentration s'élève au moins à 60 pour l'estimation de la concentration efficace (CE) ponctuelle et à 80 pour la détermination de la CSEO.

27. Vingt-quatre heures après l'introduction des larves dans les récipients expérimentaux, l'aération est de nouveau stoppée et la substance d'essai est ajoutée à la colonne d'eau sus-jacente. De petits volumes de la solution contenant la substance d'essai sont injectés en dessous de la surface de la colonne d'eau à l'aide d'une pipette. Ensuite, on mélange doucement l'eau sus-jacente en prenant soin de ne pas remuer le sédiment. Quand l'ajout de substances est terminé, l'aération peut reprendre et des échantillons sont prélevés pour les vérifications analytiques des concentrations de substance chimique testée, de préférence une heure après l'ajout de substance d'essai.

### *Concentrations expérimentales*

28. Il peut être utile de conduire un essai de détermination de l'ordre de grandeur pour délimiter la gamme de concentrations à appliquer dans l'essai proprement dit. À cet effet, on utilise une série de concentrations largement espacées de la substance d'essai. Les chironomes sont exposés à chaque concentration de la substance d'essai durant une période permettant d'estimer les concentrations expérimentales appropriées et aucune expérience identique n'est nécessaire. La densité larvaire par récipient d'essai doit être la même que pour le test définitif. Pour le test définitif, au moins cinq concentrations devront être utilisées et sélectionnées tel que décrit aux paragraphes 19 à 21.

### *Témoins*

29. L'essai comportera le nombre nécessaire de récipients témoins pourvus du sédiment mais exempts de toute substance d'essai (voir paragraphes 20-21). Si la substance d'essai a été appliquée à l'aide d'un solvant (voir paragraphe 17), un récipient témoin renfermant du solvant (eau additionnée de solvant seul) et comprenant du sédiment devra être rajouté en plus du témoin habituel (témoin négatif). Il devra correspondre à la concentration de solvant la plus élevée utilisée dans les niveaux de traitement et ne devra généralement pas excéder 0.01%.

### *Système expérimental*

30. On utilise des systèmes statiques. Si l'évaporation se produit pendant l'essai, le volume d'eau sus-jacente devra être régulièrement ajusté par ajout d'eau distillée ou désionisée. Des systèmes semi-statiques ou à écoulement

continu avec renouvellement intermittent ou continu de l'eau sus-jacente peuvent être utilisés dans des cas exceptionnels, par exemple si les spécifications de la qualité de l'eau deviennent inappropriées pour l'organisme d'expérience ou affectent l'équilibre chimique (si, par exemple, la concentration d'oxygène dissous ou la concentration des excréta sortent des limites respectives, ou si des minéraux lessivés à partir du sédiment affectent le pH et/ou la dureté de l'eau). Néanmoins, d'autres méthodes d'amélioration de la qualité de l'eau sus-jacente, telles que l'aération, seront normalement suffisantes et préférables.

### *Alimentation*

31. Les larves ont besoin d'être nourries, de préférence quotidiennement ou au moins trois fois par semaine. Durant les dix premiers jours, chaque jeune larve recevra quotidiennement 0,25 à 0,5 mg (0,35-0,5 mg pour *C. yoshimatsui*) de nourriture pour poissons (suspendue dans l'eau ou finement broyée, par exemple Tetra-Min® ou Tetra-phyll® ; voir les détails à l'Annexe 2). Il peut être nécessaire d'augmenter légèrement cette quantité pour les larves plus âgées : 0,5-1 mg par larve et par jour devrait suffire pour le reste de l'essai. Les moucheron ne se nourrissent pas quand ils atteignent le stade de puppe, donc le régime alimentaire devra être adapté au nombre de larves qui ont atteint le stade de puppe et/ou ont émergé afin d'éviter des niveaux bas d'oxygène dissous. On diminuera la ration alimentaire de tous les organismes traités et témoins si des champignons se développent ou si des organismes témoins meurent. Si la croissance fongique s'avère impossible à enrayer, l'essai est à recommencer. Si l'essai porte sur des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un  $\log K_{oc} > 5$ ) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, la quantité de nourriture nécessaire à la survie et à la croissance naturelle des organismes peut être incorporée au sédiment reconstitué avant la période de stabilisation. Dans ce cas, la nourriture pour poissons est remplacée par une ration végétale, par exemple 0,5% (poids sec) de feuilles finement broyées d'ortie (*Urtica dioeca*), de mûrier (*Morus alba*), de trèfle blanc ou rampant (*Triflorium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*) ou d'un autre matériau végétal (la paille de blé séchée et moulue ou l'alpha-cellulose peuvent être utilisées (25). Dans l'alternative, des sédiments collectés sur le terrain comprenant un contenu nutritionnel suffisant pour la durée totale de l'essai peuvent être utilisés en remplacement du sédiment OCDE standard qui a une valeur nutritionnelle plus basse, pour autant que les chironomes puissent y survivent la durée de l'essai sans montrer de symptômes de stress (par exemple une migration des larves vers la colonne d'eau ou d'autres comportements inhabituels).

### *Conditions d'incubation*

32. L'eau sus-jacente est soumise à une légère aération, mise en route de préférence 24 heures après l'introduction des larves et maintenue jusqu'à la fin de l'essai (il faut veiller à ce que la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 60% de sa valeur dans l'air saturé). L'air est insufflé à travers une pipette Pasteur en verre fixée 2 à 3 cm au-dessus de la couche de sédiment (une ou quelques bulles par seconde). Si la substance d'essai est volatile, il faudra éventuellement supprimer l'aération.

33. L'essai est mené à température constante ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Pour *C. dilutus* et *C. yoshimatsui*, les températures recommandées s'élèvent respectivement à  $23^{\circ}\text{C}$  et  $25^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$ . Si l'essai est effectué dans une pièce isotherme, la température ambiante devra être vérifiée à des intervalles de temps appropriés (au moins une fois par jour). La photopériode est de 16 heures et l'éclairage compris entre 500 et 1 000 lux.

### *Durée de l'exposition*

34. L'exposition débute avec l'introduction des larves dans les récipients traités et témoins. La durée maximale d'exposition atteint 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et 65 jours pour *C. dilutus*. Si les moucheron émergent plus tôt, l'essai peut s'achever au moins cinq jours après l'émergence du dernier adulte témoin.

## **Observations**

### *Émergence*

35. Le nombre de moucheron mâles adultes totalement émergés et le nombre de moucheron femelles adultes totalement émergés, ainsi que le nombre de moucheron émergés (mâles et femelles) sont à déterminer de façon quotidienne. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses. Les taux de développement respectifs sont calculés selon les paragraphes 52 et 53.

36. Au moins trois fois par semaine, on vérifiera que les organismes des récipients expérimentaux ne manifestent aucun comportement anormal (sortie du sédiment, nage inhabituelle, par exemple) par rapport aux témoins. Chaque jour, durant la période supposée de l'émergence, il faut compter le nombre de moucheron émergés et consigner le sexe et le nombre de moucheron complètement émergés. Une fois identifiés, les moucheron sont retirés des récipients. Tout amas d'oeufs déposé avant la fin de l'essai doit être recensé puis enlevé afin d'empêcher la réintroduction de larves dans le sédiment. Le nombre de pupes visibles n'ayant pas réussi à émerger est aussi enregistré.

### *Croissance et survie*

37. S'il faut fournir des données sur la survie et la croissance des larves après 10 jours, des récipients expérimentaux supplémentaires seront inclus dès le début de l'essai, pour pouvoir être utilisés ultérieurement. Le sédiment de ces récipients supplémentaires est tamisé à travers des mailles de 250 µm pour retenir les larves. La mort est déterminée par deux critères : l'immobilité et l'absence de réaction à un stimulus mécanique. Les larves non récupérées doivent aussi être comptabilisées parmi les mortes (les larves qui sont mortes au début de l'essai ont pu être dégradées par des microbes). Après avoir déterminé le poids sec (sans cendres) des larves survivantes par récipient expérimental, on calcule le poids sec individuel moyen par récipient. Il est utile d'établir à quel stade se trouvent les larves survivantes, et ce d'après la largeur de la capsule de la tête de chaque individu.

## **Mesures analytiques**

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

38. Concernant la détermination analytique des concentrations d'essai, il est recommandé de prélever au minimum pour l'analyse des échantillons de l'eau sus-jacente, de l'eau interstitielle, et du sédiment, au début (de préférence une heure après l'application de la substance d'essai) et à la fin de l'essai, et ce pour la concentration la plus élevée et pour une concentration plus faible, mais de préférence pour toutes les concentrations et dans au moins un récipient par niveau de traitement. La concentration de la substance d'essai nous renseigne sur le comportement et la répartition de la substance d'essai dans le système eau-sédiment. Il n'est pas forcément nécessaire d'analyser le sédiment si la répartition de la substance d'essai entre l'eau et le sédiment a été clairement déterminée par une étude eau/sédiment menée dans des conditions comparables (par exemple, quotient sédiment/eau, type d'application, teneur en carbone organique du sédiment).

39. Si l'analyse requiert des échantillons volumineux qui ne peuvent être prélevés des récipients sans influencer le système expérimental (par exemple du fait que les échantillons sont prélevés à différents moments du test), les analyses seront pratiquées sur des échantillons provenant de récipients expérimentaux supplémentaires traités de la même façon (y compris par la présence des organismes d'expérience), mais non utilisés pour les observations biologiques.

40. Pour isoler l'eau des pores, on recommande de centrifuger des échantillons à 10 000 g et à 4°C durant 30 minutes. Cependant, s'il est démontré que la substance d'essai ne s'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Avec des échantillons trop petits, il arrive que les concentrations dans l'eau interstitielle soient impossibles à analyser.

### **Paramètres physico-chimiques**

41. Le pH, l'oxygène dissous et la température devront être mesurés au minimum dans un récipient de chaque niveau de traitement et un récipient des témoins au début de l'exposition et une fois par semaine en semaine 2 et semaine 3 de l'exposition, et dans tous les récipients désignés pour la détermination des variables biologiques à la fin de la période d'essai. La dureté de l'eau et la teneur en ammoniac sont mesurées dans les récipients témoins et dans un récipient traité à la concentration la plus élevée, au début et à la fin de l'essai.

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### **Traitement des résultats**

42. Cet essai vise à déterminer l'effet de la substance d'essai sur la vitesse de développement, le nombre total de moucheron mâles totalement émergés, le nombre total de moucheron femelles totalement émergés ainsi que le nombre total de moucheron totalement émergés, ou dans le cas de l'essai de 10 jours, les effets sur la survie et le poids des larves. Si rien n'indique que les deux sexes présentent des différences statistiques de sensibilité, les résultats obtenus sur les mâles et les femelles peuvent être regroupés pour l'analyse statistique. Les différences de sensibilité entre les sexes peuvent être jugées statistiquement par un test (de tableau)  $\chi^2$ , par exemple. La survie des larves et le poids sec individuel moyen par récipient doivent être déterminés après dix jours, le cas échéant.

43. Les concentrations produisant des effets devraient toujours être enregistrés en mg de substance testée/L d'eau et en terme de mg de substance testée/kg de sédiment sec si la substance est détectée dans le sédiment. Du fait que la décision concernant l'expression des effets devra se baser sur le partage de la substances dans les différents compartiments, il est recommandé d'enregistrer les calculs relatifs à l'équilibre massique (25) (voir Annexe 5). Ceci est optionnel en fonction des exigences des différentes réglementations ; il est aussi particulièrement important pour les substances difficiles à tester (concentrations difficiles à maintenir dans le système d'essai). Les effets mesurés peuvent aussi être exprimés en mg de substance d'essai/L d'eau sus-jacente quand cela est pertinent.

44. Afin d'exprimer les effets mesurés en terme de concentrations nominales, il devrait y avoir des preuves que la concentration de la substance d'essai a été maintenue de façon satisfaisante dans l'eau sus-jacente (c.à.d. entre 80% et 120% de la concentration nominale tout au long de la période de l'essai). Si les concentrations sont susceptibles de dévier de plus de 20%, toutes les concentrations testées devront être mesurées et des analyses plus fréquentes pourraient être effectuées. Dans ce cas, les effets seront exprimés en moyenne géométrique des concentrations mesurées ou en moyenne arithmétique pondérée des concentrations mesurées dans le temps quand les échantillons ont été prélevés à des intervalles de temps inégaux (les calculs prendront en compte également les mesures analytiques intermédiaires supplémentaires en accord avec les recommandations de l'Annexe 2 du

Document Guide sur les Substances difficiles à tester en milieu aquatique (12) et les exemples de l'Annexe 6 de la Ligne directrice 211 : Test de reproduction de *D. magna* (27). Dans le cas où les concentrations moyennes mesurées dévient de plus de 20% des concentrations initiales et/ou que les concentrations sont susceptibles de chuter sous la limite de quantification/limite de détection pendant la durée de l'essai (sur la base des données analytiques dérivées d'études eau-sédiment préalables) une conception de l'essai comprenant un renouvellement du milieu d'essai peut s'avérer nécessaire. Les effets pourront alors être exprimés selon (12). Quand l'objectif est de simuler une dérive de pulvérisation de pesticide, les effets pourront être exprimés sur la base des concentrations initiales mesurées. Il faudra procéder à des vérifications analytiques plus fréquentes dans ce cas.

45. Afin de convertir les données de concentration exprimées p. ex. en mg/kg de sédiment sec en mg/kg de carbone organique (CO), la concentration de sédiment sec devra être divisée par le pourcentage de COT (carbone organique total, exprimé en nombre décimal), comme suit :

$$mg/kg\ CO = \frac{mg/kg\ \text{sédiment sec}}{kg\ CO/kg\ \text{sédiment sec}}$$

46. Pour estimer ponctuellement la CE50 ou une quelconque CEx, les statistiques par récipient peuvent être utilisées comme des expériences identiques proprement dites. Lorsqu'on calcule un intervalle de confiance pour une quelconque CEx, il faut tenir compte de la variabilité entre les récipients ou montrer que celle-ci est négligeable. Si le modèle est ajusté par la méthode des moindres carrés, il convient de transformer les statistiques par récipient afin d'accroître l'homogénéité de la variance. Toutefois, les valeurs de la CEx sont à calculer après que les résultats ont été «détransformés» de façon à recouvrer leur valeur originale. Des informations plus détaillées sur les statistiques sont fournies dans le Document de l'OCDE No. 54 sur les Approches actuelles dans l'analyse statistique des données d'écotoxicité : guide d'application (28).

47. Si l'analyse statistique vise à déterminer la CSEO/CMEO par la vérification d'une hypothèse, la variabilité entre les récipients doit être prise en compte, par exemple à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) «emboîtée». Par contre, des tests plus robustes (29) peuvent être utilisés au cas où les hypothèses habituelles de l'analyse de la variance ne se vérifient pas.

### **Taux d'émergence**

48. Le taux d'émergence donne une réponse par tout ou rien et peut être analysé par le test de Cochran-Armitage appliqué de façon régressive si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Dans le cas contraire, un test exact de Fisher ou un test de Mantel-Haentzal avec des valeurs de p corrigées selon Bonferroni-Holm peuvent être employés. S'il s'avère que la variabilité entre expériences identiques à la même concentration est supérieure à ce qu'une distribution binomiale indiquerait (variation souvent qualifiée d'«extra-binomiale»), on appliquera un test plus robuste (Cochran-Armitage ou test exact de Fisher) comme proposé à la référence (29). Le test CPFISH (closure principle and Fisher-Freeman-Halton test (24)) peut également être utilisé pour évaluer les données d'émergence (voir paragraphe 21).

La somme des moucheron émergés par récipient,  $n_e$ , est déterminée et divisée par le nombre de larves introduites,  $n_a$  :

$$TE = \frac{n_e}{n_a}$$

où :

$TE$	=	taux d'émergence
$n_e$	=	nombre de moucheron émergés par récipient
$n_a$	=	nombre de larves introduites par récipient

49. Une variante plus appropriée aux échantillons de grande taille, lorsque la variance est extra-binomiale, consiste à traiter le taux d'émergence comme une réponse continue et à appliquer une méthode telle que le test de Williams, si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les résultats du taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Le test de Dunnett convient dans le cas où la relation ne s'avère pas monotone. Ici, on considère qu'un échantillon est de grande taille lorsque le nombre de moucheron émergés et le nombre de chironomes non émergés dépassent chacun cinq, par récipient expérimental.

50. Avant d'appliquer l'analyse de la variance (ANOVA), il faut transformer les valeurs du TE par arcsinus-racine carrée ou selon Tukey-Freeman afin d'obtenir une distribution proche de la normale et d'égaliser les variances. Le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction Bonferroni) ou le test de Mantel-Haentzel peuvent être employés lorsqu'on utilise des fréquences absolues. La transformation arcsinus-racine carrée consiste à calculer l'inverse du sinus (sinus-1) de la racine carrée du TE.

51. Pour les taux d'émergence, les valeurs de la CEx sont calculées par une analyse de régression (ou par probit (30), logit, Weibull, des logiciels commerciaux appropriés, etc.). Si l'analyse de la régression échoue (par exemple, lorsqu'il y a moins de deux réponses partielles), on fait appel à d'autres méthodes non paramétriques telles que la moyenne mobile ou une simple interpolation.

### **Vitesse de développement**

52. La période moyenne de développement représente le temps moyen écoulé entre l'introduction des larves (jour 0 de l'essai) et l'émergence de la cohorte expérimentale de moucheron (pour calculer la période réelle de développement, il faut tenir compte de l'âge des larves au moment de l'introduction). La vitesse de développement est l'inverse de la période de développement (unité : 1/jour) et représente la portion de développement larvaire qui s'effectue par jour. Pour évaluer la toxicité dans les sédiments, il est préférable de choisir la vitesse de développement car sa variance est plus faible et ses valeurs sont plus homogènes et plus proches d'une distribution normale, en comparaison avec la période de développement. C'est pourquoi les tests paramétriques puissants conviennent mieux à la vitesse de développement qu'à la période de développement. Si la vitesse de développement est traitée comme une réponse continue, les valeurs de la CEx peuvent être estimées par l'analyse de la régression, par exemple (31), (32).

53. Pour les tests statistiques suivants, le nombre de moucheron observés le jour  $x$  sont considérés comme ayant émergé au milieu de l'intervalle de temps compris entre le jour  $x$  et le jour  $x-1$  ( $1$  = longueur de l'intervalle

d'observation, habituellement 1 jour). La vitesse de développement moyenne par récipient ( $\bar{x}$ ) est calculée comme suit :

( $\bar{x}$ ) est calculée comme suit :

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

Où :

$x$  = vitesse de développement moyenne par récipient  $i$  = indice de l'intervalle d'observation

$m$  = nombre maximal d'intervalles d'observation

$f_i$  = nombre de moucheron émergés durant l'intervalle d'observation  $i$

$n_e$  = nombre total de moucheron émergés à la fin de l'expérience (=L  $f_i$ )

$x_i$  = vitesse de développement des moucheron émergés durant l'intervalle  $i$

$$x_i = 1 / \left( \text{jour}_i - \frac{1_i}{2} \right)$$

où :

$$x_i = 1 / (\text{jour}_i - 1_i/2)$$

$\text{jour}_i$  = jour d'observation (compté depuis l'application)

$1_i$  = longueur de l'intervalle d'observation  $i$  (exprimé en jours, habituellement 1 jour)

### **Rapport d'essai**

54. Le rapport d'essai doit fournir au moins les informations suivantes : Substance d'essai :

- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (hydrosolubilité, pression de vapeur, coefficient de partage octanol-eau, coefficient de partage dans le sol (ou dans le sédiment s'il est connu), stabilité dans l'eau, etc.) ;
- identification chimique (nom courant, nom chimique, formule structurale, numéro CAS, etc.), pureté et méthode d'analyse pour la quantification de la substance d'essai.

*Type d'expérience :*

- animal expérimental utilisé : espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage ;
- informations sur la manipulation des amas d'oeufs et des larves ;
- âge des animaux d'expérience au moment où ils ont été déposés dans les récipients expérimentaux.

*Conditions expérimentales :*

- sédiment utilisé, c'est-à-dire naturel ou reconstitué ;
- pour les sédiments naturels : localisation et description du site de prélèvement et notamment, si possible, son histoire en matière de contamination ; caractéristiques : pH, teneur en carbone organique, quotient C/N et granulométrie, le cas échéant.
- préparation du sédiment reconstitué : ingrédients et caractéristiques (teneur en carbone organique, pH, humidité, etc. au début de l'essai) ;
- préparation de l'eau d'essai (si l'eau est reconstituée) et caractéristiques (concentration d'oxygène, pH, conductivité, dureté, etc. au début de l'essai) ;
- profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente ;
- volume de l'eau sus-jacente et de l'eau interstitielle ; poids du sédiment humide avec et sans eau interstitielle ;
- récipients expérimentaux (matériau et dimension) ;
- méthode de préparation des solutions mères et des concentrations expérimentales ;
- application de la substance d'essai : concentrations expérimentales utilisées, nombre d'expériences identiques et utilisation d'un solvant, le cas échéant ;
- conditions d'incubation : température, cycle et intensité de lumière, aération (fréquence et intensité) ;
- informations détaillées sur la nourriture : type de nourriture, préparation, quantité et régime d'administration.

*Résultats :*

- concentrations d'essai nominales, concentrations d'essai mesurées et résultats de toutes les analyses conduites pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans le récipient expérimental y compris l'évaluation du bilan massique si nécessaire; si les mesures dans les sédiments ne sont pas effectuées, une justification et des résultats de l'étude sédiment-eau utilisée pour évaluer le partage de la substance d'essai et les conditions (par exemple le ratio sédiment-eau, le type d'application, le contenu de carbone organique du sédiment) ;
- qualité de l'eau dans les récipients expérimentaux : pH, température, oxygène dissous, dureté et teneur en ammoniac ;
- remplacement de l'eau d'essai évaporée, le cas échéant ;
- nombre de moucheron mâles émergés et nombre de moucheron femelles émergées par récipient et par jour ;

- nombre de larves non émergées sous la forme de moucheron par récipient ;
- poids sec individuel moyen des larves par récipient, et par stade larvaire, s'il y a lieu ;
- pourcentage d'émergence par expérience identique et par concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucheron mâles et femelles) ;
- vitesse de développement moyenne des moucheron totalement émergés par expérience identique et par concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucheron mâles et femelles) ;
- estimation des effets toxiques observés, par exemple CEx (et intervalles de confiance associés), CSEO et/ou CMEQ, et méthodes statistiques employées pour les déterminer ;
- analyse des résultats, y compris les répercussions sur les résultats d'un écart éventuel à la présente Ligne directrice.

## BIBLIOGRAPHIE

1. BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.
2. R. Fleming *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
3. SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
4. ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.
5. Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.
6. US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.
7. US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996). Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
8. US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996). Chironomid Sediment toxicity Test.
9. Milani, D., K.E. Day, D.J. McLeay, and R.S. Kirby. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.
10. Sugaya, Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.
11. Kawai, K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1):47-57.
12. OECD (2019), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Test Chemicals, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23 (Second Edition), [ENV/JM/MONO\(2000\)6/REV1](#), OECD, Paris.

13. Environment Canada. (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.
14. ASTM E1706-20 (2020). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates.
15. OECD (2016), Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264496-en>
16. Suedel, B.C. and J.H. Rodgers. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.
17. Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.
18. ECHA 2017. Guidance on the Biocidal Regulation. Volume IV Environment – Assessment and Evaluation (Parts B + C). Helsinki (FI).
19. ECHA 2017. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.7b: endpoint specific guidance. Helsinki (FI).
20. Dunnett, C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50: 1096-1121.
21. Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.
22. Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.
23. Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.
24. Lehmann, R., J. Bachmann, B. Karaoglan, J. Lacker, C. Polleichtner, H.T. Ratte and M. Ratte (2018). An alternative approach to overcome shortcomings with multiple testing of binary data in ecotoxicology. Stoch. Environ. Res. Risk. Assess. 32: 213–222.
25. EFSA (2019). Pesticide Peer Review meeting on general recurring issues in ecotoxicology (EFSA Supporting publication 2019:EN-1673)
26. OECD (2012), Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264185203-en>
27. Egeler, P., K.S. Henry and C. Riedhammer (2010). Potential effects of food addition to sediment on test conditions in sediment toxicity tests. J. Soils Sediments 10: 377–388.
28. OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Series on Testing and Assessment No. 54, OECD Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264085275-en>.
29. Rao, J.N.K. and A.J. Scott. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.
30. Christensen, E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.
31. Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11: 1485-1494.
32. Slob, W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

## ANNEXE 1 - DÉFINITIONS

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente Ligne directrice :

- La période de conditionnement est utilisée pour stabiliser le composante microbienne du sédiment et pour enlever p. ex. l'ammoniaque générées par les composants sédimentaires ; cela s'effectue avant d'ajouter la substance d'essai dans le sédiment.
- La période d'équilibration comprend le temps nécessaire pour le partage de la substance d'essai jusqu'à l'équilibre entre les phases aqueuse et sédimentaires.
- La période de stabilisation comprend le temps utilisé après le mélange de la substance d'essai jusqu'au partage de la substance d'essai entre la phase solide, l'eau des pores et l'eau sus-jacente ; cela se produit après l'introduction de la substance d'essai dans le système d'essai sédiment-eau, et idéalement dans les conditions d'exposition (p. ex. la température et l'aération).
- Le sédiment reconstitué, ou artificiel ou synthétique, désigne le mélange de matériaux utilisés pour reproduire au mieux les composants physiques d'un sédiment naturel.
- La croissance : augmentation du poids sec des organismes d'essai pendant l'essai et exprimée en moyenne de poids sec par chironome survivant.
- L'eau sus-jacente est l'eau surmontant le sédiment dans le récipient expérimental.
- L'eau des pores, se réfère à l'eau qui occupe les vides laissés entre le sédiment et les particules de sol.
- Le sédiment chargé est un sédiment auquel on a ajouté la substance d'essai.

## ANNEXE 2 - RECOMMANDATIONS POUR LA CULTURE DE CHIRONOMUS RIPARIUS

1. Les larves de Chironomus peuvent être élevées dans des cristallisoirs ou de grands récipients. Du sable quartzique fin est déposé en couche mince (environ 5 à 10 mm d'épaisseur) sur le fond du récipient. Le Kieselguhr (par exemple l'Art. 8117 de Merck) convient aussi comme substrat (une couche encore plus mince de quelques millimètres à peine suffit). Une eau de qualité appropriée, profonde de plusieurs centimètres, vient ensuite recouvrir le substrat. En cas d'évaporation, le niveau d'eau doit toujours être ramené à sa hauteur initiale, afin de prévenir toute dessiccation. L'eau peut être remplacée, si nécessaire. Une légère aération est fournie. Les récipients d'élevage des larves doivent être placés dans des cages appropriées, afin d'empêcher la fuite des adultes émergeant. La cage sera suffisamment grande pour permettre aux adultes émergés d'essaimer, sans quoi la copulation risque de ne pas avoir lieu (dimensions minimales : 30 x 30 x 30 cm).

2. Les cages doivent être gardées à température ambiante, ou à  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  si elles sont placées dans une chambre à ambiance constante, avec une photopériode de 16 heures de lumière (intensité : environ 1 000 lux) et 8 heures d'obscurité. Une humidité relative de l'air inférieure à 60% pourrait empêcher la reproduction.

### **Eau de dilution**

3. Toute eau naturelle ou reconstituée appropriée peut être utilisée. L'eau d'un puits, de l'eau du robinet déchlorée et un milieu artificiel (Elendt «M4» ou «M7», voir ci-après) sont souvent utilisés. L'eau doit être aérée avant l'emploi. Si nécessaire, on peut renouveler l'eau de culture en versant ou en siphonnant soigneusement l'eau usée des récipients expérimentaux, sans détruire les tubes des larves.

### **Alimentation des larves**

4. Les larves de Chironomus reçoivent des paillettes pour poissons (Tetra Min®, Tetra Phyll® ou une autre marque déposée équivalente), à raison d'environ 250 mg par récipient et par jour. Cette nourriture peut être administrée sous la forme d'une poudre moulue à sec ou d'une suspension dans l'eau : 1,0 g de paillettes ajoutées à 20 ml d'eau de dilution et agitées de façon à obtenir un mélange homogène. Cette préparation peut être administrée à raison d'environ 5 ml par récipient et par jour (agiter avant emploi). Les larves plus âgées peuvent en recevoir plus.

5. La nourriture est ajustée en fonction de la qualité de l'eau. Si le milieu de culture devient trouble, il convient de réduire la ration. Les quantités de nourriture données sont soigneusement notées. Un manque de nourriture fera émigrer les larves vers la colonne d'eau, tandis qu'un excès de nourriture intensifiera l'activité microbienne et abaissera la concentration d'oxygène. Ces deux conditions sont susceptibles de ralentir la croissance des organismes.

6. Certaines cellules d'algues vertes (*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) peuvent aussi être ajoutées lors de la préparation de nouveaux récipients de culture.

**Alimentation des adultes émergeant**

7. Certains expérimentateurs ont suggéré de nourrir les adultes émergés au moyen d'un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucrose saturée.

**Émergence**

8. À  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , les adultes commencent à émerger des récipients d'élevage des larves après environ 13 à 15 jours. Il est facile de distinguer les mâles d'après leurs antennes plumeuses.

**Amas d'oeufs**

9. Dès que des adultes sont présents dans la cage d'élevage, il faut vérifier trois fois par semaine, dans tous les récipients d'élevage de larves, si des amas d'oeufs gélatineux n'ont pas été déposés. Le cas échéant, les amas d'oeufs doivent être soigneusement enlevés et transférés dans un petit récipient contenant un échantillon de l'eau d'élevage. Les amas d'oeufs sont utilisés pour préparer un nouveau récipient de culture (2 à 4 amas d'oeufs par récipient, par exemple) ou pratiquer des essais de toxicité.

10. Les larves au premier stade devraient éclore après 2-3 jours.

**Préparation de nouveaux récipients de culture**

11. Une fois que les cultures ont été lancées, il devrait être possible de préparer un nouveau récipient de culture de larves, une fois par semaine ou moins souvent, suivant les besoins de l'essai, et de retirer les récipients plus anciens après que les moucheron adultes ont émergé. Ce système permet d'obtenir régulièrement un contingent d'adultes, avec une organisation minimale.

**Préparation des solutions d'essai «M4» et «M7»**

12. Elendt (1990) a décrit le milieu «M4». Le milieu «M7» est préparé comme le milieu «M4», sauf pour les substances reprises au tableau 1, dont les concentrations sont quatre fois plus faibles dans le milieu «M7» que dans le milieu «M4». Une publication sur le milieu «M7» est en préparation (Elendt, communication personnelle). La solution d'essai ne doit pas être préparée selon les instructions d'Elendt et Bias (1990), car les concentrations de  $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  indiquées pour la préparation des solutions mères ne conviennent pas.

**Préparation du milieu «M7»**

13. Chaque solution mère (I) est préparée séparément et une solution mère combinée (II) est préparée à partir de ces solutions mères (I) (voir tableau 1). Cinquante millilitres de la solution mère combinée (II) additionnés de la quantité de chaque solution mère de macronutriments indiquée au tableau 2 sont amenés à 1 litre avec de l'eau désionisée pour composer le milieu «M7». On prépare une solution mère de vitamines en ajoutant trois vitamines à de l'eau désionisée, comme indiqué au tableau 3 et on verse 0,1 ml de la solution mère combinée de vitamines au

milieu «M7» final, peu avant l'emploi (la solution mère de vitamines est stockée congelée par petites aliquotes). Le milieu est aéré et stabilisé.

### Référence

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius* : Development and validation of a new test system. M. Strelke et H. Köpp, Berlin 1995.

**Tableau 1 : Solutions mères d'éléments en traces pour les milieux M4 et M7**

Solutions mères (I)	Quantité (mg) pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée	Pour préparer la solution mère combinée (II) : mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions mères (I) et compléter à un litre avec de l'eau désionisée		Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> <sup>(1)</sup>	57190	1,0	0,25	2,86	0,715
MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	7210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl <sup>(1)</sup>	6120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl <sup>(1)</sup>	1420	1,0	0,25	0,071	0,018
SrCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	3040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr <sup>(1)</sup>	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	1260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl <sub>2</sub>	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O <sup>(1)(2)</sup>	5000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O <sup>(1)(2)</sup>	1991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Ces substances sont dosées différemment dans M4 et M7, comme indiqué plus haut

(2) Ces solutions sont préparées séparément, puis mélangées et autoclavées immédiatement après

Tableau 2 : Solutions mères de macronutriments pour les milieux M4 et M7

	Quantité pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantités de solutions mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions expérimentales M4 et M7 (mg/l)
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	293800	1,0	293,8
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	246600	0,5	123,3
KCl	58000	0,1	5,8
NaHCO <sub>3</sub>	64800	1,0	64,8
NaSiO <sub>3</sub> •9H <sub>2</sub> O	50000	0,2	10,0
NaNO <sub>3</sub>	2740	0,1	0,274
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1430	0,1	0,143
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1840	0,1	0,184

**Tableau 3 : Solution mère de vitamines pour les milieux M4 et M7**

Les trois solutions de vitamines sont mélangées de façon à ne former qu'une solution mère de vitamines

	Quantité pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantités de solutions mères de vitamines ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions d'essai M4 et M7 (mg/l)
Hydrochlorure de thiamine	750	0,1	0,075
Cyanocobalamine (B12)	10	0,1	0,0010
Biotine	7,5	0,1	0,00075

## Références

Elendt, B.P. (1990) : Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154, 25-23  
 Elendt B.P. & W.-R. Bias (1990) : Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. Magna*. *Water Research* 24(9), 1157-1167.

## ANNEXE 3 - PRÉPARATION DU SÉDIMENT RECONSTITUÉ

### Composition du sédiment

Le sédiment sera reconstitué comme suit :

Ingrédient	Caractéristiques	% du sédiment poids sec
Tourbe	Tourbe à sphaigne, pH aussi proche que possible de 5,5-6,0, pas de résidus de plantes visibles, finement broyée, particules (:S 1 mm) et séchée à l'air	4-5
Sable quartzique	dimension des particules :>50% des particules doivent mesurer entre 50 et 200 µm	75-76
Argile kaolinique	taux de kaolinite 2 30%	20
Carbone organique	Ajusté par addition de tourbe et de sable	2 (±0,5)
Carbonate de calcium	CaCO <sub>3</sub> , pulvérisé, chimiquement pur	0,05-0,1
Eau	Conductivité :S 10µS/cm	30-50

### Préparation

1. La tourbe est séchée à l'air et broyée en poudre fine. Une suspension de la quantité requise de poudre de tourbe dans de l'eau désionisée est préparée à l'aide d'un homogénéisateur à haute performance. Le pH de cette suspension est ajusté à  $5,5 \pm 0,5$  avec du CaCO<sub>3</sub>. On conditionne la suspension pendant au moins deux jours en l'agitant doucement à  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , afin de stabiliser le pH et d'établir une flore microbienne stable. On vérifie le pH, il devrait atteindre  $6,0 \pm 0,5$ . Ensuite la suspension de tourbe est mélangée avec les autres ingrédients (sable et argile kaolinique) et de l'eau désionisée pour former un sédiment homogène avec une teneur en eau de 30 à 50% du poids sec du sédiment. Le pH du mélange final est à nouveau mesuré et ajusté à 6,5 à 7,5 avec du CaCO<sub>3</sub>, si nécessaire. On prélève des échantillons de sédiment afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Ensuite, avant d'utiliser le sédiment reconstitué dans l'essai de toxicité sur les chironomes, il est recommandé de le conditionner durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui régneront durant l'essai subséquent.

## Stockage

2. Les ingrédients secs destinés à la préparation du sédiment artificiel peuvent être entreposés dans un endroit sec et frais, à température ambiante. Le sédiment reconstitué (humide) ne doit pas être stocké avant son utilisation dans l'essai. Il doit être utilisé immédiatement après la période de conditionnement de sept jours qui achève sa préparation.

## Références

- Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : Essai<sup>o</sup> 207 : Ver de terre, Essais de toxicité aiguë (1984). <https://doi.org/10.1787/9789264070042-en>
- Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R. et Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (*Oligochaeta*) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety*, 39, 10–20.

## ANNEXE 4 - CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

SUBSTANCE	CONCENTRATIONS
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Dureté en CaCO <sub>3</sub>	< 400 mg/l*
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Totalité des pesticides organophosphorés	< 50 ng/l**
Totalité des pesticides organochlorés et des biphényles polychlorés	< 50 ng/l**
Chlore organique total	< 25 ng/l**

\*S'il risque d'y avoir une interaction entre les ions qui provoquent la dureté de l'eau et la substance d'essai, il convient d'utiliser une eau moins dure (auquel cas, le milieu Elendt M4 ne pourra pas être utilisé).

\*\* Noter que cette caractéristique s'applique uniquement dans le cas où l'eau du robinet ou une eau de source est utilisée.

## ANNEXE 5– CALCUL DU BILAN MASSIQUE LORS D’ESSAIS DE TOXICITÉ DANS UN SYSTÈME EXPÉRIMENTAL SÉDIMENT-EAU ; EXEMPLE D’ESSAI AVEC EAU CHARGÉE SUR *CHIRONOMUS* SP.

1. Lorsqu’on réalise une étude sur des organismes vivant dans les sédiments au moyen d’un système expérimental sédiment-eau avec sédiment chargé (p. ex., LD 218 de l’OCDE) ou eau chargée (p. ex., LD 219 de l’OCDE), le calcul du bilan massique commence par la mesure des concentrations du produit chimique d’essai dans le système d’essai ; on tient compte des concentrations observées au début et à la fin de l’étude, ainsi que de toute autre concentration intermédiaire disponible.

1. La présente annexe explique comment calculer le bilan massique dans les études réalisées sur des organismes vivant dans les sédiments avec de l’eau chargée (LD 219 de l’OCDE), en donnant l’exemple d’un produit chimique instable dans l’eau (p. ex., un pesticide).

2. Le calcul du bilan massique nécessite une détermination analytique du produit chimique : les informations correspondantes sont fournies dans le tableau 1. Dans cet exemple, les mesures ont été réalisées à trois points temporels (1 h, 7 j et 28 j). Par souci de simplicité, seules les valeurs obtenues aux concentrations la plus basse et la plus haute de l’essai sont indiquées. Cependant, il est recommandé de réaliser des mesures à d’autres concentrations d’essai, en particulier lorsque les produits chimiques sont difficiles à tester (lorsque les concentrations ne sont pas stables dans le système d’essai, par exemple).

3. Le système d’essai de l’exemple ici fourni comprend 0.1 kg de sédiment et 400 mL d’eau sus-jacente ; l’hypothèse est que le volume d’eau interstitielle est de 10 mL. À partir de cette information, il est possible de calculer la quantité de produit chimique répartie dans les différents compartiments en multipliant la concentration par le volume/la quantité d’eau/de sédiment et de calculer le pourcentage présent dans chaque compartiment par rapport à la quantité initialement contenue dans le sédiment chargé.

4. Afin de connaître le devenir du produit chimique d’essai dans le système sédiment-eau, on a effectué le calcul du bilan massique pour chaque point temporel pour lequel on disposait de mesures (voir tableau 2B).

Exemple de produit chimique d'essai instable dans l'eau

**Tableau 1 :** Concentrations mesurées de produit chimique d'essai dans les différents compartiments lors d'une étude avec eau chargée sur *Chironomus riparius* réalisée conformément à la LD 219 de l'OCDE.

Concentrations mesurées-(mg s.a./kg sédiment sec ou µg s.a./L)									
	0 jour (début de l'exposition)			7 jours			28 jours		
Nominale (µg s.a./L)	Eau sus-jacente (µg s.a./L)	Eau interstitielle (µg s.a./L)	Sédiment (µg s.a./kg)	Eau sus-jacente (µg s.a./L)	Eau interstitielle (µg s.a./L)	Sédiment (µg s.a./kg)	Eau sus-jacente (µg s.a./L)	Eau interstitielle (µg s.a./L)	Sédiment (µg s.a./kg)
Témoin	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
1.5	0.91	0.08	1.5	0.23	0.02	1.3	0.04	0.01	1.3
10	6.6	0.2	8.2	1.9	0.1	8.1	0.45	0.01	7.3

s.a. : substance active (produit chimique d'essai) ; LQ : limite de quantification

**Tableau 2 :** Exemple de calcul du bilan massique du produit chimique d'essai. La quantité présente dans les deux compartiments – sédiment et eau (sus-jacente) – est exprimée en valeur absolue (tableau 2A) et en pourcentage (tableau 2B) de produit chimique d'essai par rapport à la quantité initialement contenue dans le système (mesurée dans l'eau et dans le sédiment).

Tableau 2A.

Quantité (µg) calculée à partir des concentrations mesurées									
	0 jour (début de l'exposition)			7 jours			28 jours		
Nominale (µg)	Eau sus-jacente (µg)*	Eau interstitielle (µg)*	Sédiment (µg)*	Eau sus-jacente (µg)	Eau interstitielle (µg)	Sédiment (µg)	Eau sus-jacente (µg)	Eau interstitielle (µg)	Sédiment (µg)
Témoin	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
1.5	0.364	0.0008	0.15	0.092	0.0002	0.13	0.016	0.0001	0.13
10	2.64	0.002	0.82	0.76	0.001	0.81	0.18	0.0001	0.73

Calculée en partant du principe qu'on dispose de \*100 g de sédiment, 400 mL d'eau sus-jacente et 10 mL d'eau interstitielle

Tableau 2B

Bilan massique									
	0 jour (début de l'exposition)			7 jours			28 jours		
Nominal (µg)	Eau sus-jacente (%)	Eau interstitielle (%)	Sédiment (%)	Eau sus-jacente (%)	Eau interstitielle (%)	Sédiment (%)	Eau sus-jacente (%)	Eau interstitielle (%)	Sédiment (%)
Témoin	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
1.5	70.707	0.156	29.138	17.871	0.039	25.253	3.108	0.019	25.253
10	76.256	0.058	23.686	21.953	0.029	23.397	5.199	0.003	21.086

5. Dans cet exemple, jusqu'à 29.1 % du produit chimique d'essai se retrouve dans le sédiment après 1 h ; à la fin de l'étude (après 28 j), jusqu'à 25.2 % de la quantité initialement mesurée est toujours présente dans le sédiment.

6. Pour ce qui est du compartiment aqueux, le produit chimique est principalement mesuré dans l'eau sus-jacente au cours de la première heure (c.-à-d., jusqu'à 76.2 % du produit chimique est présent dans ce compartiment). À la fin de l'étude, le produit chimique d'essai est seulement présent dans l'eau à hauteur d'environ 5.2 % maximum de la quantité initialement mesurée.

7. Pendant cet essai, un double phénomène de transfert dans le sédiment et de dégradation se produit ; la quantité totale de produit chimique d'essai dans le système de l'étude représente jusqu'à environ 27 % de la quantité totale initialement mesurée.

8. Dans de telles circonstances, puisque la différence entre les concentrations mesurées dans l'eau au début et à la fin de l'essai dépasse 20 %, il est nécessaire d'exprimer les effets mesurés en fonction de la concentration mesurée moyenne (on utilisera de préférence la moyenne arithmétique pondérée dans le temps plutôt que la moyenne géométrique des concentrations mesurées, car les intervalles de temps sont de différentes durées). Il est également fortement recommandé d'analyser toutes les concentrations d'essai ainsi que toute mesure intermédiaire supplémentaire. De plus, il convient de présenter les principaux effets mesurés en fonction de la concentration en mg de produit chimique d'essai par litre d'eau et en fonction de la concentration en mg de produit chimique d'essai par kg de sédiment sec. Cela permet de tenir compte des deux modes d'exposition des organismes vivant dans les sédiments, à savoir via l'eau et via le sédiment.

9. Voir aussi l'appendice G du document de l'EFSA (2019).

## Bibliographie

- EFSA (2019). Pesticide Peer Review meeting on general recurring issues in ecotoxicology (EFSA Supporting publication 2019:EN-1673)