

E 4435

ASSEMBLÉE NATIONALE

TREIZIÈME LÉGISLATURE

SÉNAT

SESSION ORDINAIRE DE 2008-2009

Reçu à la Présidence de l'Assemblée nationale
le 24 avril 2009

Enregistré au Sénat le 24 avril 2009

TEXTE SOUMIS EN APPLICATION DE L'ARTICLE 88-4 DE LA CONSTITUTION

PAR LE GOUVERNEMENT,

À L'ASSEMBLÉE NATIONALE ET AU SÉNAT.

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



**CONSEIL DE
L'UNION EUROPÉENNE**

**Bruxelles, le 13 mars 2009
(OR. en)**

**7551/09
ADD 1**

LIMITE

**COMPET 146
ENV 197
CHIMIE 26
MI 104
ENT 53**

NOTE DE TRANSMISSION

Origine: Commission européenne

Date de réception: 11 mars 2009

Destinataire: Monsieur Javier SOLANA, Secrétaire général/Haut Représentant

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

Les délégations trouveront ci-joint le document de la Commission - D003777/02.

p.j.: D003777/02

Annexe I**A.4. PRESSION DE VAPEUR****1. MÉTHODE**

Cette méthode est équivalente à la ligne directrice TG 104 (2004) de l'OCDE.

1.1 INTRODUCTION

Cette version révisée de la méthode A.4(1) comprend une technique supplémentaire d'effusion par thermogravimétrie isotherme, conçue pour les substances à très faible pression de vapeur (jusqu'à 10^{-10} Pa). Compte tenu des besoins en méthodes, en particulier pour les substances à faible pression de vapeur, les autres protocoles de cette version sont réévalués en ce qui concerne les autres domaines d'application.

À l'équilibre thermodynamique, la pression de vapeur d'une substance pure ne dépend que de la température. Les principes fondamentaux sont énoncés dans les références (2) et (3).

Aucune méthode de mesure n'est applicable à toute la gamme de pressions de vapeur comprises entre moins de 10^{-10} Pa et 10^5 Pa. Le présent document présente huit méthodes applicables dans différentes gammes de pression de vapeur. Le tableau 1 compare ces différentes méthodes quant à leur application et à la gamme de mesure. Ces méthodes ne conviennent qu'aux substances qui ne se décomposent pas dans les conditions de l'essai. Il est également possible d'estimer la pression de vapeur lorsque les méthodes expérimentales ne peuvent être employées pour des raisons techniques ; une méthode d'estimation est recommandée dans l'Appendice.

1.2 DÉFINITIONS ET UNITÉS

La pression de vapeur d'une substance est définie comme la pression de saturation régnant au-dessus d'une substance solide ou liquide.

L'unité SI de pression à utiliser est le pascal (Pa). Les anciennes unités de pression se convertissent comme suit :

$$\begin{aligned} 1 \text{ Torr} &= 1 \text{ mm Hg} = 1,333 \times 10^2 \text{ Pa} \\ 1 \text{ atmosphère} &= 1,013 \times 10^5 \text{ Pa} \\ 1 \text{ bar} &= 10^5 \text{ Pa} \end{aligned}$$

L'unité SI de température est le kelvin (K). La conversion des degrés Celsius en kelvins obéit à la formule suivante :

$$T = t + 273,15$$

où T est la température thermodynamique exprimée en kelvins et t représente la température en degrés Celsius.

Tableau 1

Méthode de mesure	Substances		Répétabilité estimée	Reproductibilité estimée	Gamme recommandée
	Solide	Liquide			
Méthode dynamique	à bas point de fusion	oui	jusqu'à 25% 1 à 5%	jusqu'à 25% 1 à 5%	10^3 Pa à $2 \cdot 10^3$ Pa $2 \cdot 10^3$ Pa à 10^5 Pa
Méthode statique	oui	oui	5 à 10%	5 à 10%	0 Pa à 10^5 Pa 10^{-2} Pa à 10^5 Pa ¹
Méthode de l'isoténoscope	oui	oui	5 à 10%	5 à 10%	10^2 Pa à 10^5 Pa
Méthode d'effusion balance de pression de vapeur	oui	oui	5 à 20%	jusqu'à 50%	10^{-3} à 1 Pa
Méthode d'effusion cellule de Knudsen	oui	oui	10 à 30%	--	10^{-10} à 1 Pa
Méthode d'effusion thermogravimétrie isotherme	oui	oui	5 à 30%	jusqu'à 50%	10^{-10} à 1 Pa
Méthode par saturation des gaz	oui	oui	10 à 30%	jusqu'à 50%	10^{-10} à 10^3 Pa
Méthode de la jauge à rotor	oui	oui	10 à 20%	--	10^{-4} à 0,5 Pa

1.3 PRINCIPE DE L'ESSAI

En général, la pression de vapeur est déterminée à différentes températures. À l'intérieur d'un intervalle de température limité, le logarithme de la pression de vapeur d'une substance pure est une fonction linéaire de l'inverse de la température thermodynamique, suivant la forme simplifiée de l'équation de Clapeyron-Clausius :

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2,3RT} + \text{constante}$$

où :

p = pression de vapeur de la substance en pascals

ΔH_v = chaleur de vaporisation en J mol⁻¹

R = constante molaire des gaz parfaits = 8,314 J mol⁻¹K⁻¹

T = température exprimée en kelvins (K)

1.4 SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

Il n'est pas nécessaire de recourir à des substances de référence. Elles servent surtout à vérifier la fiabilité d'une méthode de temps à autre et à comparer les résultats obtenus par différentes méthodes.

¹ Lorsqu'on utilise un manomètre à capacitance

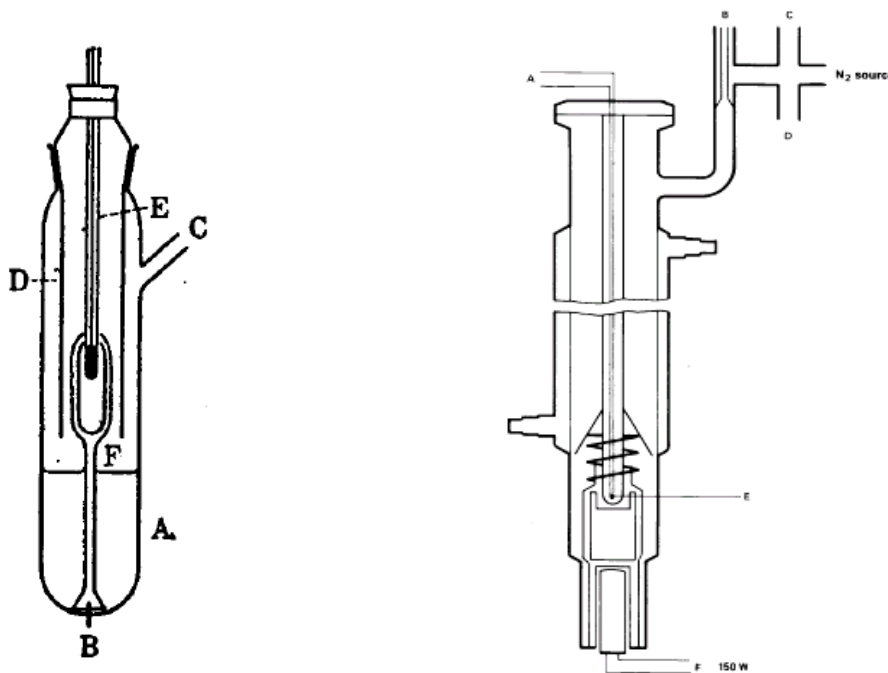
1.5 DESCRIPTION DES MÉTHODES

1.5.1 Méthode dynamique (méthode de Cottrell)

1.5.1.1 Principe

La pression de vapeur est déterminée par la mesure de la température d'ébullition de la substance à différentes pressions prédéfinies, comprises approximativement entre 10^3 et 10^5 Pa. Cette méthode est aussi recommandée pour la détermination du point d'ébullition et peut être utilisée à cette fin jusqu'à 600K. En raison de la pression hydrostatique de la colonne de liquide, les températures d'ébullition des liquides sont environ $0,1\text{ }^\circ\text{C}$ plus élevées à une profondeur de 3 à 4 cm qu'à la surface. Dans la méthode de Cottrell (4), le thermomètre est placé dans la vapeur située au-dessus de la surface du liquide et le dispositif de pompage est conçu pour que le liquide en ébullition mouille constamment le réservoir du thermomètre. Une fine couche de liquide en équilibre avec la vapeur à la pression atmosphérique recouvre le réservoir. Le thermomètre affiche donc le point d'ébullition réel, sans être affecté par la surchauffe ou la pression hydrostatique. La pompe employée à l'origine par Cottrell est représentée à la figure 1. Le tube A contient le liquide en ébullition. Un fil de platine B scellé au fond favorise l'uniformité de l'ébullition. Le tube latéral C est relié à un condenseur et l'enveloppe D empêche le condensat froid d'atteindre le thermomètre E. Lorsque le liquide présent dans le tube A bout, des bulles et du liquide captés par l'entonnoir sont envoyés sur le réservoir du thermomètre par les deux branches de la pompe F.

Figure 1
Figure 2



Pompe de Cottrell (4)

A: Thermocouple
B: Volume vide tampon
C: Jauge de pression
D: Vide
E: Point de mesure
F: Élément chauffant (puissance environ 150 W)

1.5.1.2 *Appareillage*

Un appareil de grande précision, faisant appel au principe de Cottrell est schématisé à la figure 2. Il se compose d'un tube dont la partie inférieure est dévolue à l'ébullition, équipé d'un réfrigérant dans sa partie médiane, ainsi que d'un orifice d'évacuation et d'un joint plat rodé dans sa partie supérieure. La pompe de Cottrell est montée dans la partie où siège l'ébullition, partie chauffée par une cartouche électrique. La température est mesurée au moyen d'un thermocouple à enveloppe ou d'un thermomètre à résistance, introduits dans le joint plat situé dans la partie supérieure. L'orifice d'évacuation est relié au système de régulation de la pression. Ce dernier se compose d'une pompe à vide, d'un volume tampon, d'un manostat qui régule la pression en modulant l'arrivée d'azote et d'un manomètre.

1.5.1.3 *Mode opératoire*

La substance est introduite dans la partie où a lieu l'ébullition. Les solides non pulvérulents peuvent poser des problèmes qui sont parfois résolus en chauffant la gaine de refroidissement. L'appareil est fermé avec le joint plat et la substance est dégazée. Cette méthode ne convient pas aux substances moussantes.

La plus basse des pressions souhaitées est alors établie et le chauffage est mis en marche ; au même moment, le capteur de température est connecté à un enregistreur.

L'équilibre est atteint lorsque la température d'ébullition enregistrée demeure constante à pression constante. Il faut prendre particulièrement soin d'éviter les soubresauts pendant l'ébullition. En outre, la condensation sur le réfrigérant doit être complète. Lorsqu'on détermine la pression de vapeur de solides à bas point de fusion, il faut veiller à ce que le condenseur ne s'obstrue pas.

Ce point d'équilibre étant enregistré, on règle la pression sur une valeur plus élevée. Le processus se poursuit de la même manière jusqu'à ce qu'une pression de 10^5 Pa soit atteinte (environ 5 à 10 points de mesure au total). Les mesures seront répétées, à titre de vérification, avec des pressions décroissantes.

1.5.2 **Méthode statique**

1.5.2.1 *Principe*

Dans la méthode statique (5), la pression de vapeur à l'équilibre thermodynamique est déterminée à une température spécifiée. Cette méthode convient pour des substances et des mélanges liquides ou solides, dans la gamme comprise entre 10^{-1} et 10^5 Pa et, avec certaines précautions, dans la gamme de 1 à 10 Pa.

1.5.2.2 *Appareillage*

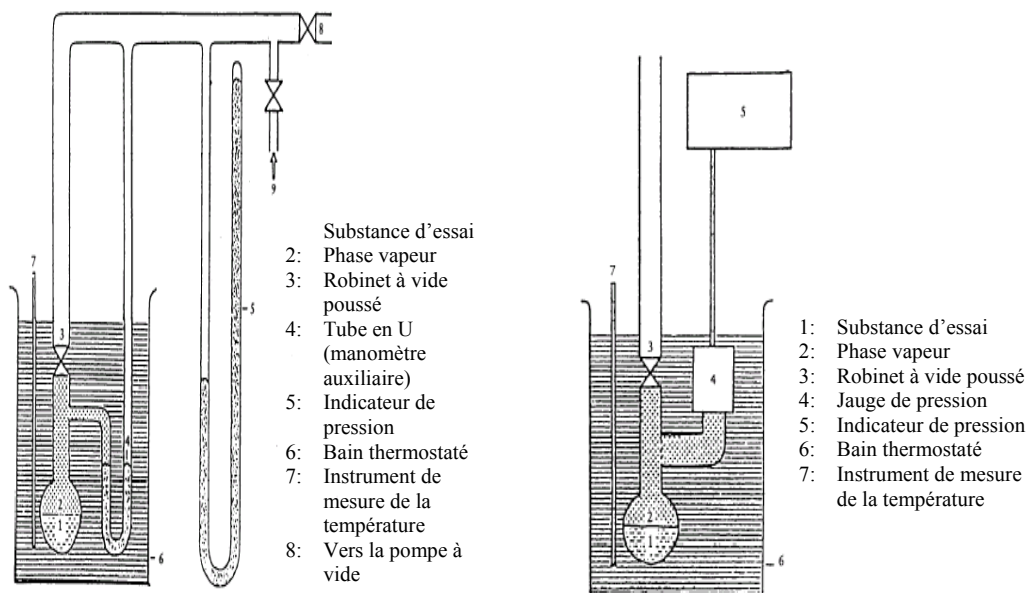
Le dispositif comporte un bain à température constante (précision de $\pm 0,2$ K), un récipient pour l'échantillon relié à une ligne de vide, un manomètre et un système de régulation de la pression. Le récipient contenant l'échantillon (figure 3a) est connecté à la ligne de vide par l'intermédiaire d'un robinet et d'un manomètre différentiel (tube en U rempli d'un liquide manométrique approprié) qui sert à indiquer le zéro. Comme liquide manométrique, on utilise du mercure, des silicones et des phtalates, suivant la gamme de pression et le comportement chimique de la substance d'essai. Toutefois, l'utilisation du mercure est à éviter autant que possible pour ne pas nuire à l'environnement. La substance d'essai ne doit pas réagir avec le fluide du tube en U ni s'y dissoudre notablement. Le tube en U peut être remplacé par une jauge de pression (figure 3b). Pour le manomètre, le mercure peut être utilisé dans la gamme comprise entre la pression normale et 10^2 Pa, tandis que les huiles de silicone et les phtalates conviennent aux pressions inférieures à 10^2 Pa et jusqu'à 10 Pa. D'autres jauges de pression sont utilisables en dessous de 10^2 Pa et les manomètres à

membrane chauffable peuvent même être employés en dessous de 10^{-1} Pa. La température est mesurée sur la paroi extérieure du récipient contenant l'échantillon ou dans le récipient lui-même.

1.5.2.3 Mode opératoire

Le tube en U de l'appareil décrit à la figure 3a est rempli avec le liquide choisi, qui doit être dégazé à haute température avant que les mesures soient commencées. La substance d'essai est introduite dans l'appareil et dégazée à température réduite. Dans le cas d'un échantillon à plusieurs composants, la température doit être suffisamment basse pour ne pas altérer la composition du mélange. Une agitation permettra d'atteindre l'équilibre plus rapidement. L'échantillon peut être refroidi avec de l'azote liquide ou de la neige carbonique, mais il convient d'éviter soigneusement la condensation de l'air ou du fluide de la pompe. On ouvre le robinet à vide au-dessus du récipient contenant l'échantillon afin de pratiquer une aspiration pendant plusieurs minutes pour éliminer l'air. Si nécessaire, le dégazage est répété plusieurs fois.

Figure 3a
Figure 3b



Lorsque l'échantillon est chauffé avec le robinet à vide fermé, la pression de vapeur augmente, ce qui modifie l'équilibre du fluide dans le tube en U. On compense ce changement en injectant de l'azote ou de l'air dans l'appareil jusqu'à ce que le manomètre différentiel indique à nouveau zéro. La pression requise à cet effet peut être lue sur le manomètre ou déterminée à l'aide d'un instrument plus précis. Cette pression correspond à la pression de vapeur de la substance à la température de la mesure. L'appareil représenté sur la figure 3b permet une lecture directe de la pression de vapeur.

La pression de vapeur est déterminée à des intervalles de température rapprochés et judicieusement choisis (environ 5 à 10 points de mesure au total), jusqu'à la température maximale désirée.

Les mesures effectuées aux basses températures doivent être répétées à titre de vérification. Si les valeurs des mesures répétées ne coïncident pas avec la courbe obtenue en augmentant la température, cela peut traduire l'un des cas de figure suivants :

- i) l'échantillon renferme encore de l'air (dans le cas de substances très visqueuses, par exemple) ou des substances à bas point d'ébullition qui sont libérés durant le chauffage ;
- ii) la substance subit une réaction chimique dans l'intervalle de température étudié (décomposition, polymérisation, par exemple).

1.5.3 **Méthode de l'isoténiscope**

1.5.3.1 *Principe*

L'isoténiscope (6) est fondé sur le principe de la méthode statique. Un échantillon est introduit dans une ampoule maintenue à température constante et reliée à un manomètre et à une pompe à vide. Les impuretés plus volatiles que la substance sont éliminées par dégazage à pression réduite. À des températures sélectionnées, la pression de vapeur de l'échantillon est équilibrée par la pression connue d'un gaz inerte. L'isoténiscope a été conçu pour mesurer la pression de vapeur de certains hydrocarbures liquides, mais il se prête aussi à l'étude des solides. En général, cette méthode ne convient pas pour des systèmes à plusieurs composants. Les résultats ne sont affectés que par de légères erreurs lorsque l'échantillon renferme des impuretés non volatiles. La gamme recommandée s'étend de 10^2 à 10^5 Pa.

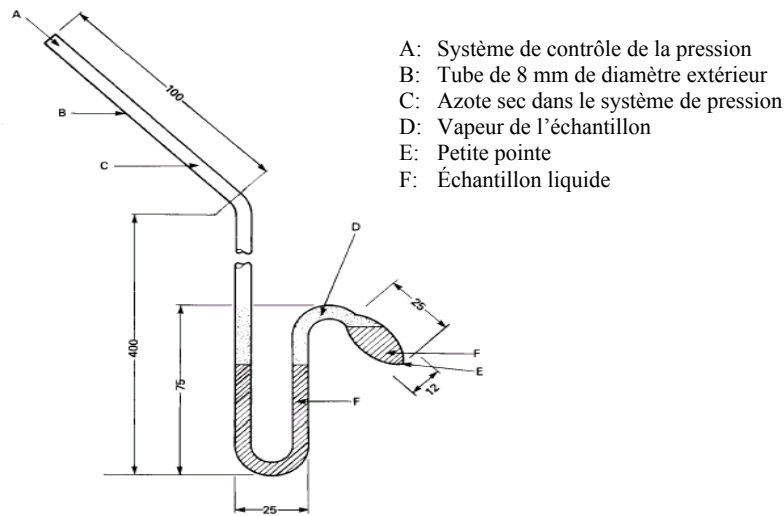
1.5.3.2 *Appareillage*

Un exemple de dispositif de mesure est donné à la figure 4. Pour la description complète, voir la norme ASTM D 2879-86 (6).

1.5.3.3 *Mode opératoire*

Dans le cas des liquides, la substance elle-même sert de fluide de remplissage dans le manomètre différentiel. Une quantité de liquide, suffisante pour remplir l'ampoule et la branche courte du manomètre, est introduite dans l'isoténiscope. Ce dernier est relié au système de vide, mis sous vide puis rempli d'azote. L'évacuation et la purge du système sont répétées deux fois pour chasser l'oxygène résiduel. L'isoténiscope rempli est placé en position horizontale pour permettre à l'échantillon de s'étendre en fine couche dans l'ampoule destinée à le contenir et dans le manomètre. La pression du système est réduite à 133 Pa et l'échantillon est chauffé doucement jusqu'à ce qu'il entre en ébullition (élimination des gaz dissous). La position de l'isoténiscope est ensuite modifiée de façon que l'échantillon retourne dans l'ampoule et remplisse la branche courte du manomètre. La pression est maintenue à 133 Pa. La pointe de l'ampoule à échantillon est chauffée par une petite flamme jusqu'à ce que la vapeur dégagée par l'échantillon prenne une extension suffisante pour déplacer une partie de l'échantillon de la partie supérieure de l'ampoule et de la branche courte du manomètre vers le manomètre, créant ainsi un espace dépourvu d'azote et rempli de vapeur. L'isoténiscope est ensuite placé dans un bain thermostaté et la pression de l'azote est ajustée de manière à égaler celle de l'échantillon. À l'équilibre, la pression de l'azote et la pression de vapeur de la substance ont la même valeur.

Figure 4



(Dimensions en mm)

Dans le cas des solides, et suivant la gamme de pression et de température, des liquides manométriques tels que des huiles de silicone ou des phtalates sont utilisés. Le liquide manométrique dégazé est introduit dans un renflement situé sur la branche longue de l'isoténiscope. Un échantillon du solide est alors déposé dans l'ampoule et subit un dégazage à température élevée. Après cela, l'isoténiscope est incliné, afin que le liquide manométrique puisse couler dans le tube en U.

1.5.4 Méthode d'effusion : balance de pression de vapeur (7)

1.5.4.1 Principe

Un échantillon de la substance d'essai est chauffé dans un petit fourneau, placé sous une cloche sous vide. Le fourneau est doté d'un couvercle percé de petits trous de diamètre connu. La vapeur de la substance, qui s'échappe par l'un des trous, est dirigée vers le plateau d'une balance très sensible qui se trouve également dans la cloche sous vide. Sur certains modèles d'appareil, le plateau de la balance est entouré par une enceinte de réfrigération, qui dissipe la chaleur vers l'extérieur par conduction thermique; la vapeur sortante se condense sur le plateau ainsi refroidi par radiation. L'impulsion du jet de vapeur exerce une force sur la balance. Il est possible de déterminer la pression de vapeur de deux manières : directement à partir de la force exercée sur le plateau de la balance ou à partir de la vitesse d'évaporation en utilisant l'équation de Herz-Knudsen (2) :

$$p = G \sqrt{\frac{2\pi RT \times 10^3}{M}}$$

où :

- G = vitesse d'évaporation ($\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-2}$)
 M = masse molaire (g mol^{-1})
 T = température (K)

R = constante molaire des gaz parfaits ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)

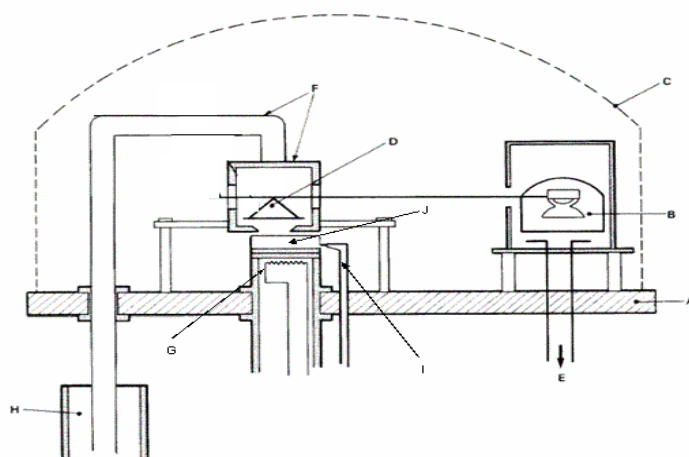
p = pression de vapeur (Pa)

La gamme de mesure recommandée est comprise entre 10^{-3} et 1 Pa.

1.5.4.2 Appareillage

Le principe général de l'appareil est illustré à la figure 5.

Figure 5



- | | |
|---------------------------------|--|
| A. Socle | F. Enceinte de réfrigération et barre de refroidissement |
| B. Instrument à bobine mobile | G. Fourneau d'évaporation |
| C. Cloche à vide | H. Vase de Dewar contenant de l'azote liquide |
| D. Balance avec plateau | I. Mesure de la température de l'échantillon |
| E. Instrument de mesure du vide | J. Substance d'essai |

1.5.5 Méthode d'effusion : cellule de Knudsen

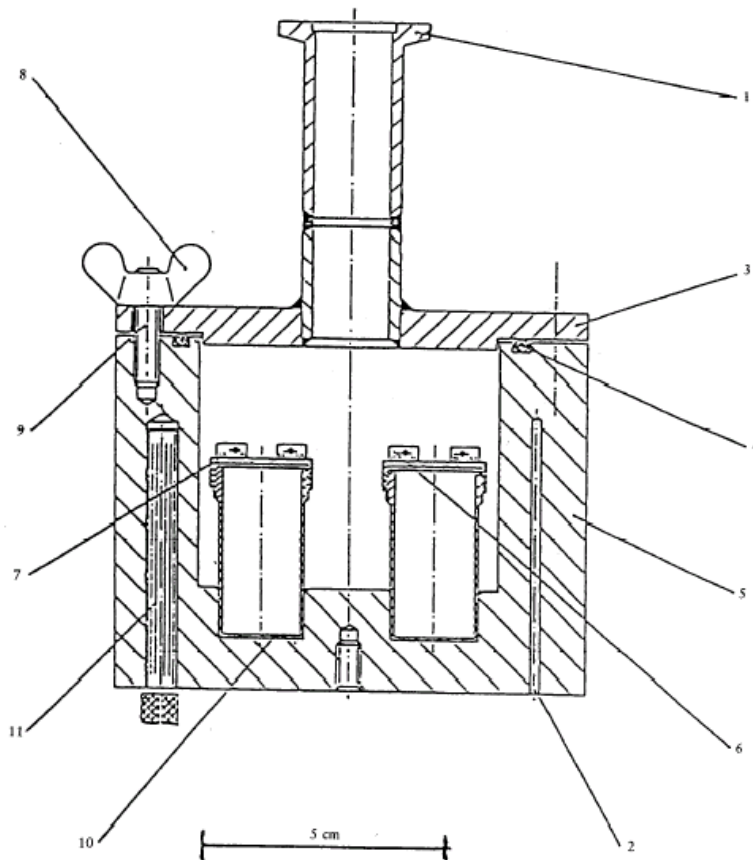
1.5.5.1 Principe

La méthode repose sur l'estimation de la masse de substance d'essai qui jaillit sous forme de vapeur par un micro-orifice d'une cellule de Knudsen (8) sous un vide très poussé, par unité de temps. La masse de vapeur dégagée par effusion s'obtient soit en déterminant la perte de masse de la cellule, soit en condensant la vapeur à basse température et en mesurant la quantité de substance volatilisée par chromatographie. La pression de vapeur se calcule par l'équation de Hertz-Knudsen (voir paragraphe 1.5.4.1) avec des facteurs de correction qui dépendent des paramètres de l'appareil (9). La gamme de pressions recommandée est comprise entre 10^{-10} et 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2 Appareillage

Le principe général de l'appareil est illustré à la figure 6.

Figure 6



- | | |
|---|---|
| 1: Vers la pompe à vide | 7: Couvercle fileté |
| 2: Puits pour le thermomètre à résistance de platine ou le système de mesure et de régulation de la température | 8: Écrous papillon |
| | 9: Boulons |
| | 10: Cellules à effusion en acier inoxydable |
| 3: Couvercle de la chambre à vide | 11: Cartouches chauffantes |
| 4: Joint torique | |
| 5: Chambre à vide en aluminium | |
| 6: Dispositif permettant d'installer et d'ôter les cellules à effusion | |

1.5.6 Méthode d'effusion : thermogravimétrie isotherme

1.5.6.1 Principe

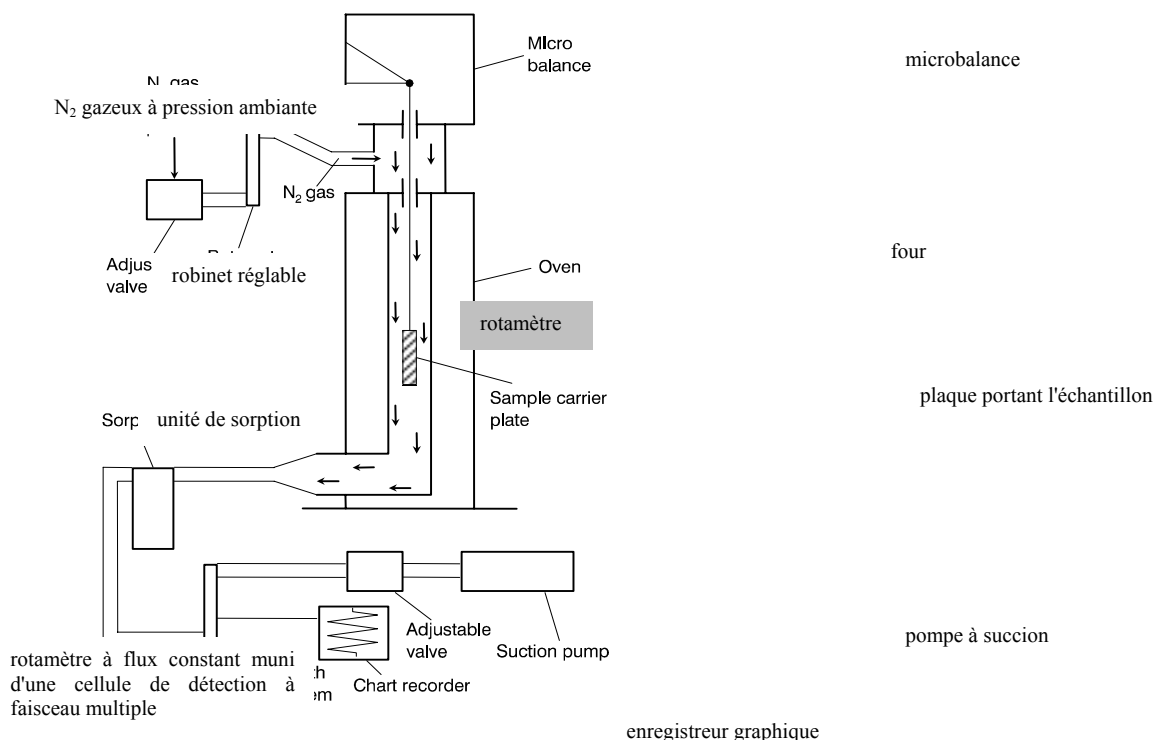
La méthode repose sur la détermination thermogravimétrique (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20), à hautes températures et à pression ambiante, de vitesses d'évaporation accélérée de la substance d'essai. Les vitesses d'évaporation v_T s'obtiennent en exposant la substance sélectionnée à l'atmosphère d'un gaz inerte s'écoulant lentement et en mesurant en continu la perte de poids à des températures isothermes T définies, exprimées en kelvins, durant des périodes de temps appropriées. Les pressions de vapeur p_T sont déduites des valeurs v_T à l'aide de la relation linéaire entre le logarithme de la pression de vapeur et le logarithme de la vitesse d'évaporation. Si nécessaire, les valeurs correspondant aux températures de 20 et 25 °C peuvent être extrapolées par la régression du $\log p_T$ en fonction de $1/T$. Cette

méthode convient aux substances ayant des pressions de vapeur aussi faibles que 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) et offrant un degré de pureté aussi proche que possible de 100 % de manière à ne pas fausser l'interprétation des pertes de poids mesurées.

1.5.6.2 Appareillage

Le principe général du montage expérimental est schématisé à la figure 7.

1.1.1.1. Figure 7



La plaque portant l'échantillon, suspendue à une microbalance et placée dans une enceinte thermostatée, est exposée à un flux d'azote sec qui emporte les molécules vaporisées de la substance d'essai. Au sortir de l'enceinte, le flux gazeux est purifié dans une unité de sorption.

1.5.6.3 Mode opératoire

La substance d'essai est étalée en une couche homogène sur la surface d'une plaque de verre dépoli. S'il s'agit d'un solide, la plaque est mouillée uniformément par une solution de la substance dans un solvant approprié et séchée sous atmosphère inerte. Pour les mesures, la plaque enduite est suspendue dans l'analyseur thermogravimétrique et sa perte de poids est ensuite mesurée en continu en fonction du temps.

La vitesse d'évaporation v_T à une température définie se calcule d'après la perte de poids Δm de la plaque portant l'échantillon selon la formule :

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t} \quad (\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1})$$

où F représente la superficie recouverte de substance d'essai, normalement la superficie de la plaque portant l'échantillon, et t est le temps écoulé durant la perte de poids Δm .

La pression de vapeur p_T est calculée en fonction de la vitesse d'évaporation v_T :

$$\text{Log } p_T = C + D \cdot \log v_T$$

où C et D sont des constantes propres au dispositif expérimental employé, qui dépendent du diamètre de l'enceinte de mesure et du débit du gaz. Ces constantes sont à déterminer une fois par la mesure d'une série de substances dont la pression de vapeur est connue et par la régression du $\log p_T$ en fonction de $\log v_T$ (11)(21)(22).

La relation entre la pression de vapeur p_T et la température T en kelvins est décrite ci-dessous :

$$\text{Log } p_T = A + B \cdot 1/T$$

où A et B représentent des constantes obtenues par la régression du $\log p_T$ en fonction de $1/T$. Avec cette équation, la pression de vapeur peut être calculée par extrapolation pour n'importe quelle autre température.

1.5.7 Méthode par saturation de gaz (23)

1.5.7.1 *Principe*

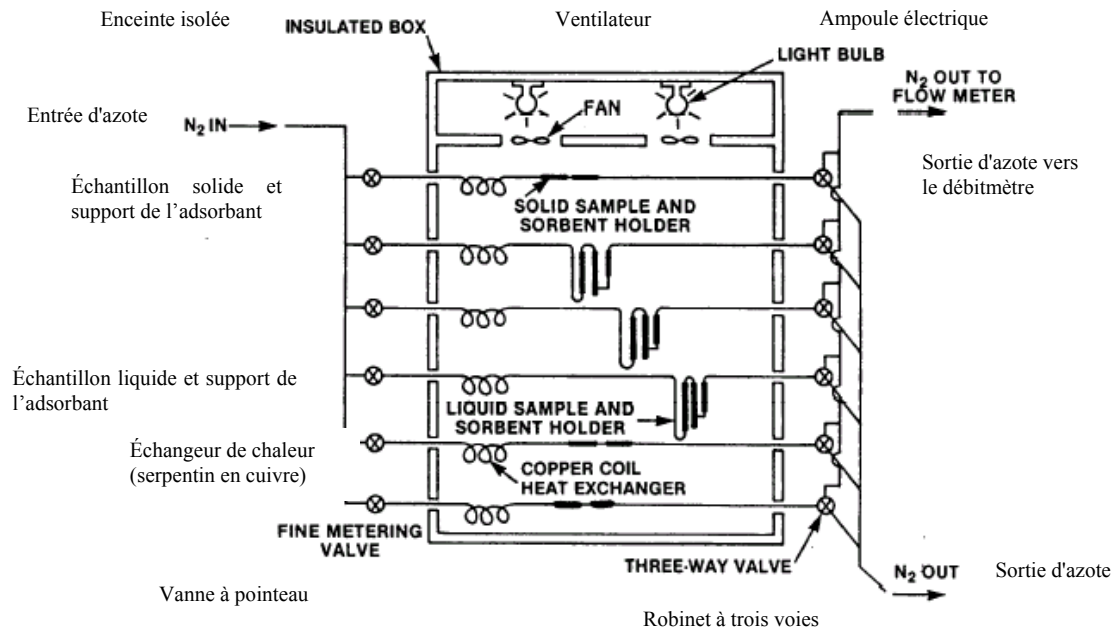
Un gaz inerte est envoyé à température ambiante et à un débit connu, à travers ou sur un échantillon de la substance d'essai, suffisamment lentement pour qu'il devienne saturé de vapeur. Il est extrêmement important de parvenir à la saturation de la phase gazeuse. La substance transportée est recueillie, généralement à l'aide d'un adsorbant, et sa quantité est déterminée. Au lieu de recueillir la vapeur pour une analyse ultérieure, il est possible de mesurer directement la quantité de substance transportée par des techniques analytiques, telles que la chromatographie en phase gazeuse. La pression de vapeur est calculée en supposant que la loi des gaz parfaits est respectée et que la pression totale d'un mélange de gaz est égale à la somme des pressions des gaz qui le composent. La pression partielle de la substance d'essai, autrement dit sa pression de vapeur, est calculée à partir du volume total connu du gaz et du poids de la substance transportée.

La méthode par saturation de gaz est applicable aux substances solides ou liquides. Cette méthode peut être utilisée jusqu'à des pressions de vapeur de 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14); elle est surtout fiable pour des pressions de vapeur inférieures à 10^3 Pa. Au dessus de 10^3 Pa, les pressions de vapeur sont généralement surestimées, probablement à cause de la formation d'aérosols. Comme la pression de vapeur est mesurée à température ambiante, il n'est pas nécessaire d'extrapoler les résultats à partir de mesures réalisées à hautes températures et l'on évite de ce fait les erreurs grossières fréquemment associées à ce type d'extrapolation.

1.5.7.2 *Appareillage*

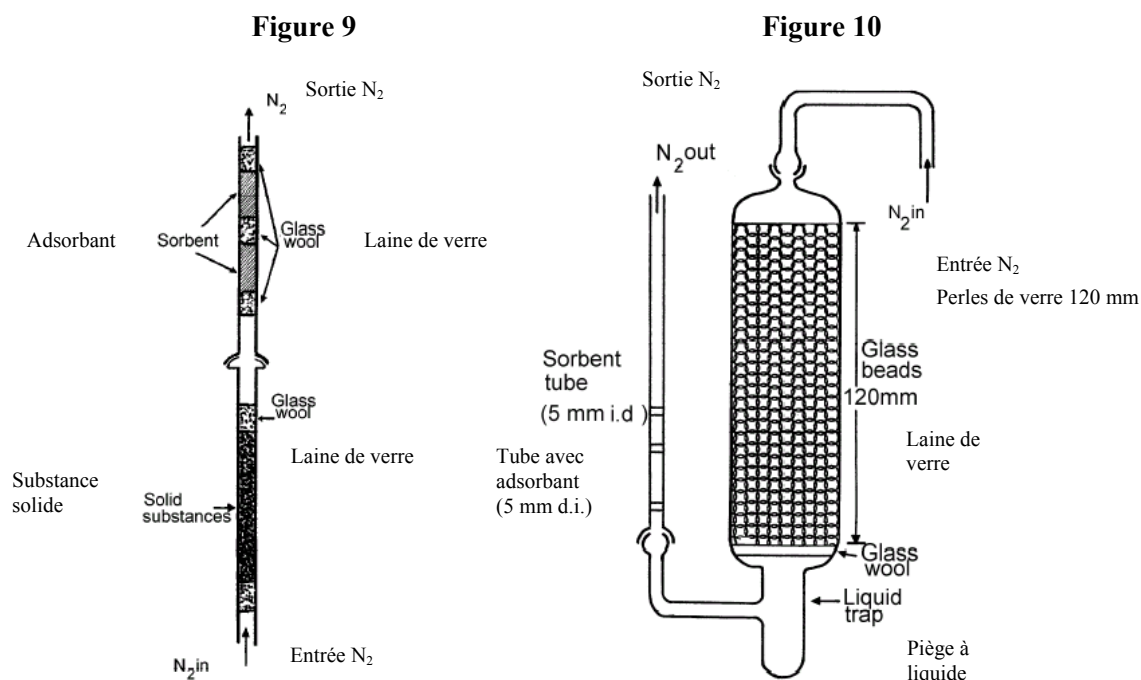
Cette méthode requiert une enceinte thermostatée. Le schéma de la figure 8 montre une enceinte comportant trois supports à échantillons solides et trois supports à échantillons liquides, qui permettent de réaliser, en trois exemplaires, l'analyse d'une substance solide ou liquide. La température est réglée avec une précision d'au moins $0,5$ °C.

Figure 8



L'azote convient dans la plupart des cas comme gaz porteur inerte, mais d'autres gaz doivent parfois être utilisés (24). Le gaz porteur doit être sec. Le courant gazeux est divisé en six courants, qui sont régulés par des vannes à pointeau (orifice d'environ 0,79 mm), et pénètre dans l'enceinte par des tubes en cuivre de 3,8 mm de diamètre intérieur. Une fois l'équilibre thermique atteint, le gaz passe à travers l'échantillon, puis sur l'adsorbant, et enfin sort de l'enceinte.

Les échantillons solides sont disposés dans des tubes en verre de 5 mm de diamètre intérieur, entre deux tampons de laine de verre (voir figure 9). La figure 10 montre un support à échantillon liquide et un système adsorbant. La méthode la plus reproductible pour mesurer la pression de vapeur des liquides consiste à remplir le support de perles de verre ou d'un adsorbant inerte tel que de la silice, que l'on recouvre de liquide. Une autre possibilité consiste à faire barboter le gaz porteur dans une colonne de la substance d'essai liquide à l'aide d'un verre fritté.



Le système adsorbant se compose d'une section avant et d'une section arrière. A de très faibles pressions de vapeur, l'adsorbant ne retient que de petites quantités et l'adsorption sur la laine de verre et sur le tube en verre, entre l'échantillon et l'adsorbant, peut représenter un sérieux problème.

Des pièges refroidis au CO₂ solide permettent aussi de recueillir efficacement la substance vaporisée. Ils n'affectent pas la perte de charge dans la colonne de saturation; de plus, il est facile d'isoler quantitativement la substance recueillie.

1.5.7.3 Mode opératoire

Le débit du gaz porteur sortant est mesuré à température ambiante. Pour s'assurer de la valeur exacte du volume total du gaz porteur, on vérifie fréquemment le débit au cours de l'expérience. Il est préférable de pratiquer un contrôle continu au moyen d'un débitmètre massique. La saturation de la phase gazeuse peut exiger un temps de contact considérable et, partant, des débits gazeux assez faibles (25).

A l'issue de l'expérience, les deux sections du système adsorbant, avant et arrière, sont analysées séparément. La substance retenue dans chaque section est désorbée par ajout d'un solvant. On analyse quantitativement les solutions ainsi obtenues afin de déterminer le poids de la substance désorbée dans chaque section. Le choix de la méthode analytique (ainsi que de l'adsorbant et du solvant désorbant) est dicté par la nature de la substance d'essai. On mesure l'efficacité de la désorption en fixant une quantité connue de la substance d'essai sur l'adsorbant, puis en la désorbant et en déterminant la quantité recueillie. Il importe de tester l'efficacité de la désorption en utilisant des concentrations proches de, ou égales à, celle de l'échantillon dans les conditions de l'essai.

Afin d'assurer la saturation du gaz porteur avec la substance d'essai, trois débits gazeux différents sont utilisés. Si la pression de vapeur calculée est indépendante du débit, on considère que le gaz est saturé.

La pression de vapeur est calculée d'après l'équation suivante :

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

où :

p	=	pression de vapeur (Pa)
W	=	masse de substance d'essai évaporée (g)
V	=	volume de gaz saturé (m ³)
R	=	constante molaire des gaz parfaits (8,314 J mol ⁻¹ K ⁻¹)
T	=	température (K)
M	=	masse molaire de la substance d'essai (g mol ⁻¹)

Les volumes mesurés doivent être corrigés pour tenir compte des différences de pression et de température entre le débitmètre et le saturateur.

1.5.8 Méthode de la jauge à rotor

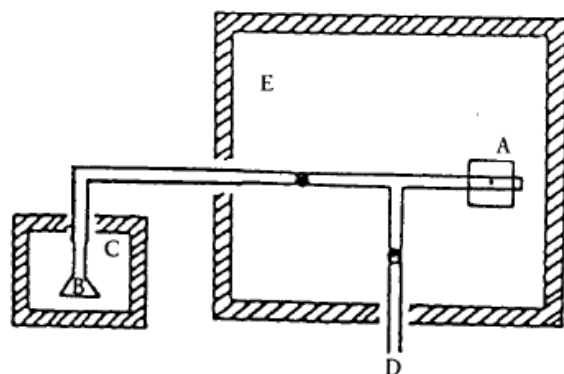
1.5.8.1 Principe

Cette méthode fait appel à une jauge de viscosité à rotor dans laquelle l'élément de mesure est une petite bille d'acier suspendue dans un champ magnétique et maintenue en rotation par des champs tournants (26)(27)(28). Des bobines capteuses permettent de mesurer sa vitesse de rotation. Lorsque la bille a atteint une vitesse de rotation donnée, généralement proche de 400 tours par seconde, on cesse de lui fournir de l'énergie et la friction du gaz provoque sa décélération. La diminution de la vitesse de rotation est mesurée en fonction du temps. La pression de vapeur est déduite du ralentissement de la bille d'acier, fonction de la pression. La gamme de mesure recommandée est comprise entre 10⁻⁴ et 0,5 Pa.

1.5.8.2 Appareillage

La figure 11 schématise le dispositif expérimental. La tête de mesure est placée dans une enceinte thermostatée à ± 0,1 °C près. La cellule contenant l'échantillon est placée dans une enceinte séparée, également thermostatée avec une précision de 0,1 °C. Toutes les autres parties du dispositif sont maintenues à une température plus élevée afin d'éviter la condensation. L'ensemble du système est relié à un système de vide poussé.

Figure 11



- A: Tête de mesure à rotor
- B: Cellule contenant l'échantillon
- C: Thermostat
- D: Vers le vide (pompe turbo)
- E: Air thermostaté

2. RÉSULTATS ET RAPPORT

2.1 RÉSULTATS

Quelle que soit la méthode choisie, la pression de vapeur doit être déterminée à au moins deux températures. Dans le domaine compris entre 0 et 50 °C, il est préférable d'effectuer des mesures à au moins trois températures, en vue de vérifier la linéarité de la courbe de pression de vapeur. Dans le cas de la méthode d'effusion (cellule de Knudsen et thermogravimétrie isotherme) et de la méthode par saturation de gaz, il est recommandé un intervalle de températures des mesure compris entre 120 et 150 °C au lieu de 0 à 50 °C.

2.2 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit comprendre les informations suivantes :

- méthode utilisée
- caractéristiques précises de la substance (identité et impuretés) et étape préliminaire de purification, le cas échéant ;
- pressions de vapeur mesurées à au moins deux températures, et de préférence à au moins trois températures, dans la gamme comprise entre 0 et 50 °C (ou 120 et 150 °C), dont au moins une est inférieure ou égale à 25 °C pour autant que la méthode choisie le permette d'un point de vue technique ;
- toutes les données brutes
- courbe de $\log p$ en fonction de $1/T$
- estimation de la pression de vapeur à 20 °C ou à 25 °C

Si une transition est observée (changement d'état, décomposition), il y a lieu de noter les informations suivantes :

- nature du changement;
- température à laquelle se produit le changement à pression atmosphérique;
- pression de vapeur à 10 et 20 °C en dessous de la température de la transition et à 10 et 20 °C au-dessus de cette température (sauf s'il s'agit une transition de l'état solide à l'état gazeux).

Toutes les informations et remarques utiles à l'interprétation des résultats doivent être rapportées, en particulier celles qui concernent les impuretés et l'état physique de la substance.

3. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Journal Officiel des Communautés européennes L 383 A, (1992) 26-47.
- (2) Ambrose, D. (1975). *Experimental Thermodynamics*, Vol.II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, London.
- (3) Weissberger R., ed. (1959). *Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry*, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.
- (4) Glasstone, S. (1946). *Textbook of Physical Chemistry*, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.
- (5) NF T 20-048 AFNOR (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel – Détermination de la pression de vapeur des solides et des liquides dans le domaine 10^1 à 10^5 Pa - Méthode statique.
- (6) ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure - temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.
- (7) NF T 20-047 AFNOR (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel – Détermination de la pression de vapeur des solides et des liquides dans le domaine 10^3 à 1 Pa – Méthode de la balance de pression de vapeur.
- (8) Knudsen, M. (1909). *Ann. Phys. Lpz.*, 29, 1979; (1911), 34, 593.
- (9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). *J. Chem. Thermodynamics* 7, 1173.
- (10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; *Pest Management Science* 56, 521-532.
- (11) Tomlin, C.D.S. (ed.), *The Pesticide Manual*, Twelfth Edition (2000)
- (12) Friedrich, K., Stambach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. *J. Chromatog.* 16 (1964), 22-28
- (13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., *Pesticide Science* 16 (1982), 269-278.
- (14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, *Thermochimia Acta* 112 Issue 1 (1987), 117-122.
- (15) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; *Pesticide Science* 4 (1973) 137-147.
- (16) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; *Pesticide Science* 5 (1974) 393-400.
- (17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; *Pesticide Science* 13 (1982) 161-168.

- (18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; *Pesticide Science* 45 (1995) 27-31.
- (19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); *Pesticide Science*, 53 (1998) 300-310.
- (20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; *Journal of Pharmaceutical Science* 87(12) (1998) 1512-20.
- (21) Lide, D.R. (ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range -25°C to 150°C.
- (22) Meister, R.T. (ed.), *Farm Chemicals Handbook*, Vol. 88 (2002)
- (23) 40 CFR, 796. (1993). pp 148-153, Office of the Federal Register, Washington DC
- (24) Rordorf B.F. (1985). *Thermochimica Acta* 85, 435.
- (25) Westcott et al. (1981). *Environ. Sci. Technol.* 15, 1375.
- (26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). *J. Vac. Sci. Technol. (A)*, 5(4), 2440.
- (27) Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). *J. Vac. Sci. Technol.* 17(2), 642.
- (28) Fremerey, J.K. (1985). *J. Vac. Sci. Technol. (A)*, 3(3), 1715.

APPENDICE

MÉTHODE D'ESTIMATION

INTRODUCTION

Les valeurs estimées de la pression de vapeur peuvent être utilisées pour :

- choisir la méthode expérimentale appropriée ;
- fournir une estimation ou une valeur limite lorsque la méthode expérimentale n'est pas applicable pour des raisons techniques.

MÉTHODE D'ESTIMATION

La pression de vapeur des liquides et des solides peut être estimée à l'aide de la corrélation modifiée de Watson (a). La seule donnée expérimentale requise est le point d'ébullition normal. Cette méthode est applicable entre 10^5 et 10^{-5} Pa.

Le «Handbook of Chemical Property Estimation Methods» (b) contient des informations détaillées sur cette méthode. Voir aussi «OECD Environmental Monograph No.67» (c).

PROCÉDURE DE CALCUL

La pression de vapeur se calcule de la façon suivante :

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b} \left[1 - \frac{\left(3 - 2 \frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m \left(3 - 2 \frac{T}{T_b}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_b} \right]$$

où :

T = température choisie

T_b = point d'ébullition normal

P_{vp} = pression de vapeur à la température T

ΔH_{vb} = la chaleur de vaporisation

ΔZ_b = coefficient de compressibilité (estimé à 0,97)

m = facteur empirique qui dépend de l'état physique à la température choisie

De plus,

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F (8,75 + R \ln T_b)$$

où K_F est un facteur empirique tenant compte de la polarité de la substance Les facteurs K_F de plusieurs types de substances sont énumérés dans la référence (b).

Souvent, les données disponibles mentionnent un point d'ébullition à pression réduite. Dans ce cas, la pression de vapeur se calcule de la façon suivante :

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1} \left[1 - \left(3 - 2 \frac{T}{T_1} \right)^m \frac{T_1}{T} - 2m \left(3 - 2 \frac{T}{T_1} \right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_1} \right]$$

où T_1 représente le point d'ébullition à la pression réduite P_1 .

RAPPORT

Si l'on utilise la méthode d'estimation, le calcul doit être accompagné d'une documentation détaillée.

BIBLIOGRAPHIE

- (a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.
- (b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.
- (c) OECD Environmental Monograph No.67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

Annexe II

A.22. DIAMÈTRE MOYEN GÉOMÉTRIQUE PONDÉRÉ PAR LA LONGUEUR DES FIBRES

2. 1. MÉTHODE

2.1. 1.1 INTRODUCTION

La présente méthode décrit une procédure permettant de mesurer le diamètre moyen géométrique pondéré par la longueur (LWGMD) de fibres minérales artificielles (FMA) en vrac. Dans la mesure où le LWGMD de la population a une probabilité de 95 % d'être compris dans les limites de confiance à 95 % ($LWGMD \pm$ deux erreurs types) de l'échantillon, la valeur rapportée (valeur d'essai) sera la limite de confiance inférieure à 95 % de l'échantillon (c.-à-d. $LWGMD - 2$ erreurs types). Cette méthode repose sur une mise à jour (juin 1994) d'une ébauche de procédure industrielle du HSE approuvée lors d'une réunion entre l'ECFIA et le HSE à Chester le 26 septembre 1993 et développée aux fins et sur la base d'un deuxième essai interlaboratoire (1, 2). Cette méthode de mesure peut être utilisée pour caractériser le diamètre des fibres de substances ou de produits en vrac contenant des FMA, et notamment des fibres céramiques réfractaires (FCR), des fibres vitreuses artificielles (FVA) et des fibres cristallines et polycristallines.

La pondération par la longueur permet de compenser les répercussions sur la distribution du diamètre de la cassure des fibres longues lors de l'échantillonnage ou de la manipulation du matériau. Des statistiques géométriques (moyenne géométrique) sont utilisées pour mesurer la distribution des diamètres des FMA dans la mesure où cette distribution est en général proche de la loi log-normale.

La mesure de la longueur et du diamètre est une opération à la fois fastidieuse et longue, mais si seules les fibres en contact avec une ligne infiniment mince du champ de vision d'un MEB sont mesurées, la probabilité de sélectionner une fibre donnée est proportionnelle à sa longueur. Comme cette méthode tient compte de la longueur dans les calculs de pondération par la longueur, la seule mesure requise est le diamètre et le $LWGMD-2ET$ peut être calculé comme décrit.

2.2. 1.2 DÉFINITIONS

Particule: Objet dont le rapport longueur/largeur est inférieur à 3:1.

Fibre: Objet dont le rapport longueur/largeur (rapport d'aspect) est d'au moins 3:1.

1.3 PORTÉE ET LIMITATIONS

Cette méthode est conçue pour examiner la distribution des diamètres ayant un diamètre moyen compris entre $0,5 \mu\text{m}$ et $6 \mu\text{m}$. Les diamètres supérieurs peuvent être mesurés à l'aide d'un grossissement inférieur du BEM, mais cette méthode est de plus en plus limitée à mesure que les distributions de fibres deviennent plus fines. Il est dès lors conseillé d'effectuer les mesures avec un microscope électronique à transmission (MET) si le diamètre moyen est inférieur à $0,5 \mu\text{m}$.

2.3. 1.4 PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

- 2.4. Un certain nombre d'échantillons représentatifs sont prélevés sur un tissu en fibres ou dans un rembourrage en vrac. La longueur des fibres en vrac est réduite par pressage, puis un sous-échantillon représentatif est dispersé dans de l'eau. Des aliquotes sont extraites et filtrées à l'aide d'un filtre en polycarbonate à pores de $0,2 \mu\text{m}$, avant d'être préparées pour l'examen à l'aide de techniques de microscopie électronique à balayage (MEB). Les

diamètres des fibres sont mesurés grâce à un grossissement de l'écran de x10 000 ou plus² à l'aide d'un échantillonnage linéaire de manière à obtenir une estimation impartiale du diamètre moyen. L'intervalle de confiance inférieur à 95% (sur la base d'un test unilatéral) est calculé afin d'obtenir une estimation de la valeur minimale du diamètre moyen géométrique des fibres du matériau.

2.5. 1.5 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.5.1 **Sécurité/précautions**

Il conviendra de réduire au minimum l'exposition aux fibres en suspension dans l'atmosphère, ainsi que d'utiliser une hotte ou une boîte à gants lors de la manipulation des fibres. Des contrôles périodiques de l'exposition du personnel seront réalisés afin de déterminer l'efficacité des méthodes de contrôle. Lors de la manipulation des FMA, le personnel portera des gants jetables afin de réduire les risques d'irritation cutanée et d'éviter toute contamination croisée.

1.5.2 **Appareillage / équipement**

- Presses et matrices (capables de produire 10 MPa).
- Filtres en polycarbonate à pores capillaires de 0,2 µm (25 mm de diamètre).
- Filtre membrane en ester de cellulose à pores de 5 µm destiné à être utilisé comme filtre secondaire.
- Appareil de filtration en verre (ou systèmes de filtration jetables) conçus pour accueillir des filtres de 25 mm de diamètre (par exemple, kit de microanalyse en verre Millipore, type n°XX10 025 00).
- Eau fraîchement distillée et filtrée au travers d'un filtre à pores de 0,2 µm pour éliminer les micro-organismes.
- Pulvérisateur cathodique avec cible en or ou or/palladium.
- Microscope électronique à balayage avec une résolution pouvant descendre jusqu'à 10 nm et un grossissement x10 000.
- Divers: spatules, lame de scalpel de type 24, petites pinces, tubes MEB, colle carbone ou papier adhésif carbone, argent colloïdal.
- Sonde ultrasonore ou bain d'ultrasons de laboratoire
- Sonde ou perce-bouchon pour prélever des échantillons dans le tissu de FMA

1.5.3 **Procédure d'essai**

1.5.3.1 *Échantillonnage*

Pour les tissus et les bains, une sonde ou un perce-bouchon de 25 mm est utilisé pour prélever des échantillons de la coupe transversale. Les prélèvements doivent être effectués à des intervalles identiques sur toute la largeur d'une petite longueur de tissu ou être recueillis dans des zones aléatoires si de grandes longueurs sont disponibles. Le même

² Cette valeur de grossissement est indiquée pour les fibres de 3 µm. Pour les fibres de 6 µm, un grossissement de x5 000 peut s'avérer plus pertinent.

équipement peut être utilisé pour extraire des échantillons aléatoires dans du rembourrage. Chaque fois que possible, six échantillons seront prélevés de manière à refléter les variations spatiales dans le matériau en vrac.

Les six échantillons doivent être pressés dans une matrice de 50 mm de diamètre à 10 MPa. Le matériau est ensuite mélangé à l'aide d'une spatule et pressé à nouveau à 10 MPa. Le matériau est ensuite retiré de la matrice et conservé dans une bouteille en verre hermétiquement fermée.

1.5.3.2 *Préparation de l'échantillon*

Si nécessaire, les liants organiques peuvent être éliminés en plaçant la fibre à l'intérieur d'un four à 450 °C pendant environ une heure.

Utilisez des cônes pour la délimitation et coupez des quarts pour subdiviser l'échantillon (cette opération doit être réalisée à l'intérieur d'une enceinte à poussières).

Avec une spatule, ajoutez une petite quantité (< 0,5 g) d'échantillon à 100 ml d'eau fraîchement distillée et filtrée à l'aide d'un filtre membrane de 0,2 µm (d'autres sources d'eau ultra pure peuvent être utilisées à condition qu'elles soient de qualité satisfaisante). Dispersez soigneusement à l'aide d'une sonde ultrasonore fonctionnant à 100 W et réglée pour produire une cavitation. (Si vous ne disposez pas de sonde, utilisez la méthode suivante: agitez à plusieurs reprises et retournez pendant 30 secondes; envoyez des ultrasons dans un bain d'ultrasons de laboratoire pendant cinq minutes; puis agitez à nouveau à plusieurs reprises et retournez pendant 30 secondes supplémentaires).

Directement après la dispersion de la fibre, retirez un certain nombre d'aliqotes (par exemple, trois aliqotes de 3, 6 et 10 ml) à l'aide d'une pipette à goulot large (capacité de 2-5 ml).

Filtrez sous vide chaque aliqote au travers d'un filtre en polycarbonate de 0,2 µm soutenu par un filtre secondaire MEC à pores de 5 µm, en utilisant un entonnoir de filtration en verre de 25 mm avec un réservoir cylindrique. Placez environ 5 ml d'eau distillée filtrée dans l'entonnoir et pipetez lentement l'aliqote dans l'eau en tenant l'embout de la pipette sous le ménisque. La pipette et le réservoir doivent être soigneusement nettoyés après le pipetage dans la mesure où les fibres minces ont tendance à se situer plus à la surface.

Retirez le filtre en douceur et séparez-le du filtre secondaire avant de le placer dans un récipient pour qu'il sèche.

Coupez un quart ou une moitié de la section du dépôt filtré avec une lame de scalpel de type 24 par un mouvement d'oscillation. Fixez soigneusement la section coupée sur la plaque d'un MEB à l'aide d'adhésif ou de colle carbone. L'argent colloïdal doit être appliqué à au moins trois endroits afin d'améliorer le contact électrique sur les bords du filtre et de la plaque. Lorsque la colle/l'argent colloïdal est sec/sèche, pulvérisez cathodiquement environ 50 nm d'or ou d'or/palladium sur la surface du dépôt.

1.5.3.3 *Étalonnage et fonctionnement du MEB*

1.5.3.3.1 *Étalonnage*

L'étalonnage du MEB doit être vérifié au moins une fois par semaine (idéalement une fois par jour) à l'aide d'une grille d'étalonnage certifiée. Les valeurs de l'étalonnage doivent être comparées à une norme certifiée et si la valeur mesurée (MEB) se situe en dehors de la plage de $\pm 2\%$ de la valeur certifiée, l'étalonnage du MEB doit être ajusté et une nouvelle fois vérifié.

Le MEB doit offrir au minimum une résolution d'un diamètre minimum visible de 0,2 µm, en utilisant une matrice de prélèvement réelle et à un grossissement de x 2 000.

1.5.3.3.2 Fonctionnement

Le MEB doit être utilisé à un grossissement de 10 000³ dans des conditions offrant une bonne résolution et une image acceptable à des vitesses de balayage réduites (par exemple, 5 secondes par trame). Bien que les conditions de fonctionnement de MEB différents puissent varier, il convient en général, pour obtenir la meilleure visibilité et résolution possible avec des matériaux de poids atomique relativement faible, d'utiliser des tensions d'accélération de 5 - 10 keV avec une dimension du spot réduite et une petite distance de travail. Comme une traversée linéaire est réalisée, il convient d'utiliser une inclinaison de 0° pour réduire au minimum le recentrage ou, si le MEB a une phase eucentrique, d'utiliser la distance de travail eucentrique. Un grossissement inférieur peut être utilisé si le matériau ne contient pas de petites fibres et que les diamètres des fibres sont importants (> 5 µm)

1.5.3.2 Mesurage

1.5.3.2.1 Examen à faible grossissement pour analyse de l'échantillon

Au départ, l'échantillon doit être examiné avec un faible grossissement afin de déterminer s'il y a agglutination des grandes fibres et pour déterminer la densité des fibres. En cas d'agglutination excessive, il est conseillé de préparer un nouvel échantillon.

Pour garantir la fiabilité des statistiques, il convient de mesurer un nombre minimum de fibres. Une densité élevée des fibres est souhaitable dans la mesure où l'examen de champs vides prend du temps et n'apporte rien à l'analyse. Cependant, si le filtre est surchargé, il peut devenir difficile de mesurer toutes les fibres mesurables. En outre, dans la mesure où les petites fibres risquent d'être cachées par les grandes, elles sont susceptibles de ne pas être vues.

Une densité supérieure des fibres de 150 fibres par millimètre de traversée linéaire peut entraîner une surestimation du LWGMD. D'un autre côté, les faibles concentrations de fibres augmentent le temps d'analyse. Il est en outre souvent plus intéressant du point de vue du coût de préparer un échantillon d'une densité proche de la valeur optimale que de persister à dénombrer des filtres à faible concentration. La densité de fibres optimale doit donner une moyenne d'environ une ou deux fibres dénombrables par champ de vision à un grossissement de 5 000. Cependant, dans la mesure où la densité optimale dépend de la taille (diamètre) des fibres, l'opérateur devra décider si la densité des fibres est proche ou non de la valeur optimale.

1.5.3.2.2 Pondération par la longueur du diamètre des fibres

Seules les fibres qui touchent (ou traversent) une ligne (infiniment) mince tracée sur l'écran du MEB sont comptées. C'est la raison pour laquelle une ligne horizontale (ou verticale) est tracée en travers du centre de l'écran.

Il est également possible de placer un point unique au centre de l'écran et de procéder à un balayage continu dans une seule direction à travers le filtre. Toute fibre dont le rapport d'aspect est supérieur à 3:1 et qui touche ou traverse ce point voit son diamètre mesuré et enregistré.

1.5.3.2.3 Mesure des fibres

Il est recommandé de mesurer au moins 300 fibres. Chaque fibre est mesurée une seule fois, au point d'intersection avec la ligne ou le point tracé(e) sur l'image (ou à proximité du point d'intersection si les bords de la fibre sont cachés). Si des fibres présentant des coupes

³ Pour les fibres de 3 µm, voir note précédente.

transversales non uniformes sont présentes, une mesure représentant le diamètre moyen de la fibre doit être utilisée. Le plus grand soin devra être accordé à la définition du bord et à la mesure de la distance la plus courte entre les bords des fibres. La mesure peut être effectuée en ligne ou hors ligne, sur des images ou des photos enregistrées. Il est recommandé d'utiliser des systèmes de mesure d'image semi-automatiques qui transfèrent directement les données dans une feuille de calcul, dans la mesure où ils permettent de gagner du temps, d'éviter les erreurs de transcription et d'automatiser les calculs.

Les extrémités des grandes fibres doivent être vérifiées à un grossissement plus faible afin de s'assurer qu'elles ne reviennent pas dans le champ de vision où est effectué le mesurage et qu'elles ne sont mesurées qu'une seule fois.

2 DONNÉES

2.1 TRAITEMENT DES RÉSULTATS

En général, les diamètres des fibres n'ont pas une distribution normale. Il est cependant possible d'obtenir une distribution proche de la normale en effectuant une transformation log.

Calculez la moyenne arithmétique (lnD moyenne) et l'écart-type ($SD_{\ln D}$) du log par rapport aux valeurs de base (lnD) des diamètres des fibres n (D).

$$\ln D \text{ moyen} = \frac{\sum \ln D}{n} \quad (1)$$

$$SD_{\ln D} = \sqrt{\frac{\sum (\ln D - \ln D \text{ moyen})^2}{n - 1}} \quad (2)$$

L'écart-type est divisé par la racine carrée du nombre de mesures (n) pour obtenir l'erreur type ($ET_{\ln D}$).

$$ET_{\ln D} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Soustrayez deux fois l'erreur type de la moyenne et calculez l'exponentielle de cette valeur (moyenne moins deux erreurs types) pour obtenir la moyenne géométrique moins deux erreurs types géométriques.

$$LWGMD - 2ET = e^{(\text{mean } \ln D - 2ET_{\ln D})} \quad (4)$$

3 RÉSULTATS

PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra au minimum les informations suivantes:

- La valeur de LWGMD-2ET.
- Toutes les déviations, en particulier celles qui risquent d'affecter la précision et la fiabilité des résultats, ainsi que les justifications correspondantes.

RÉFÉRENCES

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.
2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weighted geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

Annexe III

B.46 Irritation cutanée in vitro: essai sur modèle d'épiderme humain reconstitué

1. MÉTHODE

1.1 INTRODUCTION

L'irritation cutanée désigne l'apparition de lésions réversibles de la peau après application d'une substance d'essai pendant une durée pouvant aller jusqu'à 4 heures [selon la définition du système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH)] (1). La présente méthode d'essai propose une procédure in vitro qui, en fonction des informations requises, peut permettre de déterminer le pouvoir d'irritation cutanée des substances et constituer un essai de substitution à part entière, dans le cadre d'une stratégie d'essai basée sur la force probante des données (2).

Traditionnellement, l'évaluation de l'irritation cutanée impliquait le recours à des animaux de laboratoire (voir méthode B.4) (3). En considération des préoccupations relatives au bien-être des animaux, la méthode B.4 permet de déterminer la corrosion/l'irritation cutanée au moyen d'une stratégie d'essai séquentielle faisant appel à des méthodes d'essai in vitro et ex vivo validées, afin d'éviter de faire souffrir des animaux. Trois méthodes ou lignes directrices d'essai in vitro validées [B.40, B 40 bis et TG 435 (4, 5, 6)] sont utiles pour le volet corrosivité de la stratégie d'essai séquentielle proposée par la méthode B.4.

La présente méthode d'essai s'appuie sur des modèles d'épiderme humain reconstitué qui, de par leur conception globale (utilisation de kératinocytes prélevés sur l'épiderme humain en tant que source; tissu et architecture cellulaire représentatifs) reproduisent fidèlement les propriétés biochimiques et physiologiques des couches supérieures de la peau humaine, c'est-à-dire l'épiderme. La procédure décrite dans la présente méthode d'essai permet de caractériser les substances irritantes correspondant à la catégorie de danger 2 selon le SGH des Nations unies¹. La présente méthode d'essai inclut également une série de normes de performance pour l'évaluation de méthodes d'essai similaires sur épiderme humain reconstitué ou de variantes de ces méthodes (7).

Des études de prévalidation, d'optimisation et de validation ont été réalisées pour deux méthodes d'essai in vitro (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17) disponibles dans le commerce - EpiSkinTM et EpiDermTM - qui utilisent des modèles d'épiderme humain reconstitué. Ces références ont été basées sur la phrase de risque R38. Certains aspects de recalcul aux fins du SGH sont abordés dans la référence 25. Les méthodes dont la performance est équivalente à celle d'EpiSkinTM (méthode de référence validée 1) sont recommandées en tant que méthodes d'essai de substitution à part entière pour remplacer l'essai in vivo sur le lapin aux fins de la classification en tant que substance irritante de catégorie 2 selon le SGH. Les méthodes de performance équivalente à celle d'EpiDermTM (méthode de référence validée 2) ne sont recommandées qu'en tant que méthodes d'essai de dépistage, ou dans le cadre d'une stratégie d'essai séquentielle fondée sur la force probante des données, aux fins de la classification en tant que substance irritante de catégorie 2 selon le SGH. Avant de pouvoir utiliser à des fins réglementaires une méthode d'essai in vitro d'évaluation de l'irritation cutanée sur modèle d'épiderme humain reconstitué, il convient de déterminer la fiabilité, la précision et les limitations de cette méthode pour l'usage préconisé, de manière à s'assurer que ces caractéristiques sont comparables à celles de la méthode de référence validée 1, conformément aux normes de performance figurant dans la présente méthode d'essai (appendice).

Deux autres méthodes d'essai in vitro sur modèle d'épiderme humain reconstitué ont été validées conformément aux exigences de la présente méthode d'essai, et donnent des

résultats similaires à ceux de la méthode de référence validée 1 (18). Il s'agit de la méthode d'essai EpiDerm™ modifiée (méthode de référence modifiée 2) et de la méthode d'essai SkinEthic RHE™ (méthode réplique 1)

1.2 DÉFINITIONS

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

Précision: degré de concordance entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. C'est une mesure de la performance de la méthode d'essai et un aspect de la pertinence. Le terme est souvent utilisé de façon interchangeable avec «concordance» pour désigner la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai.

Substance témoin de lot: Substance de référence induisant une viabilité cellulaire moyenne du tissu.

Viabilité cellulaire: paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire (par exemple, capacité des déshydrogénases mitochondriales cellulaires à réduire le colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bleu de thiazol]), qui, selon l'effet mesuré et le protocole utilisé pour l'essai, correspond au nombre total de cellules vivantes et/ou à la vitalité des cellules.

TE₅₀: temps d'exposition nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % après application de la substance marqueur à une concentration fixe spécifiée, voir également CI₅₀

Taux de faux négatifs: proportion des substances positives faussement déclarées négatives par une méthode d'essai. C'est un indicateur de la performance de la méthode d'essai.

Taux de faux positifs: proportion des substances négatives (non actives) qui sont faussement déclarées positives. C'est un indicateur de la performance de la méthode d'essai.

Dose infinie: quantité de substance d'essai appliquée sur la peau qui dépasse la quantité requise pour recouvrir entièrement et uniformément la surface la peau.

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques): système de classification des substances et des mélanges en fonction de types normalisés et de niveaux de danger physique, sanitaire et environnemental, qui élabore les éléments de communication correspondants tels que pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger ou de mise en garde et fiches de sécurité, de manière à fournir des informations sur les effets indésirables des produits dans un souci de protection des personnes (employeurs, travailleurs, transporteurs, consommateurs et services d'intervention d'urgence) et de l'environnement (1); ce système est mis en œuvre dans l'UE par le règlement (CE) n° 1272/2008.

CI₅₀: concentration d'une substance marqueur qui réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI₅₀) après un temps d'exposition déterminé, voir également TE₅₀.

Normes de performance: normes, fondées sur une méthode de référence validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée qui est structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent I) les éléments essentiels de la méthode d'essai; II) une liste minimale de substances de référence choisies parmi les substances utilisées pour démontrer les performances acceptables de la méthode de référence validée, et III) en fonction des résultats obtenus pour la méthode de référence validée, les niveaux comparables d'exactitude et de fiabilité devant être obtenus pour la méthode d'essai proposée évaluée à l'aide des substances de référence de la liste minimale.

Fiabilité: mesure dans laquelle une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire et par plusieurs laboratoires utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intra et interlaboratoire.

Sensibilité: proportion des substances actives/positives correctement classées par l'essai. La sensibilité permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai qui donne des résultats relatifs à des catégories, et c'est un aspect important pour l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai.

Spécificité: proportion des substances inactives/négatives correctement classées par l'essai. La spécificité de mesurer la précision d'une méthode d'essai qui donne des résultats relatifs à des catégories, et c'est un aspect important pour l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai.

Irritation cutanée: apparition de lésions réversibles sur la peau à la suite de l'application d'une substance d'essai pendant une durée pouvant aller jusqu'à quatre heures. L'irritation cutanée est une réaction locale, non immunogène, qui se manifeste après une stimulation (24). Elle se caractérise essentiellement par un processus réversible impliquant des réactions inflammatoires et par la plupart des signes cliniques caractéristiques de l'irritation (érythème, œdème, démangeaisons et douleur) qui sont associés au processus inflammatoire.

1.3 CHAMP D'APPLICATION ET LIMITES

Une des limitations des essais sur modèles d'épiderme humain reconstitué relevant de la présente méthode d'essai est qu'ils permettent uniquement la classification des substances dans la catégorie 2 des substances irritantes pour la peau selon le SGH des Nations unies. Comme ils ne permettent pas de classer les substances dans la catégorie facultative 3 définie dans le SGH, toutes les autres substances ne sont pas classées (sans catégorie). En fonction des besoins de réglementation et de l'inclusion ultérieure de nouveaux critères d'évaluation, de l'amélioration ou du développement de nouvelles répliques des essais, une révision de la présente méthode pourra se révéler nécessaire.

La présente méthode d'essai permet de caractériser le danger des substances irritantes à un seul constituant (19), mais elle ne fournit pas d'informations appropriées sur la corrosion cutanée. Les gaz et les aérosols ne peuvent pas être testés, et les mélanges n'ont pas encore fait l'objet d'une étude de validation.

1.4 PRINCIPE DE L'ESSAI

La substance d'essai est appliquée localement sur un modèle tridimensionnel d'épiderme humain reconstitué, consistant en kératinocytes normaux prélevés sur un épiderme humain et mis en culture pour former un modèle multicouche hautement différencié d'épiderme humain. Il se compose d'une couche basale, d'un stratum spinosum et d'une couche granulaire organisés, ainsi que d'un stratum corneum multicouche contenant des couches lipidiques lamellaires intercellulaires dont la disposition est identique à celle que l'on observe in vivo.

Le principe de l'essai sur modèle d'épiderme humain reconstitué s'appuie sur l'hypothèse selon laquelle les substances irritantes sont capables de pénétrer dans le stratum corneum par diffusion et sont cytotoxiques pour les cellules des couches sous-jacentes. La viabilité cellulaire est mesurée par le virage, obtenu par une déshydrogénase, du colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bleu de thiazol; numéro EINECS 206-069-5, numéro CAS 298-93-1] en un sel de formazan bleu que l'on mesure quantitativement après extraction des tissus (20). Les substances irritantes sont détectées par leur capacité à abaisser la viabilité cellulaire au-dessous d'un seuil déterminé ($\leq 50\%$ pour les substances irritantes de catégorie 2 selon le SGH des Nations unies. Les substances qui donnent des viabilités cellulaires supérieures au seuil défini ne seront pas classées ($> 50\%$, sans catégorie).

Les systèmes de modèles d'épiderme humain reconstitué peuvent être utilisés pour tester des solides, des liquides, des semi-solides et des cires. Les liquides peuvent être aqueux ou non, et les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Chaque fois que possible, il convient de tester les solides sous la forme d'une poudre fine. Dans la mesure où 58 substances soigneusement sélectionnées et représentant un large éventail de classes ont été utilisées pour la validation des systèmes d'essai sur modèle d'épiderme humain reconstitué, les méthodes devraient pouvoir être appliquées d'une manière générale à l'ensemble des classes chimiques (16). La validation porte sur 13 substances irritantes de catégorie 2 selon le SGH. Acides non corrosifs, bases, sels et autres substances organiques non irritantes n'ont pas été inclus dans l'étude de validation. Certaines classes connues de substances irritantes organiques comme les hydroperoxydes, les phénols et les surfactants n'ont pas été inclus non plus, ou alors seulement de façon limitée.

1.5 DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

Avant d'appliquer de manière systématique une méthode validée conforme à la présente méthode d'essai, les laboratoires peuvent souhaiter faire la preuve de leur compétence technique à l'aide des dix substances recommandées dans le tableau 1. Dans le cadre de la présente méthode d'essai, la catégorie 3 facultative selon le SGH des NU ne correspond à aucune catégorie. Dans le cas de nouvelles méthodes d'essai similaires (répliques) mises au point conformément à la présente méthode, qui sont structurellement et fonctionnellement similaires aux méthodes de référence validées, ou dans le cas de modifications des méthodes validées, il convient d'utiliser les normes de performance décrites dans l'appendice de la présente méthode d'essai pour démontrer que la nouvelle méthode d'essai a une fiabilité et une précision comparables avant de l'utiliser à des fins réglementaires.

Tableau 1. Substances de vérification, constituant un sous-ensemble des substances de référence énumérées dans l'appendice

Substance	Numéro CAS	Score in vivo	État physique	Catégorie SGH
Acide naphtylacétique	86-87-3	0	S	Sans cat.
Isopropanol	67-63-0	0,3	L	Sans cat.
Stéarate de méthyle	112-61-8	1	S	Sans cat.
Butyrate d'heptyle	5870-93-9	1,7	L	Cat. 3 facultative
Salicylate d'hexyle	6259-76-3	2	L	Cat. 3 facultative
3-p-cuményl-2-méthylpropionaldéhyde	103-95-7	2,3	L	Cat. 2
1-bromohexane	111-25-1	2,7	L	Cat. 2
Méthacrylate de butyle	97-88-1	3	L	Cat. 2
1-méthyl-3-phényl-1-pipérazine	5271-27-2	3,3	S	Cat. 2
Heptanal	111-71-7	4	L	Cat. 2

1.6 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Les éléments et le protocole d'un essai d'évaluation de l'irritation cutanée sur modèle d'épiderme humain reconstitué sont décrits ci-après. Le modèle d'épiderme humain reconstitué peut être constitué, préparé ou obtenu dans le commerce (par exemple, les modèles EpiSkin™, EpiDerm™ et SkinEthic RHE™). Les protocoles d'essai standard pour les modèles EpiSkin™, EpiDerm™ et SkinEthic RHE™ peuvent être obtenus à l'adresse

suivante: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>](21, 22, 23). Les essais doivent être réalisés comme indiqué ci-après:

1.6.1 **Éléments du modèle d'épiderme humain reconstitué**

1.6.1.1 *Conditions générales applicables au modèle*

L'épithélium doit être constitué à partir de kératinocytes humains normaux. Plusieurs couches de cellules épithéliales viables (couche basale, stratum spinosum, stratum granulosum) doivent être présentes au-dessous d'un stratum corneum fonctionnel. Le stratum corneum doit comporter plusieurs couches présentant le profil lipidique nécessaire pour constituer une barrière fonctionnelle suffisamment robuste pour résister à la pénétration rapide des substances marqueurs cytotoxiques comme le dodécylsulfate de sodium (SDS) ou le Triton X-100. La fonction de barrière doit être évaluée soit en déterminant la concentration à laquelle une substance marqueur réduit de 50 % la viabilité des tissus (CI₅₀) après un temps d'exposition donné, soit en déterminant le temps d'exposition requis pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % (TE₅₀) après application de la substance marqueur à une concentration fixe déterminée. Le modèle doit présenter des propriétés de confinement telles que la substance d'essai ne puisse contourner le stratum corneum pour pénétrer dans les tissus viables, ce qui nuirait à la qualité de la modélisation de l'exposition de la peau. Enfin, le modèle de peau ne doit présenter aucune contamination bactérienne (y compris mycoplasmique), virale ou mycosique.

1.6.1.2 *Conditions applicables au modèle fonctionnel:*

1.6.1.2.1 Viabilité

La viabilité est de préférence mesurée au moyen du colorant MTT (20). Dans ces cas, la densité optique (DO) du colorant (solubilisé) extrait du tissu traité par le témoin négatif (TN) doit être au moins 20 fois supérieure à la DO du solvant d'extraction seul. Le tissu traité par le témoin négatif doit être stable en culture (c'est-à-dire qu'il doit présenter des mesures de viabilité comparables) pendant la durée de la période d'exposition.

1.6.1.2.2 Fonction de barrière

Le stratum corneum et sa composition lipidique doivent être suffisants pour résister à la pénétration rapide de substances marqueurs cytotoxiques tels que le SDS ou le Triton X-100, évaluée par la CI₅₀ ou le TE₅₀.

1.6.1.2.3 Morphologie

L'examen histologique de la peau/l'épiderme reconstitué(e) doit être réalisé par un personnel dûment qualifié qui montrera que le modèle présente une structure semblable à celle de la peau/de l'épiderme humain.

1.6.1.2.4 Reproductibilité

La reproductibilité dans le temps des résultats de la méthode sur un modèle donné doit être démontrée, de préférence à l'aide d'une substance témoin de lot (référence) appropriée (voir appendice).

1.6.1.2.5 Contrôles de qualité (CQ) du modèle

Chaque lot de modèle d'épiderme utilisé doit satisfaire à certains critères de fabrication dont les plus importants sont ceux relatifs à la viabilité (paragraphe 1.6.1.2.1) et à la fonction de barrière (paragraphe 1.6.1.2.2). Il convient que le fournisseur du modèle de

peau (ou l'expérimentateur en cas d'utilisation d'un modèle «maison») définisse une plage de valeurs acceptables (limites inférieure et supérieure) pour la CI_{50} et le TE_{50} . Les propriétés de barrière des tissus doivent être vérifiées par le laboratoire après réception des tissus. Seuls les résultats obtenus avec des tissus présentant les qualités requises pourront être retenus pour prédire de façon fiable les effets irritants. À titre d'exemple, les plages de valeurs acceptables pour les méthodes de référence validées sont indiquées ci-dessous.

Tableau 2. Exemples de critères de contrôle de qualité des lots

	Limite inférieure d'acceptation	Moyenne de la plage de valeurs acceptables	Limite supérieure d'acceptation
Méthode de référence validée 1 (18 heures de traitement par SDS)	$CI_{50} = 1,0$ mg/ml	$CI_{50} = 2,32$ mg/ml	$CI_{50} = 3,0$ mg/ml
Méthode de référence validée 2 (1 % Triton X100)	$TE_{50} = 4,8$ h	$TE_{50} = 6,7$ h	$TE_{50} = 8,7$ h

1.6.1.3 Application des substances d'essai et des substances témoins

Un nombre suffisant de tissus (répliques) doit être utilisé pour chaque traitement et pour les témoins (au moins trois répliques par essai). Pour les substances liquides comme pour les substances solides, il convient d'appliquer une quantité suffisante de substance d'essai pour recouvrir uniformément la surface de la peau, sans pour autant utiliser une dose infinie (voir 1.2 Définitions), c'est-à-dire au minimum $25 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ ou $25 \text{ mg}/\text{cm}^2$. Dans le cas de substances solides, il convient d'humidifier la surface de l'épiderme avec de l'eau déionisée ou distillée avant application, afin d'assurer un bon contact avec la peau. Chaque fois que possible, il convient de tester les solides sous la forme d'une poudre fine. À la fin de la période d'exposition, la surface cutanée doit être nettoyée avec soin à l'aide d'un tampon aqueux ou de NaCl à 0,9 pour cent, afin d'éliminer la substance d'essai. En fonction du modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé, la période d'exposition peut varier entre 15 et 60 minutes et la température d'incubation entre 20 et 37°C. Pour de plus amples informations, voir les modes opératoires standard pour les trois méthodes (21, 22, 23).

Des témoins négatifs (TN) et positifs (TP) doivent être utilisés simultanément pour chaque étude afin de démontrer que la viabilité (TN), la fonction de barrière et la sensibilité tissulaire qui en résulte (TP) se situent dans une fourchette historique définie de valeurs acceptables. La substance recommandée en tant que TP est une solution aqueuse de SDS à 5 %. On recommande comme substance TN de l'eau ou une solution saline tamponnée au phosphate (PBS).

1.6.1.4 Mesures de la viabilité cellulaire

La condition essentielle du protocole est que les mesures de la viabilité ne soient pas réalisées immédiatement après l'exposition aux substances d'essai, mais après une période d'incubation post-traitement suffisamment longue des tissus rincés dans un milieu frais. Cette période permet non seulement la récupération des tissus après des effets faiblement irritants, mais aussi l'apparition d'effets cytotoxiques manifestes. Durant la phase d'optimisation de l'essai (9, 10, 11, 12, 13), une période d'incubation post-traitement de 42 h s'est révélée optimale et a donc été utilisée pour la validation des méthodes d'essai de référence.

Le test de virage du MTT est une méthode quantitative validée qui devrait être utilisée pour mesurer la viabilité cellulaire. Elle est compatible avec une utilisation sur un modèle tissulaire tridimensionnel. L'échantillon de peau est placé dans une solution MTT à la concentration appropriée (par exemple, 0,3 -1 mg/ml) pendant 3 heures. Le précipité bleu de formazan est ensuite extrait à l'aide d'un solvant (isopropanol) et l'on mesure la concentration du formazan en déterminant sa DO à 570 nm avec une bande passante de ± 30 nm au maximum.

Les propriétés optiques de la substance d'essai ou son action chimique sur le MTT sont susceptibles d'interférer avec la détermination et de conduire à une estimation erronée de la viabilité (car la substance d'essai peut aussi bien inhiber ou faire disparaître la coloration que la provoquer). Cela peut survenir lorsque la substance d'essai n'a pas été totalement éliminée de la peau par rinçage ou lorsqu'elle a pénétré dans l'épiderme. Si la substance d'essai agit directement sur le MTT, si elle est naturellement colorée ou si elle se colore durant le traitement du tissu, des contrôles supplémentaires doivent être pratiqués pour détecter et corriger les interférences de la substance d'essai avec la mesure de la viabilité. Pour de plus amples précisions sur la manière de tester la réduction directe du MTT, veuillez consulter le protocole des méthodes de référence validées (21, 22, 23). Une coloration non spécifique (CNS) dues à ces interférences ne doit pas dépasser 30 % des TN (pour les corrections). Si $CNS > 30\%$, la substance d'essai est considérée comme incompatible avec l'essai.

1.6.1.5 *Critères d'acceptabilité des déterminations*

Pour chaque détermination réalisée sur des lots valables (voir paragraphe 1.6.1.2.5), les tissus traités par le témoin négatif (TN) doivent présenter une DO rendant compte de la qualité des tissus ayant été soumis à toutes les étapes d'expédition et de réception et à l'intégralité du protocole d'irritation. Les valeurs de DO des témoins ne doivent pas être inférieures aux limites inférieures historiques. De la même façon, les résultats obtenus pour les tissus traités par le témoin positif (TP), c'est-à-dire la solution aqueuse de SDS à 5 %, doivent rendre compte de la sensibilité conservée par les tissus et de leur capacité à réagir à une substance irritante dans les conditions de chaque détermination (par ex. viabilité $\leq 40\%$ pour la méthode de référence validée 1 et $\leq 20\%$ pour la méthode de référence validée 2). Il y a lieu de définir les mesures associées et appropriées de la variabilité entre les répliques de tissu (par exemple, si l'écart-type est utilisé, il doit être $\leq 18\%$).

2. **RÉSULTATS**

2.1. **RÉSULTATS**

Pour chaque traitement, il convient de présenter, sous forme de tableau, les résultats obtenus pour chaque échantillon de tissu (par exemple, les valeurs de DO et le pourcentage de viabilité cellulaire calculé pour chaque substance d'essai, ainsi que la classification correspondante), y compris les résultats obtenus le cas échéant en reproduisant les expériences. Pour chaque essai, on précisera en outre les valeurs moyennes \pm écart-type. Les interactions observées entre le réactif MTT et les substances d'essai colorées seront signalées pour chaque substance testée.

2.2 **INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS**

La valeur de DO obtenue pour chaque échantillon d'essai peut être utilisée pour calculer le pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au témoin négatif, lequel correspond à une viabilité cellulaire arbitrairement fixée à 100 pour cent. La valeur seuil du pourcentage de

viabilité cellulaire, qui établit la distinction entre les substances d'essai irritantes et les substances d'essai non classifiées, de même que les procédures statistiques utilisées pour évaluer les résultats et identifier les substances irritantes, doivent être clairement définies et documentées, et il convient de démontrer qu'elles sont appropriées. Les valeurs seuils permettant de déterminer l'irritation qui sont associées aux méthodes de référence validées sont indiquées ci-dessous:

La substance d'essai est considérée comme irritante pour la peau conformément à la catégorie 2 du SGH des Nations unies:

i) si la viabilité du tissu après exposition et incubation post-traitement est inférieure ou égale (\leq) à 50 %.

La substance d'essai est considérée comme étant sans catégorie:

ii) si la viabilité du tissu après exposition et incubation post-traitement est supérieure ($>$) à 50 %.

3. RAPPORTS

3.1 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes :

Substances d'essai et témoins :

- nom(s) chimique(s), tels que le nom IUPAC ou CAS, et le cas échéant le numéro CAS;
- Pureté et composition de la substance (en pourcentage en poids);
- propriétés physicochimiques utiles pour la conduite de l'essai (par ex. état physique, stabilité et volatilité, pH, hydrosolubilité);
- le cas échéant, traitement des substances d'essai/témoins avant l'essai (par exemple, chauffage, réduction en poudre);
- conditions de stockage;

justification du choix du modèle de peau et du protocole utilisés.

Conditions d'essai:

- système cellulaire utilisé;
- informations sur l'étalonnage du dispositif et de la bande passante utilisés pour la mesure de la viabilité cellulaire (spectrophotomètre, par exemple);
- informations complètes sur le modèle spécifique de peau utilisé, et notamment sur ses performances. Il s'agit notamment de:

i) la viabilité

ii) la fonction de barrière

iii) la morphologie

iv) la reproductibilité et la valeur prédictive

v) les contrôles de qualité (CQ) du modèle;

- détails du protocole utilisé;
- doses d'essai utilisées, durée de l'exposition et de la période d'incubation post-traitement;

- description de toute modification éventuelle du protocole;
- référence aux données historiques du modèle. Il s'agit notamment de:
 - i) l'acceptabilité des données de CQ par rapport aux données historiques des lots;
 - ii) l'acceptabilité des valeurs des témoins positifs et négatifs par rapport aux moyennes et aux fourchettes des témoins positifs et négatifs;
- description des critères d'évaluation utilisés, notamment la justification du choix des valeurs-seuils pour le modèle prédictif.

Résultats:

- présentation sous forme de tableau des résultats de chaque échantillon d'essai;
- description des autres effets observés.

Discussion des résultats

Conclusions

4. BIBLIOGRAPHIE

1. Nations unies (NU) (2007). Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), deuxième édition révisée, Nations unies, New York et Genève, 2007. Accessible à l'adresse suivante: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_f.html.
2. REACH: Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Available at: http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1232447649
3. Méthode d'essai B.4. TOXICITÉ AIGUË; IRRITATION/CORROSION CUTANÉE
4. Méthode d'essai B.40. CORROSION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI DE RÉSISTANCE ÉLECTRIQUE TRANSCUTANÉE (RET).
5. Méthode d'essai B.40 BIS. CORROSION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI SUR MODÈLE DE PEAU HUMAINE
6. OCDE (2006). Test Guideline 435. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. *In Vitro* Membrane Barrier Test Method. Adopted July 19, 2006. Voir à l'adresse suivante: http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html.
7. ECVAM (2009) Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation. Voir la rubrique «Download Study Documents» à l'adresse suivante: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
8. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J.M. & Botham, P. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 15, 57-93.
9. Portes, P., Grandidier, M.H., Cohen, C. & Roguet, R.(2002). Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. *Toxicology in Vitro* 16, 765–770.
10. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. & Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests. *ALTEX* 21, 107–114.

11. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. & Spielmann H. (2005) The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test. ATLA 33, 351-367.
12. Cotovio, J., Grandidier, M.- H., Portes, P., Roguet, R. & G. Rubinsteen. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model within the Framework of the ECVAM Validation Process. ATLA 33, 329-249.
13. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. & Worth, A. (2002). Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 2. ATLA 30, 109-129.
14. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559-601.
15. Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α . 135 pp. + annexes. Available under Download Study Documents, at: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
16. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang, V. (2007) ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, 603-619.
17. J. Cotovio, M.-H. Grandidier, D. Lelièvre, R. Roguet, E. Tinois-Tessonnaud, J. Leclair (2007). *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy -Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, Special Issue-proceedings from WC6. Vol.14, 351-358.
18. ESAC statement on updated EpiDerm and similar SkinEthic assays. 5 November 2008.
19. CE (2006). Règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission *Journal officiel de l'Union européenne* **L396/1** du 30.12.2006. OPOCE, Luxembourg.
20. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.
21. EpiSkin™ SOP, Version 1.6 (January 2005). Validation of the EpiSkin Skin Irritation Test - 42 Hours Assay For The Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals. Voir la rubrique «Download Study Documents» à l'adresse suivante: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
22. EpiDerm™ SOP, Version 5.0 (October 2004). Draft Standard Operating Procedure. *In Vitro* Skin Irritation Test: Human Skin Model. Model: EpiDerm™- 200. Voir la rubrique «Download Study Documents» à l'adresse suivante: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.

23. SkinEthic RHE™ SOP. Sera disponible dans la rubrique «Download Study Documents» à l'adresse suivante: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
24. Harvell, J.D., Lamminstausta, K, Maibach H.I. (1995) Irritant contact dermatitis IN: Guin J.D. Practical Contact Dermatitis Mc Graw-Hill New York, pp 7-18.
25. Griesinger C, Barroso J & Zuang V: ECVAM background document on the recent adaptations of the ECVAM performance standards for in vitro skin irritation testing in the context of the drafting process of an EU test method and an OECD draft test guideline. Ispra, November 13, 2008.

APPENDICE

Évaluation des performances des modèles d'épiderme humain reconstitué in vitro proposés pour tester l'irritation cutanée

INTRODUCTION

Les procédures dont l'utilisation est proposée dans le cadre de la présente méthode d'essai doivent être évaluées à l'aide de substances représentant l'éventail complet des scores d'irritation de Draize, afin de déterminer leur fiabilité et leur précision. Les valeurs de fiabilité et de précision obtenues lors de l'évaluation des procédures proposées à l'aide des 20 substances de référence recommandées (Tableau 2) doivent être comparables à celles obtenues par la méthode de référence validée 1 (Tableau 3) (1). Les normes de précision et de fiabilité à atteindre sont indiquées aux points II et III ci-après. Des substances non classées et des substances classées (catégorie 2 du SGH des Nations unies), représentant les classes chimiques pertinentes, sont incluses afin que la fiabilité et la performance (sensibilité, spécificité, taux de faux négatifs, taux de faux positifs et précision) de la méthode d'essai proposée puissent être comparées à celles de la méthode de référence validée 1. Il convient de déterminer la fiabilité de la méthode d'essai, ainsi que sa capacité à détecter correctement des substances irritantes de catégorie 2 selon le SGH des Nations unies, avant d'appliquer cette méthode pour tester de nouvelles substances.

NORMES DE PERFORMANCE

Les normes de performance se composent des trois éléments suivants: I) les éléments essentiels de la méthode d'essai, II) les substances de référence et III) les valeurs de précision et de fiabilité (2). Ces normes de performances sont fondées sur celles qui ont été définies à l'issue de l'étude CEVMA de validation des méthodes d'évaluation de l'irritation cutanée (3).

I) Les éléments essentiels de la méthode d'essai

Conditions générales applicables au modèle

L'épithélium doit être constitué à partir de kératinocytes humains normaux. Plusieurs couches de cellules épithéliales viables (couche basale, stratum spinosum, stratum granulosum) doivent être présentes au-dessous d'un stratum corneum fonctionnel. Le stratum corneum doit comporter plusieurs couches présentant le profil lipidique nécessaire pour constituer une barrière fonctionnelle suffisamment robuste pour résister à la pénétration rapide des substances marqueurs cytotoxiques comme le SDS ou le Triton X-100. La fonction de barrière doit être évaluée soit en déterminant la concentration à laquelle une substance marqueur réduit de 50 % la viabilité des tissus (CI_{50}) après un temps d'exposition donné, soit en déterminant le temps d'exposition requis pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % (TE_{50}) après application de la substance marqueur à une concentration fixe déterminée. Le modèle doit présenter des propriétés de confinement telles que la substance d'essai ne puisse contourner le stratum corneum pour pénétrer dans les tissus viables, ce qui nuirait à la qualité de la modélisation de l'exposition de la peau. Enfin, le modèle de peau ne doit présenter aucune contamination bactérienne (y compris mycoplasmaïque), virale ou mycosique.

Conditions applicables au modèle fonctionnel

Viabilité

La viabilité est de préférence mesurée au moyen du colorant MTT (4). La densité optique (DO) du colorant (solubilisé) extrait du tissu traité par le témoin négatif (TN) doit être au moins 20 fois supérieure à la DO du solvant d'extraction seul. Le tissu traité par le témoin négatif doit être stable en

culture (c'est-à-dire qu'il doit présenter des mesures de viabilité comparables) pendant la durée de la période d'exposition.

Fonction de barrière

Le stratum corneum et sa composition lipidique doivent être suffisants pour résister à la pénétration rapide de substances marqueurs cytotoxiques tels que le SDS ou le Triton X-100, évaluée par la CI_{50} ou le TE_{50} .

Morphologie

L'examen histologique de la peau/l'épiderme reconstitué(e) doit être réalisé par un personnel dûment qualifié qui montrera que le modèle présente une structure semblable à celle de la peau/de l'épiderme humain.

Reproductibilité

La reproductibilité dans le temps des résultats de la méthode sur un modèle donné doit être démontrée, de préférence à l'aide d'une substance témoin de lot (référence) appropriée (voir définition au paragraphe 1.2).

Contrôles de qualité (CQ) du modèle

Chaque lot de modèle d'épiderme utilisé doit satisfaire à certains critères de fabrication dont les plus importants sont ceux relatifs à la *viabilité* et à la *fonction de barrière*. Il convient que le fournisseur du modèle de peau (ou l'expérimentateur en cas d'utilisation d'un modèle «maison») définisse une plage de valeurs acceptables (limites inférieure et supérieure) pour la CI_{50} et le TE_{50} . Les propriétés de barrière des tissus doivent être vérifiées par le laboratoire après réception des tissus. Seuls les résultats obtenus avec des tissus présentant les qualités requises pourront être retenus pour prédire de façon fiable les effets irritants. À titre d'exemple, les plages de valeurs acceptables pour les méthodes de référence validées sont indiquées ci-dessous.

Tableau 1. Exemples de critères de contrôle de qualité des lots

	Limite inférieure d'acceptation	Moyenne de la plage de valeurs acceptable	Limite supérieure d'acceptation
Méthode de référence validée 1 (18 heures de traitement par SDS)	$CI_{50} = 1,0$ mg/ml	$CI_{50} = 2,32$ mg/ml	$CI_{50} = 3,0$ mg/ml
Méthode de référence validée 2 (1 % Triton X100)	$TE_{50} = 4,8$ h	$TE_{50} = 6,7$ h	$TE_{50} = 8,7$ h

II) Substances de référence

Les substances de référence sont utilisées pour déterminer si la fiabilité et la précision d'une nouvelle méthode d'essai in vitro sur épiderme humain reconstitué, dont on a démontré qu'elle était suffisamment similaire sur les plans structurel et fonctionnel aux méthodes de référence validées ou qu'elle représentait une modification mineure d'une méthode de référence validée, sont comparables à celles de la méthode de référence validée 1 (1). Les 20 substances de référence figurant dans le Tableau 2 comprennent des substances qui représentent différentes classes chimiques d'intérêt, ainsi que des substances classées dans la catégorie 2 du SGH des Nations unies. Le tableau comprend 10 substances classées dans la catégorie 2 du SGH NU, 3 substances classées dans la catégorie facultative 3 du SGH et 7 substances non classées. Aux fins de la présente méthode d'essai, la catégorie 3 facultative selon le SGH des NU ne correspond à aucune catégorie. Ces substances de référence représentent le nombre minimal de substances à utiliser pour évaluer la précision et la

fiabilité d'une méthode d'essai proposée pour évaluer l'irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué. Si une substance du tableau n'est pas disponible, il est possible d'utiliser d'autres substances pour lesquelles il existe des données de référence in vivo appropriées. Si nécessaire, il est possible d'ajouter à la liste minimale de substances de référence d'autres substances représentant d'autres classes chimiques et pour lesquelles des données de référence in vivo appropriées sont disponibles.

Tableau 2. Substances de référence pour la détermination des valeurs de précision et de fiabilité des modèles d'épiderme humain reconstitué pour l'évaluation de l'irritation cutanée

Substance*	N° CAS	N° Einecs	État physique	Score in vivo	Cat. SGH in vitro	Cat. SGH in vivo
1-bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	230-089-3	L	0	Cat. 2	Sans cat.
Phtalate diéthyle de	84-66-2	201-550-6	L	0	Sans cat.	Sans cat.
Acide naphtylacétique	86-87-3	201-705-8	S	0	Sans cat.	Sans cat.
Phénoxyacétate d'allyle	7493-74-5	231-335-2	L	0,3	Sans cat.	No Cat.
Isopropanol	67-63-0	200-661-7	L	0,3	Sans cat.	No Cat.
4-(méthylthio)-benzaldéhyde	3446-89-7	222-365-7	L	1	Cat. 2	No Cat.
Stéarate méthyle de	112-61-8	203-990-4	S	1	Sans cat.	No Cat.
Butyrate d'heptyle	5870-93-9	227-526-5	L	1,7	Sans cat.	Cat. 3 facult.
Salicylate d'hexyle	6259-76-3	228-408-6	L	2	Sans cat.	Cat. 3 facult.
Phosphate-de-triisobutyle-	126-71-6	204-798-3	L	2	Cat. 2	Cat. 3 facult.
Décane-1-ol	112-30-1	203-956-9	L	2,3	Cat. 2	Cat. 2
3-p-cuményl-2-méthylpropionaldéhyde	103-95-7	203-161-7	L	2,3	Cat. 2	Cat. 2
1-bromohexane	111-25-1	203-850-2	L	2,7	Cat. 2	Cat. 2
Hydrochlorure de 2-chlorométhyl-4-méthoxy-3,5 diméthyl pyridine	86604-75-3	434-680-9	S	2,7	Cat. 2	Cat. 2

Alpha-terpinéol	98-55-5	202-680-6	L	2,7	Cat. 2	Cat. 2
Disulfure de dipropyle	629-19-6	211-079-8	L	3	Sans cat.	Cat. 2
Méthacrylate de butyle	97-88-1	202-615-1	L	3	Cat. 2	Cat. 2
Méthyl-2 tert-butyle-5 thiophénol; thio PTBT	7340-90-1	438-520-9	L	3,3	Cat. 2	Cat. 2
1-méthyl-3-phényl-1-pipérazine	5271-27-2	431-180-2	S	3,3	Cat. 2	Cat. 2
Heptanal	111-71-7	203-898-4	L	4	Cat. 2	Cat. 2

* Les 20 substances de référence constituent une sélection représentative des 58 substances initialement utilisées pour la validation de la méthode de référence 1 (EpiSkin™). La liste complète des substances d'essai ainsi que les critères ayant présidé à la sélection sont disponibles (5).

Les substances figurant dans le tableau 2 sont une sélection représentative des 58 substances utilisées dans l'étude internationale CEVMA de validation de l'irritation cutanée (1). Les choix du CEVMA sont fondés sur les critères suivants:

- les substances sont disponibles dans le commerce;
- elles sont représentatives de l'éventail complet des scores d'irritation de Draize (des substances non irritantes aux substances très irritantes).
- elles ont une structure chimique bien définie;
- elles sont représentatives de la reproductibilité et de la valeur prédictive de la méthode validée telles que définies par l'étude de validation CEVMA;
- elles sont représentatives de la fonctionnalité chimique utilisée pour la validation.
- elles ne sont pas associées à un profil extrêmement toxique (cancérogène ou toxique pour la reproduction, par exemple) ni à des coûts d'élimination prohibitifs.

III) Valeurs de précision et de fiabilité définies

La performance (sensibilité, spécificité, taux de faux négatifs, taux de faux positifs et précision) de la méthode d'essai proposée doit être comparable à celle de la méthode de référence validée 1 (Tableau 3), c'est-à-dire que la sensibilité doit être supérieure ou égale à (\geq) 80 %, la spécificité doit être supérieure ou égale à (\geq) 70 % et la précision supérieure ou égale à (\geq) 75 %. La performance doit être calculée à l'aide des classifications obtenues pour les 20 substances par les différents laboratoires participants. Dans chaque laboratoire, la classification de chaque substance doit être obtenue en utilisant la valeur moyenne de la variabilité entre les différents essais réalisés (au minimum trois essais valables).

Tableau 3. Performance de la méthode de référence validée 1¹

Méthode d'essai	Nbre de substances	Sensibilité	Spécificité	Taux de faux négatifs	Taux de faux positifs	Précision
Méthode de référence validée 1 ²	58	87,2% ³	71,1% ⁴	12,8%	29,9%	74,7%
Méthode de référence validée 1 ²	20	90%	73,3%	10%	26,7%	81,7%

¹ Le tableau 3 donne la performance de la méthode de référence 1, c'est-à-dire la capacité à détecter correctement les substances irritantes (catégorie 2 du SGH NU) et les substances non classées (sans catégorie, y compris catégorie facultative 3) parmi les 58 ou les 20 substances de référence, selon le cas.

² EpiSkin™

³ Testée sur 13 substances irritantes de catégorie 2 selon le SGH.

⁴ Testée sur 45 substances irritantes de catégorie 3 ou sans catégorie selon le SGH.

La fiabilité de la méthode de référence proposée doit être comparable à celle des méthodes de référence validées.

Reproductibilité intralaboratoire

Une évaluation de la variabilité intralaboratoire doit faire apparaître une concordance des classifications (catégorie 2/sans catégorie), obtenues lors de plusieurs essais indépendants réalisés avec les 20 substances de référence par un même laboratoire, égale ou supérieure à (\geq) 90 %.

Reproductibilité interlaboratoire

L'évaluation de la reproductibilité interlaboratoire n'est pas indispensable si la méthode d'essai proposée ne doit être utilisée que dans un seul laboratoire. En cas de transfert des méthodes entre les laboratoires, la concordance des classifications (catégorie 2/sans catégorie), obtenues lors de plusieurs essais indépendants réalisés avec les 20 substances de référence par au moins trois laboratoires (de préférence), doit être égale ou supérieure à (\geq) 80%.

BIBLIOGRAPHIE

1. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. ATLA 35, 559-601.
2. OECD (2005) Guidance Document No. 34 on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. OECD, Paris.
3. ECVAM (2007) Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation. Voir rubrique «Download Study Documents» à l'adresse suivante <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>. Consulté le 27.10.2008
4. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, 55-63.

5. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang, V (2007) ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. ATLA 35, 603-619.

Annexe IV

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

1. MÉTHODE

La présente méthode est équivalente à la ligne directrice TG 201 (2006) (1) de l'OCDE.

1.1 INTRODUCTION

Les méthodes d'essai sont régulièrement revues et mises à jour en fonction des progrès scientifiques. En ce qui concerne la méthode d'essai C.3, il s'est avéré nécessaire d'ajouter des espèces et de la remanier conformément aux exigences nouvelles en matière d'évaluation des dangers et de classification des substances chimiques. Cette révision s'est appuyée sur la somme des informations recueillies, depuis l'adoption initiale, qui résultent d'une solide expérience concrète, des avancées scientifiques dans le domaine des études de toxicité sur les algues et d'une longue pratique réglementaire.

1.2 DÉFINITIONS

Les définitions et abréviations suivantes sont utilisées aux fins de cette méthode d'essai.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

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

1.4 PRINCIPE DE L'ESSAI

Cet essai vise à déterminer les effets d'une substance sur la croissance d'algues microscopiques dulcicoles et/ou de cyanobactéries. Des organismes d'essai en phase de croissance exponentielle sont exposés à la substance d'essai dans des cultures en lots sur une période durant normalement 72 heures. La relative brièveté de l'essai permet néanmoins d'évaluer les effets sur plusieurs générations.

L'effet observé est la réduction de la croissance dans une série de cultures d'algues (unités expérimentales) exposées à différentes concentrations de la substance d'essai. L'effet est évalué en fonction de la concentration d'exposition, en comparaison avec la croissance moyenne d'une série de cultures témoins identiques et non traitées. Afin que les effets toxiques puissent pleinement s'exprimer (sensibilité optimale des cultures), les cultures d'algues sont placées dans des conditions propres à une croissance exponentielle non limitée: éléments nutritifs en suffisance et lumière continue, et ce, sur une période assez longue pour que la réduction du taux de croissance spécifique puisse être mesurée.

La croissance et l'inhibition de la croissance sont quantifiées d'après des mesure de la biomasse algale en fonction du temps. La biomasse des algues est définie en poids sec par volume, par exemple des milligrammes d'algues par litre de solution expérimentale. Le poids sec étant difficile à mesurer, on recourt à d'autres paramètres tels que la numération cellulaire qui est le plus souvent utilisée, ou encore le volume, la fluorescence et la densité

optique cellulaires, etc. Le facteur de conversion du paramètre de substitution mesuré en biomasse doit être connu.

L'effet étudié est l'inhibition de la croissance, exprimée par l'accroissement logarithmique de la biomasse (taux de croissance spécifique moyen) durant la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage x donné d'inhibition du taux de croissance (par exemple 50 %) est déterminée en fonction des taux de croissance spécifiques moyens relevés dans une série de solutions expérimentales, et exprimée sous la forme C_xE_t (par exemple $C_{50}E_t$).

Pour l'application de cette méthode dans le cadre réglementaire de l'UE, le calcul des résultats doit être fondé sur un taux de croissance spécifique moyen, pour les raisons décrites au point 2.2 ci-dessous. La présente méthode d'essai comporte une variable étudiée supplémentaire, le rendement, requise par la réglementation de certains pays. Il est défini comme étant la différence entre la valeur de la biomasse à la fin de la période d'exposition et cette valeur au début de la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage x donné d'inhibition du rendement (par exemple 50%) est calculée à partir du rendement enregistré dans une série de solutions expérimentales, et exprimée sous la forme C_xE_r (par exemple $C_{50}E_r$).

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

1.5 INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Les informations sur la substance d'essai pouvant être utiles à l'établissement des conditions expérimentales comprennent la formule structurale, la pureté, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pouvoir d'absorption lumineuse, le pKa et les résultats d'études de transformation, notamment la biodégradabilité dans l'eau.

Il faut connaître l'hydrosolubilité, le coefficient de partage octanol-eau (P_{oe}) et la pression de vapeur de la substance d'essai, et disposer d'une méthode validée pour quantifier la substance dans les solutions expérimentales, méthode dont le rendement de récupération et le seuil de détection seront mentionnés dans le rapport.

1.6 SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Le procédé expérimental peut être vérifié au moyen de substance(s) de référence telle(s) que le 3,5-dichlorophénol, utilisé dans l'essai tournant international (4). Le dichromate de potassium peut également servir de substance de référence pour les algues vertes. Il est recommandé de mettre une substance de référence à l'essai au moins deux fois par an.

1.7 VALIDITÉ DE L'ESSAI

La validité de l'essai repose sur les critères de performance suivants :

- L'accroissement exponentiel de la biomasse des cultures témoins doit être d'un facteur au moins égal à 16 en l'espace de 72 heures (durée de l'essai), ce qui correspond à un taux de croissance spécifique de 0,92/jour. Le taux de croissance des espèces les plus fréquemment utilisées est généralement nettement supérieur (voir Appendice 1). Ce critère ne sera pas forcément rempli avec les espèces à croissance plus lente que celles énumérées à l'Appendice 1. Dans ce cas, il convient d'allonger la durée de l'essai, afin d'obtenir un facteur de multiplication de la croissance au moins égal à 16 dans les cultures témoins, la croissance devant être exponentielle tout au long de l'essai. La durée de l'essai peut être ramenée à au moins 48 heures pour maintenir une croissance exponentielle non limitée durant l'essai, pourvu que le facteur de multiplication minimal, à savoir 16, soit atteint.

- Le coefficient de variation moyen des taux de croissance spécifiques section par section (jours 0-1, 1-2 et 2-3, pour les essais de 72 heures) dans les cultures témoins (voir «coefficient de variation» au paragraphe 1.2) ne peut pas excéder 35 %. Voir le calcul du taux de croissance spécifique section par section au paragraphe 2.2.1, deuxième alinéa.. Ce critère s'applique à la valeur moyenne des coefficients de variation calculés pour les expériences identiques du groupe témoin.
- Le coefficient de variation des taux de croissance spécifiques moyens sur toute la durée de l'essai dans les cultures témoins identiques ne peut pas dépasser 7 % pour les essais menés sur *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Desmodesmus subspicatus*. S'agissant des autres espèces moins souvent testées, cette valeur ne doit pas dépasser 10 %.

1.8 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.8.1 Appareillage

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

Généralement en verre, les récipients d'essai possèdent des dimensions autorisant un volume de culture suffisant pour les mesures à effectuer durant l'essai et un transfert massique suffisant de CO₂ depuis l'atmosphère (voir paragraphe 1.8.9, deuxième alinéa). Notons que le volume de liquide doit être assez grand pour les déterminations analytiques (voir paragraphe 1.8.11, cinquième alinéa).

Une partie ou la totalité du matériel suivant est également nécessaire :

- Appareillage destiné aux cultures : il est recommandé d'utiliser une armoire ou une enceinte dans laquelle la température d'incubation choisie peut être maintenue à $\pm 2^{\circ}\text{C}$ près.
- Instruments de mesure de la lumière : il est important de savoir que la méthode de mesure de l'intensité lumineuse, et en particulier le type de capteur (collecteur), aura une influence sur la valeur mesurée. Il est préférable d'effectuer les mesures à l'aide d'un capteur sphérique 4π (sensible à la lumière directe et réfléchie provenant de tous les angles situés au-dessus et en dessous du plan de mesure) ou d'un capteur 2π (sensible à la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus du plan de mesure).
- Dispositif permettant de déterminer la biomasse des algues : la numération cellulaire, qui est le paramètre de substitution le plus fréquemment utilisé pour déterminer la biomasse des algues, peut être effectuée avec un compteur électronique de particules, un microscope équipé d'une enceinte de comptage ou un cytomètre à flux. D'autres paramètres de substitution de la biomasse peuvent être mesurés au moyen d'un cytomètre à flux, d'un fluorimètre, d'un spectrophotomètre ou d'un colorimètre. Il est utile de calculer le facteur de conversion du nombre de cellules en poids sec de biomasse. Afin d'obtenir des mesures utiles pour les faibles concentrations de biomasse quand on utilise un spectrophotomètre, il peut s'avérer nécessaire d'employer des cuves d'une longueur d'au moins 4 cm.

1.8.2 Organismes d'essai

Plusieurs espèces d'algues microscopiques et de cyanobactéries ne formant pas d'agrégats peuvent être utilisées. Il a été démontré que les souches énumérées à l'Appendice 1 convenaient au protocole expérimental de cette méthode d'essai.

Si l'on utilise d'autres espèces, il faut mentionner leur souche et/ou leur origine. Il y a lieu de confirmer que la croissance exponentielle des algues d'essai sélectionnées peut être maintenue tout au long de l'essai dans les conditions appliquées.

1.8.3 Milieu de croissance

Deux milieux de croissance possibles sont préconisés : celui de l'OCDE et le milieu AAP. Les compositions de ces milieux sont détaillées à l'Appendice 2. Il faut noter que la valeur initiale du pH et le pouvoir tampon (régulation de l'augmentation du pH) de ces deux milieux sont différents. En conséquence, les résultats des essais risquent d'être différents suivant le milieu employé, notamment avec des substances d'essai ionisantes.

Il peut parfois s'avérer nécessaire de modifier le milieu de croissance, par exemple si la substance d'essai est un métal ou un agent chélatant ou si l'essai est mené à différents pH. L'utilisation d'un milieu modifié doit être décrite en détail et justifiée (3)(4).

1.8.4 Concentration initiale de la biomasse

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

<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> :	$5 \cdot 10^3 - 10^4$	cellules/ml
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	$2 - 5 \cdot 10^3$	cellules/ml
<i>Navicula pelliculosa</i>	10^4	cellules/ml
<i>Anabaena flos-aquae</i>	10^4	cellules/ml
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	$5 \cdot 10^4 - 10^5$	cellules/ml

1.8.5 Concentrations de la substance d'essai

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

1.8.6 Expériences identiques et témoins

L'essai comprend trois expériences identiques à chaque concentration expérimentale. S'il n'est pas nécessaire de déterminer la CSEO, l'essai peut être modifié de manière à inclure un plus grand nombre de concentrations et un plus petit nombre d'expériences identiques par concentration. Le nombre d'expériences identiques pour le témoin doit être au moins trois et, idéalement, le double du nombre d'expériences identiques utilisées à chaque concentration expérimentale.

Un ensemble séparé de solutions d'essai peut être préparé pour les déterminations analytiques des concentrations de la substance d'essai (voir paragraphe 1.8.11, quatrième et sixième alinéas).

Si la substance d'essai est solubilisée à l'aide d'un solvant, on inclura des témoins supplémentaires contenant le solvant à la même concentration que celle appliquée dans les cultures expérimentales.

1.8.7 Préparation de la culture de l'inoculum

Afin que les algues soumises à l'essai soient adaptées aux conditions expérimentales et soient bien en phase de croissance exponentielle lorsqu'on les utilise pour ensemercer les solutions d'essai, on prépare une culture d'inoculum dans le milieu expérimental 2 à 4 jours avant le début de l'essai. La biomasse des algues doit être ajustée afin que la culture de l'inoculum présente une croissance exponentielle jusqu'au moment où l'essai débute. La culture de l'inoculum est incubée dans les mêmes conditions que les cultures expérimentales. On mesure l'accroissement de la biomasse dans la culture de l'inoculum pour vérifier qu'elle présente une croissance normale pour la souche expérimentale en question dans les conditions de culture. Un exemple de méthode de culture des algues est décrit à l'Appendice 3. Pour éviter des divisions cellulaires synchrones durant l'essai, il est parfois nécessaire de lancer une seconde étape de propagation de la culture de l'inoculum.

1.8.8 Préparation des solutions expérimentales

Toutes les solutions expérimentales doivent contenir les mêmes concentrations de milieu de croissance et la même biomasse initiale d'algues d'essai. On prépare généralement les solutions expérimentales aux concentrations choisies en mélangeant une solution mère de la substance d'essai avec le milieu de croissance et la culture de l'inoculum. Les solutions mères sont normalement préparées par dissolution de la substance dans le milieu d'essai.

Des solvants, par exemple de l'acétone, de l'alcool t-butylique et du diméthylformamide, peuvent être utilisés comme véhicules pour ajouter des substances peu solubles dans l'eau au milieu expérimental (2)(3). La concentration de solvant ne doit pas excéder 100 µl/l et doit être identique dans toutes les cultures (y compris les témoins) de l'essai.

1.8.9 Incubation

Les récipients expérimentaux sont munis de bouchons perméables à l'air. Les récipients sont agités et placés dans l'appareil destiné aux cultures. Durant l'essai, il est nécessaire de garder les algues en suspension et de faciliter le transfert de CO₂. À cette fin, les récipients sont agités ou leur contenu remué en permanence. Les cultures doivent être maintenues à une température comprise entre 21 et 24 °C, maintenue à ± 2 °C près. Des températures plus élevées peuvent être appliquées pour des espèces autres que celles reprises à l'Appendice 1, par exemple des espèces tropicales, à condition que les critères de validité soient respectés. Il est recommandé de disposer les récipients de façon aléatoire et de modifier quotidiennement leur emplacement dans l'incubateur.

Le pH du milieu témoin ne doit pas augmenter de plus de 1,5 unité durant l'essai. Dans le cas des métaux et des substances qui s'ionisent partiellement à un pH proche de celui de l'essai, il peut s'avérer nécessaire de limiter l'évolution du pH, afin d'obtenir des résultats reproductibles et bien définis. Il est techniquement possible de limiter l'évolution du pH à < 0,5 unité en induisant un taux adéquat de transfert massique de CO₂ de l'air environnant à la solution d'essai, par exemple en augmentant l'intensité de l'agitation. Une autre possibilité consiste à diminuer la demande en CO₂ en réduisant la biomasse initiale ou la durée de l'essai.

La surface sur laquelle les cultures sont incubées reçoit un éclairage continu, uniforme et fluorescent, par exemple de type «lumière blanche froide» ou «lumière naturelle». Les besoins lumineux varient selon les souches d'algues et de cyanobactéries. L'intensité lumineuse doit être choisie en fonction de l'organisme d'essai utilisé. Pour les espèces d'algues vertes recommandées, l'intensité lumineuse au niveau des solutions d'essai doit être choisie dans l'intervalle 60-120 µE·m⁻² s⁻¹ lorsqu'elle est mesurée dans le domaine de longueur d'onde autorisant la photosynthèse (400 à 700 nm) avec un capteur approprié. Certaines espèces, en particulier *Anabaena flos-aquae*, se développent bien sous des intensités lumineuses plus faibles et peuvent être endommagées par des intensités plus fortes. Pour ces espèces, il convient d'appliquer une intensité lumineuse moyenne comprise

dans la gamme $40\text{-}60 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (en ce qui concerne les instruments de mesure de la lumière étalonnés en lux, la gamme de 4440-8880 lux pour la lumière blanche froide correspond approximativement à l'intensité lumineuse recommandée de $60\text{-}120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). L'intensité lumineuse ne s'écartera pas de plus de $\pm 15 \%$ de l'intensité lumineuse moyenne dans la zone de l'incubation.

1.8.10 **Durée de l'essai**

L'essai dure normalement 72 heures. Néanmoins des durées plus ou moins longues peuvent être appliquées, à condition que tous les critères de validité mentionnés au paragraphe 1.7 soient respectés.

1.8.11 **Mesures et déterminations analytiques**

La biomasse des algues contenue dans chaque flacon est déterminée au moins une fois par jour durant la période d'essai. Si les mesures sont effectuées sur de petits volumes extraits de la solution d'essai avec une pipette, ceux-ci ne doivent pas être réintroduits dans le récipient d'essai.

La biomasse est mesurée par comptage manuel des cellules au microscope ou au moyen d'un compteur électronique de particules (dénombrement des cellules et/ou biovolume). D'autres techniques, par exemple la cytométrie à flux, la fluorescence chlorophyllienne in vitro ou in vivo (6)(7) ou la densité optique, peuvent être utilisées, à condition de pouvoir démontrer qu'il existe une corrélation satisfaisante avec la biomasse dans la gamme de valeurs de la biomasse de l'essai.

Le pH des solutions est mesuré au début et à la fin de l'essai.

Si l'on dispose d'une méthode permettant d'analyser la substance d'essai dans la gamme de concentrations appliquées, il faut analyser les solutions expérimentales afin de vérifier les concentrations initiales et le maintien des concentrations d'exposition durant l'essai.

L'analyse de la concentration de la substance d'essai, au début et à la fin de l'essai, dans des récipients renfermant une concentration élevée, une concentration faible et une concentration proche de la CE_{50} escomptée peut suffire si les concentrations d'exposition ne sont pas censées s'écarter de plus de 20 % des valeurs nominales durant l'essai. Il est préconisé d'analyser toutes les concentrations d'essai au début et à la fin de l'essai si les concentrations ne sont pas supposées demeurer dans l'intervalle de 80-120% de la concentration nominale. S'agissant des substances d'essai volatiles, instables ou s'adsorbant fortement, on recommande de prélever des échantillons à analyser toutes les 24 heures durant la période d'exposition, afin de préciser la perte de substance d'essai. Pour ces substances, le nombre d'expériences identiques devra être augmenté. Dans tous les cas, il suffira de déterminer la concentration de la substance d'essai dans un seul récipient traité de manière identique pour chaque concentration expérimentale (ou dans le mélange du contenu de tous les récipients traités de manière identique).

Les milieux d'essai destinés spécialement à l'analyse des concentrations d'exposition durant l'essai doivent être traités de la même manière que les milieux utilisés pour l'essai : ils doivent êtreensemencés avec les algues et incubés dans des conditions identiques. Si l'on doit analyser la concentration de la substance d'essai dissoute, les algues devront peut-être être séparées du milieu. À cette fin, il est préférable de procéder par centrifugation à une faible force d'accélération, suffisante pour sédimenter les algues.

S'il s'avère que la concentration de la substance d'essai a pu se maintenir tout au long de l'essai dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale ou mesurée initialement, l'analyse des résultats peut s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement. Si l'écart à la concentration nominale ou mesurée initialement est supérieur à $\pm 20\%$, l'analyse des résultats devra reposer sur la moyenne géométrique de la concentration relevée durant

l'exposition ou sur des modèles décrivant la baisse de la concentration de la substance d'essai (3)(8).

L'essai d'inhibition de la croissance des algues est un système expérimental plus dynamique que la plupart des autres essais de toxicité à court terme sur des organismes aquatiques. En conséquence, les concentrations d'exposition réelles risquent d'être difficiles à définir, en particulier pour les substances s'adsorbant testées à faibles concentrations. Dans ces circonstances, la disparition de la substance de la solution par adsorption sur la biomasse croissante des algues ne signifie pas que la substance d'essai a disparu du système d'essai. En analysant le résultat de l'essai, il y a lieu de vérifier si la diminution de la concentration de la substance d'essai au cours de l'essai s'est accompagnée d'une baisse de l'inhibition de la croissance. Si tel est le cas, on peut envisager d'appliquer un modèle décrivant convenablement la baisse de la concentration de la substance d'essai (8). Dans le cas contraire, il sera peut-être pertinent de fonder l'analyse des résultats sur les concentrations initiales (nominales ou mesurées).

1.8.12 **Autres observations**

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

1.8.13 **Essai limite**

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

1.8.14 **Modification pour les substances fortement colorées**

L'irradiation (intensité lumineuse) doit être réalisée dans le haut de l'intervalle imposé dans cette méthode d'essai: $120\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ou une valeur plus élevée.

Le trajet des rayons lumineux doit être raccourci en réduisant le volume des solutions expérimentales (de l'ordre de 5 - 25 ml).

Un mouvement suffisant (par exemple par une agitation modérée) doit être assuré pour obtenir une fréquence d'exposition élevée des algues à une forte irradiation à la surface de la culture.

2. **RÉSULTATS**

2.1 **TRACÉ DES COURBES DE CROISSANCE**

La biomasse des récipients d'essai peut être exprimée en unités du paramètre de substitution utilisé pour la mesurer (nombre de cellules, fluorescence, par exemple).

Porter dans un tableau la concentration estimée de la biomasse dans les cultures expérimentales et les cultures témoins, les concentrations de la substance d'essai et les temps de mesure enregistrés avec une précision minimale de l'ordre de l'heure, afin d'obtenir les points des courbes de croissance. Les échelles tant logarithmiques que linéaires peuvent être utiles à ce premier stade, mais les échelles logarithmiques sont indispensables et représentent généralement mieux les variations du rythme de la croissance durant l'essai. Notons que la croissance exponentielle produit une droite lorsqu'elle est portée sur une échelle logarithmique et que la pente de cette droite indique le taux de croissance spécifique.

À l'aide des points portés sur le graphique, examiner si les cultures témoins se développent au rythme exponentiel prévu tout au long de l'essai. Étudier attentivement tous les points et l'allure des graphiques et vérifier si les données brutes et les méthodes employées ne sont entachées d'aucune erreur. Vérifier en particulier tous les points qui semblent s'écarter du tracé suivant une erreur systématique. Si, à l'évidence, la manière dont on a procédé comporte des erreurs identifiables ou très probables, le point concerné est à signaler comme une valeur aberrante et ne doit pas être pris en compte dans l'analyse statistique ultérieure. (Une concentration nulle d'algues dans un des récipients traités de manière identique sur deux ou trois peut révéler que le récipient n'a pas étéensemencé correctement ou qu'il n'a pas été suffisamment bien nettoyé.) Les raisons pour lesquelles on a décidé d'exclure un point parce qu'on le considère comme une valeur aberrante doivent être exposées clairement dans le rapport d'essai. Les raisons acceptées ne représentent que des erreurs méthodologiques (rares) et non un manque de précision. Les méthodes statistiques d'identification des valeurs aberrantes sont d'un usage limité pour ce type de problème et ne peuvent remplacer le jugement d'un expert. Il est préférable de conserver les valeurs aberrantes (signalées comme telles) parmi les données présentées ultérieurement sur un graphique ou un tableau.

2.2 VARIABLES ÉTUDIÉES

Cet essai a pour but de déterminer les effets de la substance d'essai sur la croissance des algues. Cette méthode d'essai décrit deux variables étudiées, de manière à répondre aux différentes préférences et exigences réglementaires des pays membres. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables dans tous les pays membres, les effets doivent être évalués en fonction des deux variables étudiées (a) et (b) définies ci-dessous.

- a) Taux de croissance spécifique moyen : cette variable étudiée est calculée d'après l'accroissement logarithmique de la biomasse pendant la durée de l'essai, exprimé par jour.
- b) Rendement : cette variable étudiée correspond à la valeur de la biomasse à la fin de l'essai diminuée de la valeur de la biomasse au début de l'essai.

Pour l'application de cette méthode dans le cadre réglementaire de l'UE, le calcul des résultats doit être fondé sur un taux de croissance spécifique moyen, pour les raisons décrites ci-dessous. Notons que les valeurs de toxicité calculées avec ces deux variables étudiées ne sont pas comparables et qu'il faut tenir compte de cette différence lorsqu'on utilise les résultats de l'essai. Les valeurs de la CE_x basées sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) seront généralement supérieures à celles basées sur le rendement (C_xE_r) si les conditions expérimentales de cette méthode d'essai sont respectées, en raison de la base mathématique de chacune de ces approches. Cette différence n'est due qu'au calcul mathématique, il ne s'agit pas d'une différence de sensibilité entre les deux variables étudiées. Le concept du taux de croissance spécifique moyen repose sur le type général de croissance exponentielle des algues dans des cultures non limitées, où la toxicité est estimée d'après les effets sur le taux de croissance, sans tenir compte du niveau absolu du taux de croissance spécifique du témoin, de la pente de la courbe concentration-effet ni de

la durée de l'essai. En revanche, les résultats basés sur la variable de rendement dépendent de toutes ces autres variables. La $C_x E_r$ dépend du taux de croissance spécifique de l'espèce d'algue utilisée dans chaque essai et du taux de croissance spécifique maximal, susceptible de varier d'une espèce d'algue à une autre, voire d'une souche à une autre. Cette variable ne doit pas être utilisée pour comparer la sensibilité des espèces d'algues, voire de différentes souches d'algue, à des substances toxiques. S'il est préférable, du point de vue scientifique, d'estimer la toxicité d'après le taux de croissance spécifique moyen, la présente méthode propose également des estimations basées sur le rendement afin de satisfaire à la réglementation en vigueur dans certains pays.

2.2.1 Taux de croissance spécifique moyen

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

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

où :

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

X_i est la biomasse au temps i ;

X_j est la biomasse au temps j .

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

Calculer le taux de croissance spécifique moyen sur toute la durée de l'essai (normalement du jour 0 au jour 3), en prenant comme valeur de départ, la valeur nominale de la biomasseensemencée plutôt que sa valeur mesurée, car cela permet généralement d'obtenir une plus grande précision. Si l'instrument utilisé pour mesurer la biomasse autorise des déterminations suffisamment précises d'une petite biomasse d'inoculum (par exemple un cytomètre à flux), la concentration initiale mesurée de la biomasse peut alors être utilisée. Évaluer également les taux de croissance section par section en considérant, pour ce calcul, qu'ils équivalent aux taux de croissance spécifiques de chaque jour de l'essai (jours 0-1, 1-2 et 2-3) et vérifier si le taux de croissance des témoins reste constant (voir critères de validité, paragraphe 1.7). Le fait que le taux de croissance spécifique du premier jour soit sensiblement inférieur au taux de croissance spécifique moyen peut indiquer une phase de latence. S'il est possible de réduire presque à néant la phase de latence dans les cultures témoins par une propagation appropriée de la préculture, la présence d'une phase de latence dans les cultures exposées peut refléter un rétablissement après un choc toxique initial ou une exposition réduite due à une perte de substance d'essai (notamment par sorption sur la biomasse des algues) après l'exposition initiale. Le taux de croissance section par section permet ainsi d'étudier les différents effets de la substance d'essai durant la période d'exposition, d'où son intérêt. Des différences sensibles entre le taux de croissance section par section et le taux de croissance moyen traduisent un écart par rapport à la croissance exponentielle constante et appellent un examen attentif des courbes de croissance.

Calculer le pourcentage d'inhibition du taux de croissance pour chaque expérience identique de chaque groupe traité à l'aide de l'équation suivante :

$$\%I_t = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

où :

$\%I_t$ est le pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique moyen ;

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

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

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

2.2.2 Rendement

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

$$\%I_r = \frac{(R_C - R_T)}{R_C} \times 100$$

où :

$\%I_r$ est le pourcentage d'inhibition du rendement ;

R_C est la valeur moyenne du rendement dans le groupe témoin ;

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

2.3 TRACÉ DES COURBES CONCENTRATION-EFFET

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

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

2.4 MÉTHODES STATISTIQUES

L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de la régression. Il est possible d'appliquer une régression linéaire pondérée après avoir effectué une transformation linéarisant les valeurs décrivant l'effet observé - par exemple en unités probit ou logit ou Weibull (9), mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression non linéaire, celles-ci traitant mieux les irrégularités inévitables des valeurs et les écarts par rapport aux distributions régulières. Proches de zéro ou de l'inhibition totale, ces irrégularités risquent d'être amplifiées par la transformation et d'interférer avec l'analyse (9). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull se prêtent aux effets par tout ou rien (mortalité ou survie, par exemple) et doivent être modifiées pour pouvoir être utilisées avec les valeurs de croissance ou de biomasse. Les références (10)(11) et (12) décrivent des procédures permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues. L'utilisation d'une analyse de la régression non linéaire est détaillée à l'Appendice 4.

Pour chaque variable étudiée à analyser, utiliser la relation concentration-effet pour calculer des estimations ponctuelles des valeurs de CE_x . Déterminer, si possible, les limites de confiance à 95 % pour chaque estimation. La validité de l'ajustement des données décrivant les effets au modèle de régression est à évaluer par un procédé statistique ou graphique. L'analyse de la régression doit s'appuyer sur les effets relevés dans chaque récipient traité de manière identique et non sur les moyennes des groupes traités. Si toutefois, l'ajustement d'une courbe non linéaire est difficile ou échoue parce que les données sont trop dispersées, une régression peut alors être effectuée sur les moyennes des groupes, ce qui permet de réduire l'influence des valeurs que l'on soupçonne aberrantes. Le recours à cette option doit être signalé dans le rapport d'essai en tant qu'écart par rapport à la procédure normale, dû au fait que l'ajustement de la courbe avec les valeurs individuelles des expériences identiques n'a pas livré un bon résultat.

Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec bootstrap (rééchantillonnage) (13) si les modèles ou les méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.

Afin d'estimer la CMEO, et par conséquent la CSEO, pour les effets de la substance d'essai sur le taux de croissance, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par des techniques d'analyse de la variance (ANOVA). La moyenne de chaque concentration doit ensuite être comparée avec la moyenne du témoin à l'aide d'un test approprié à comparaisons multiples ou de tendance. Les tests de Dunnett ou de William peuvent être utiles (14)(15)(16)(17)(18). Il est nécessaire de vérifier si l'hypothèse de l'ANOVA de l'homogénéité de la variance se confirme. Cette vérification peut être pratiquée par un procédé graphique ou par un test formel (18), notamment les tests de Levene ou de Bartlett. L'infirmité de l'hypothèse de l'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance est extrême et ne peut être rectifiée par une transformation, on envisagera des méthodes d'analyse telles que les tests de tendance régressifs de Jonkheere. La référence (12) fournit des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.

Des découvertes récentes ont conduit les scientifiques à préconiser l'abandon de la notion de CSEO au profit d'estimations ponctuelles de la CE_x fondées sur la régression. Aucune

valeur de x appropriée n'a encore été établie pour cet essai sur les algues. Néanmoins, une gamme de 10 à 20% semble convenir (suivant la variable étudiée sélectionnée) et il est préférable de mentionner à la fois la CE_{10} et la CE_{20} dans le rapport.

2.5 STIMULATION DE LA CROISSANCE

On observe quelquefois une stimulation de la croissance (inhibition négative) aux faibles concentrations. Ce phénomène peut résulter d'une hormèse («stimulation toxique») ou de l'introduction de facteurs de stimulation de la croissance, véhiculés par la substance d'essai, dans le milieu minimal utilisé. Notons que l'ajout de nutriments minéraux ne devrait exercer aucun effet direct étant donné que le milieu d'essai doit contenir un excès de nutriments tout au long de l'essai. La stimulation à faible dose peut habituellement être ignorée dans les calculs de la CE_{50} , à moins qu'elle ne soit très prononcée. Néanmoins, si cette stimulation est extrême ou s'il faut calculer une valeur de CE_x pour une faible valeur de x , des procédures particulières pourraient être requises. On évitera, dans la mesure du possible, de soustraire les effets stimulants à l'analyse des données et, si le logiciel permettant d'ajuster la courbe ne peut pas accepter une stimulation mineure, une interpolation linéaire avec bootstrap peut être employée. Si la stimulation est extrême, l'utilisation d'un modèle d'hormèse est envisageable (19).

2.6 INHIBITION NON TOXIQUE DE LA CROISSANCE

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

3. **RAPPORT**

3.1 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes :

Substance d'essai :

- état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes, y compris la limite de solubilité dans l'eau ;
- données d'identification chimique, notamment pureté.

Espèce soumise à l'essai :

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

Conditions expérimentales :

- date du début de l'essai et durée de l'essai ;
- description de la conception de l'essai : récipients d'essai, volumes des cultures, densité de la biomasse au début de l'essai ;
- composition du milieu ;
- concentrations expérimentales et expériences identiques (par exemple, nombre d'expériences identiques, nombre de concentrations expérimentales et progression géométrique appliquée) ;
- description de la préparation des solutions expérimentales, y compris l'utilisation de solvants, etc.

- appareillage destiné aux cultures ;
- intensité et qualité lumineuses (source, homogénéité) ;
- température ;
- concentrations mises à l'essai : concentrations d'essai nominales et tous les résultats des analyses visant à déterminer la concentration de la substance d'essai dans les récipients expérimentaux. Le rendement de récupération de la méthode et le seuil de quantification dans la matrice expérimentale doivent être mentionnés ;
- tous les écarts par rapport à cette méthode d'essai;
- méthode de détermination de la biomasse et démonstration de la corrélation entre le paramètre mesuré et le poids sec ;

Résultats :

- valeurs du pH au début et à la fin de l'essai dans tous les récipients traités;
- biomasse dans chaque récipient à chaque point de mesure et méthode de mesure de la biomasse ;
- courbes de croissance (biomasse en fonction du temps) ;
- calcul des variables étudiées pour chaque expérience identique de chaque traitement ainsi que des moyennes et du coefficient de variation des expériences identiques;
- représentation graphique de la relation concentration-effet;
- estimation de la toxicité pour les variables étudiées, par exemple la CE_{50} , la CE_{10} et la CE_{20} et intervalles de confiance associés ; CME0 et CSEO, si elles ont été calculées, et méthodes statistiques appliquées à leur détermination ;
- si une analyse de la variance (ANOVA) a été pratiquée, puissance de l'effet détectable (par exemple, la différence la moins significative) ;
- stimulation de la croissance éventuellement observée dans un groupe traité ;
- tout autre effet observé, par exemple changement morphologique des algues ;
- analyse des résultats, notamment l'influence d'un éventuel écart par rapport à cette méthode d'essai sur les résultats de l'essai.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) OCDE LD 201 (2006) Algues d'eau douce et cyanobactéries, essai d'inhibition de la croissance
- (2) ISO 1998: Qualité de l'eau – Lignes directrices pour essais d'inhibition de la croissance algale avec des matières peu solubles, des composés volatils, des métaux et des eaux résiduaires. ISO/DIS 14442
- (3) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.
- (4) ISO 1998: Qualité de l'eau – Échantillonnage – Partie 16 : Lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons. ISO 5667-16.
- (5) ISO 1993: Qualité de l'eau – Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires. ISO 8692

- (6) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.
- (7) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22,5 (1977), pp.919-925
- (8) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem* 22, 2073-2079.
- (9) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.
- (10) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.
- (11) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Env. Toxicol. Chem.* 11:1485-1494.
- (12) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.
- (13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.
- (14) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121
- (15) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- (16) 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.
- (17) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510-531.
- (18) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, New York.
- (19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

APPENDICE 1

SOUCHES CONVENANT À L'ESSAI

Algues vertes

- *Pseudokirchneriella subcapitata* (autrefois dénommée *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG.
- *Desmodesmus subspicatus* (autrefois dénommée *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG.

Diatomées

- *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Cyanobactéries

- *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A
- *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Sources des souches

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

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

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

SAG: Collection of Algal Cultures
Albrecht-von-Haller-Institut
University of Göttingen
Nicholausberger Weg 18
D-37073 Göttingen
GERMANY

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA

Aspect et caractéristiques des espèces recommandées

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Aspect	Cellules solitaires, incurvées et torsées	Cellules ovales et solitaires la plupart du temps	Bâtonnets	Chaînes de cellules ovales	Bâtonnets
Dimensions (L x l) μm	8-14x2-3	7-15x3-12	7,1x3,7	4,5x3	6x1
Volume cellulaire ($\mu\text{m}^3/\text{cellule}$)	40-60 ¹	60-80 ¹	40-50 ¹	30-40 ¹	2,5 ²
Poids sec des cellules (mg/cellule)	2-3x10 ⁻⁸	3-4x10 ⁻⁸	3-4x10 ⁻⁸	1-2x10 ⁻⁸	2-3x10 ⁻⁹
Taux de croissance ³ (jour ⁻¹)	1,5-1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

¹ Mesuré avec un compteur électronique de particules

² Calculé d'après la taille

³ Taux de croissance le plus souvent observé dans le milieu de l'OCDE sous une intensité lumineuse approximative de $70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et à 21 °C.

Recommandations particulières pour la culture et la manipulation des espèces d'essai recommandées

Pseudokirchneriella subcapitata et *Desmodesmus subspicatus*

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

Anabaena flos-aquae

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

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

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

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

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

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

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

Synechococcus leopoliensis

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

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

Navicula pelliculosa

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

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

APPENDICE 2

MILIEUX DE CROISSANCE

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

Milieu de l'OCDE : milieu de la première version de la Ligne directrice 201 de l'OCDE, conforme à la norme ISO 8692

Milieu AAP de l'Agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (US EPA), conforme à l'ASTM.

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

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

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

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

Dans l'essai mené sur la diatomée *Navicula pelliculosa*, les deux milieux doivent être additionnés de Na₂SiO₃·9H₂O, afin d'atteindre une concentration de 1,4 mg de Si/l.

Le pH du milieu est obtenu à l'équilibre entre le système carbonate du milieu et la pression partielle de CO₂ dans l'air atmosphérique. Le pH à 25 °C et la concentration molaire de bicarbonate sont liés de façon approximative par l'équation suivante :

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

Avec 15 mg/l de NaHCO₃, le pH_{équi} = 7,5 (milieu de l'US EPA) et avec 50 mg/l de NaHCO₃, le pH_{équi} = 8,1 (milieu de l'OCDE).

Composition élémentaire du milieu d'essai

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

PRÉPARATION DU MILIEU DE L'OCDE

Élément nutritif	Concentration dans la solution mère
Solution mère 1 : macroéléments	
NH ₄ Cl	1,5 g·l ⁻¹
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2 g·l ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 g·l ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g·l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,16 g·l ⁻¹
Solution mère 2: fer	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	64 mg·l ⁻¹
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 mg·l ⁻¹
Solution mère 3: oligoéléments	
H ₃ BO ₃	185 mg·l ⁻¹
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg·l ⁻¹
ZnCl ₂	3 mg·l ⁻¹
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg·l ⁻¹
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 mg·l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg·l ⁻¹
Solution mère 4: bicarbonate	
NaHCO ₃	50 g·l ⁻¹
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	

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

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

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

Ajouter à 500 ml d'eau stérilisée :

- 10 ml de solution mère 1
- 1 ml de solution mère 2
- 1 ml de solution mère 3
- 1 ml de solution mère 4

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

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

PRÉPARATION DU MILIEU AAP

A1.1 Ajouter 1 ml de chaque solution mère visée aux points A1.2.1 à A1.2.7 ci-après à environ 900 ml d'eau désionisée ou distillée, et porter le volume à 1 litre.

A1.2 Préparer les solutions mères de macroéléments en dissolvant les composés suivants dans 500 ml d'eau désionisée ou distillée. Les réactifs A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 et A1.2.4 peuvent être combinés dans une seule solution mère.

A1.2.1 NaNO_3 —12,750 g.

A1.2.2 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —6,082 g.

A1.2.3 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —2,205 g.

A1.2.4 Solution mère d'oligoéléments (voir A1.3).

A1.2.5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —7,350 g.

A1.2.6 K_2HPO_4 —0,522 g.

A1.2.7 NaHCO_3 —7,500 g.

A1.2.8 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ —Voir Note A1.1.

NOTE A1.1 — À n'utiliser que pour les diatomées. Peut être ajouté directement (202,4 mg) ou véhiculé dans une solution mère pour donner une concentration finale de 20 mg/l en Si dans le milieu.

A1.3 Préparer la solution mère d'oligoéléments en dissolvant les composés suivants dans 500 ml d'eau désionisée ou distillée :

A1.3.1 H_3BO_3 —92,760 mg.

A1.3.2 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ —207,690 mg.

A1.3.3 ZnCl_2 —1,635 mg.

A1.3.4 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —79,880 mg.

A1.3.5 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —0,714 mg.

A1.3.6 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —3,630 mg.

A1.3.7 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —0,006 mg.

A1.3.8 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —150,000 mg.

[Ethylènedinitrilotétraacétate de sodium].

A1.3.9 $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ —0,005 mg; voir Note A1.2.

NOTE A1.2—À n'utiliser que dans le milieu pour les substances mères des diatomées.

A1.4 Ajuster le pH à $7,5 \pm 0,1$ avec du NaOH ou de l'HCl 0,1 N ou 1,0 N.

A1.5 Filtrer le milieu dans un récipient stérile sur un filtre à membrane à pores de 0,22 μm si l'on utilise un compteur de particules, ou sur un filtre à pores de 0,45 μm si l'on n'utilise pas de compteur de particules.

A1.6 Garder le milieu à l'obscurité, à environ 4°C jusqu'à son utilisation.

APPENDICE 3

EXEMPLE DE MÉTHODE DE CULTURE DES ALGUES

Observations générales

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

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

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

Matériel

Voir à la section «Appareillage» de la méthode d'essai.

Procédé d'obtention de cultures d'algues

Préparation de solutions nutritives (milieu) :

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

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

Culture mère :

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

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

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

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

Préculture :

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

APPENDICE 4

ANALYSE DES DONNÉES PAR UNE RÉGRESSION NON LINÉAIRE

Considérations générales

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

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

Analyse de la régression

Modèles

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

L'utilisation de modèles de fonctions de seuil continues (par exemple le modèle de Kooijman pour «l'inhibition de la croissance de la population», Kooijman et al., 1996) constitue une solution récemment proposée, différente des modèles asymptotiques. Ce modèle suppose qu'il n'y a pas d'effet aux concentrations inférieures à un certain seuil, CE_{0+} , estimé par une extrapolation de la relation concentration-effet consistant à intercepter l'axe des concentrations à l'aide d'une fonction continue simple non différentiable au point de départ.

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

Marche à suivre

Sélectionner une équation fonctionnelle appropriée, $Y = f(C)$, et l'ajuster aux données par une régression non linéaire. Utiliser de préférence les mesures relevées dans chaque flacon, plutôt que les moyennes des expériences identiques, afin de tirer un maximum d'informations des données. D'un autre côté, si la variance est élevée, l'expérience pratique nous porte à croire que les moyennes des

expériences identiques peuvent fournir une estimation mathématique plus solide, moins influencée par les erreurs aléatoires des données que chaque point pris individuellement.

Porter sur un graphique les valeurs mesurées et la courbe ajustée et vérifier si l'ajustement est valable. L'analyse des valeurs résiduelles peut être particulièrement utile à ce propos. Si la fonction choisie pour ajuster la courbe concentration-effet ne décrit pas bien l'ensemble de la courbe ou une partie essentielle de celle-ci, telle que les effets aux faibles concentrations, choisir un autre modèle d'ajustement, par exemple une courbe asymétrique, telle que la fonction de Weibull, à la place d'une fonction symétrique. Les inhibitions négatives peuvent poser un problème, par exemple avec la fonction de distribution log-normale, qui nécessitera, de la même manière, la recherche d'une autre fonction de régression. Il est déconseillé d'assigner une valeur nulle ou une faible valeur positive à ces valeurs négatives parce que cela fausse la distribution des erreurs. Il peut être utile de procéder à des ajustements séparés sur des portions de la courbe telles que celle où l'inhibition est faible, afin d'estimer les valeurs de CE_x faibles. En partant de l'équation ajustée (par «estimation inverse», $C = f^{-1}(Y)$), calculer des estimations ponctuelles caractéristiques des CE_x et rapporter au moins la CE_{50} et une ou deux CE_x faibles. La pratique des essais a montré que la précision de l'essai sur les algues permet normalement d'effectuer une estimation raisonnablement précise au seuil de 10% d'inhibition si les points dont on dispose sont en nombre suffisant – à moins qu'une stimulation ne survienne aux faibles concentrations, ce qui créerait une confusion. La précision de l'estimation de la CE_{20} est souvent bien meilleure que celle de la CE_{10} , parce que la CE_{20} se situe généralement sur la partie à peu près linéaire de la courbe concentration-effet centrale. Quelquefois, la CE_{10} peut être difficile à interpréter à cause de la stimulation de la croissance, de sorte que, même si la CE_{10} s'obtient généralement avec une précision suffisante, il est toujours recommandé de mentionner également la CE_{20} .

Facteurs de pondération

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

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

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

Normalisation des valeurs prises par les effets

La normalisation par la valeur moyenne de l'effet sur les témoins pose certains problèmes de principe et donne une structure de variance plutôt compliquée. En divisant les valeurs par la valeur moyenne des témoins en vue d'obtenir le pourcentage d'inhibition, on introduit une erreur supplémentaire due à l'erreur sur la moyenne des témoins. À moins que cette erreur ne soit négligeable, les facteurs de pondération appliqués à la régression et les limites de confiance doivent être corrigés en fonction de la covariance avec le témoin (17). Notons qu'il est important d'obtenir une précision élevée pour la moyenne estimée des valeurs affichées par les témoins, afin de minimiser la variance globale de l'effet relatif. Cette variance se calcule comme suit

(l'indice i fait référence au niveau de concentration i et l'indice 0 aux témoins) :

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

avec une variance

$$\text{Var}(Y_i) = \text{Var} (r_i/r_0) \cong (\delta Y_i / \delta r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + (\delta Y_i / \delta r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0)$$

et comme

$$(\delta Y_i / \delta r_i) = 1/r_0 \text{ et } (\delta Y_i / \delta r_0) = r_i/r_0^2$$

avec des données à distribution normale et des expériences identiques m_i et m_0 :

$$\text{Var}(r_i) = s^2/m_i$$

la variance totale de l'effet relatif Y_i devient donc

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

L'erreur sur la moyenne du témoin est inversement proportionnelle à la racine carrée du nombre d'expériences identiques du témoin prises en compte dans la moyenne, et il est quelquefois justifié d'inclure des données antérieures, ce qui réduit considérablement l'erreur. Il est également possible de ne pas normaliser les données ni d'ajuster les effets absolus, y compris l'effet affiché par le témoin, mais d'introduire la valeur de l'effet prise par le témoin en tant que paramètre supplémentaire à ajuster par une régression non linéaire. Avec une équation de régression ordinaire à deux paramètres, cette méthode requiert l'ajustement de 3 paramètres et demande, par conséquent, plus de points qu'une régression non linéaire pratiquée sur des données normalisées à l'aide d'une valeur de l'effet prise par le témoin déterminée à l'avance.

Intervalles de confiance inverses

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

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

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

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

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J.(1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Env. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494

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

Annexe V

C.25. MINÉRALISATION AÉROBIE DANS LES EAUX SUPERFICIELLES - ESSAI DE SIMULATION DE LA BIODÉGRADATION

1 MÉTHODE

Cette méthode est équivalente à la ligne directrice TG 309 (2004) de l'OCDE (1).

1.1 INTRODUCTION

Cet essai est destiné à mesurer la biodégradation en fonction du temps d'une substance d'essai présente en faible concentration dans une eau naturelle aérobie et à quantifier les observations sous la forme d'expressions cinétiques. Cet essai de simulation, réalisé en laboratoire avec des lots de flacons agités, sert à déterminer les vitesses de biodégradation aérobie de substances organiques dans des échantillons d'eaux naturelles de surface (douces, saumâtres ou marines). Il s'appuie sur la norme ISO/DIS 14592-1 (2) et reprend également des éléments des méthodes d'essai C.23 et C.24 (3)(4). Si l'essai dure longtemps, le procédé en lots peut être remplacé par un processus semi-continu, afin de prévenir la détérioration du microcosme expérimental. L'essai de simulation vise principalement à déterminer la minéralisation de la substance d'essai dans les eaux de surface, minéralisation qui est à la base de l'expression cinétique de la dégradation. Néanmoins, l'essai permet aussi, si on le souhaite, d'obtenir des renseignements sur la dégradation primaire et la formation des principaux produits de transformation. L'identification des produits de transformation et, si possible, la quantification de leurs concentrations, sont particulièrement importantes pour les substances qui se minéralisent très lentement (par exemple, dont la demi-vie du ^{14}C résiduel total dépasse 60 jours). L'identification et la quantification des principaux produits de transformation réclament normalement des concentrations plus élevées de la substance d'essai (par exemple, > 100 $\mu\text{g/l}$), en raison des limites analytiques.

Dans cet essai, on entend par faible concentration (par exemple, inférieure à 1 $\mu\text{g/l}$ et jusqu'à 100 $\mu\text{g/l}$), une concentration suffisamment faible pour que la cinétique de biodégradation obtenue au cours de l'essai reflète les cinétiques que l'on s'attend à trouver dans l'environnement. Comparée à la masse totale des substrats carbonés biodégradables présents dans l'eau naturelle utilisée pour l'essai, la substance d'essai en faible concentration servira de substrat secondaire. Cela implique que la cinétique de biodégradation attendue soit de premier ordre (cinétique de «non-croissance») et que la substance d'essai puisse être dégradée par «cométabolisme». Une cinétique de premier ordre signifie que la vitesse de dégradation (mg/l/jour) est proportionnelle à la concentration du substrat qui diminue au cours du temps. Avec une véritable cinétique de premier ordre, la constante spécifique de la vitesse de dégradation, k , est indépendante du temps et de la concentration. Autrement dit, k ne varie pas sensiblement au cours d'une expérience et ne se modifie pas avec l'augmentation de la concentration entre les expériences. Par définition, la constante spécifique de la vitesse de dégradation est égale au changement relatif de concentration par unité de temps : $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Bien qu'il faille normalement s'attendre à une cinétique de premier ordre dans les conditions prescrites, il se peut que d'autres cinétiques soient plus appropriées dans certaines circonstances. Des écarts par rapport à la cinétique de premier ordre peuvent s'observer si, par exemple, un phénomène de transfert de masse, tel que la vitesse de diffusion, plutôt que la vitesse de réaction biologique, freine la biotransformation. Cependant, les résultats peuvent presque toujours être décrits par une

cinétique de pseudo-premier ordre acceptant une constante de vitesse dépendante de la concentration.

Avant d'entamer l'essai, il faudrait disposer d'informations sur la biodégradabilité de la substance d'essai aux concentrations supérieures (tirées, par exemple, d'essais préliminaires standard) et de données sur la dégradabilité abiotique, les produits de transformation et les propriétés physico-chimiques pertinentes, afin de mieux planifier l'essai et de faciliter l'interprétation des résultats. L'utilisation de substances d'essai marquées au ^{14}C et la détermination de la répartition du ^{14}C entre les phases à la fin de l'essai permettent de déterminer la biodégradabilité finale. Si on utilise une substance d'essai non marquée, la biodégradation finale ne peut être estimée que si une concentration supérieure est mise à l'essai et si tous les principaux produits de transformation sont connus.

1.2 DÉFINITIONS

Biodégradation primaire : transformation structurelle d'une substance chimique par des microorganismes, débouchant sur la perte de l'identité chimique.

Biodégradation fonctionnelle : transformation structurelle d'une substance chimique par des microorganismes, entraînant la perte d'une propriété spécifique.

Biodégradation aérobie finale : décomposition d'une substance chimique par des microorganismes, en présence d'oxygène, en dioxyde de carbone, eau et sels minéraux des autres éléments présents (minéralisation) et production d'une nouvelle biomasse et de produits organiques par synthèse biomicrobienne.

Minéralisation : décomposition d'une substance chimique ou de matières organiques par des microorganismes, en présence d'oxygène, en dioxyde de carbone, eau et sels minéraux des autres éléments présents.

Phase de latence : période comprise entre le début de l'essai et le moment où le degré de biodégradation d'une substance chimique ou de la matière organique atteint une valeur détectable (par exemple, 10% de la biodégradation théorique maximale, ou moins, selon la précision de la technique de mesure) et durant laquelle les microorganismes dégradants s'adaptent.

Degré maximal de biodégradation : degré de biodégradation d'une substance chimique ou de la matière organique, au cours d'un essai, enregistré en pourcentage, au delà duquel la biodégradation ne se produit plus durant l'essai.

Substrat primaire : ensemble de sources de carbone naturel et d'énergie grâce auxquelles la biomasse microbienne croît et se maintient.

Substrat secondaire : élément du substrat présent à une concentration si faible que sa dégradation ne fournit que des quantités négligeables de carbone et d'énergie aux microorganismes compétents, en comparaison avec l'apport de carbone et d'énergie que les microorganismes tirent de la dégradation des principaux composés du substrat (substrats primaires).

Constante de vitesse de dégradation : constante de vitesse correspondant à une cinétique de premier ordre ou de pseudo-premier ordre, k (jour^{-1}), indiquant la vitesse des processus de dégradation. Dans un essai en lots, k est estimé à partir de la première partie de la courbe de dégradation, débutant juste après la fin de la phase de latence.

Demi-vie, $t_{1/2}$ (jour) : caractérise la vitesse d'une réaction de premier ordre ; c'est le laps de temps durant lequel la concentration diminue d'un facteur 2. La relation entre la demi-vie et la constante de vitesse de dégradation est régie par l'équation : $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Demi-temps de dégradation, TD_{50} (jour) : quantifie le résultat des essais de biodégradation ; c'est le laps de temps, incluant la phase de latence, nécessaire pour atteindre 50 % de biodégradation.

Seuil de détection et seuil de quantification : le seuil de détection est la concentration d'une substance en dessous de laquelle, il n'est plus possible de distinguer l'identité de la substance des artéfacts de la technique d'analyse. Le seuil de quantification est la concentration d'une substance en dessous de laquelle la concentration ne peut être déterminée avec une précision acceptable.

Carbone organique dissous (COD) : fraction du carbone organique présent dans un échantillon d'eau qui ne peut être extraite par une technique de séparation des phases définie, par exemple par centrifugation à $40\,000\text{ ms}^{-2}$ durant 15 minutes ou par filtration sur une membrane dont les pores mesurent entre 0,20 et 0,45 μm de diamètre.

Activité totale du ^{14}C organique (AOT) : activité totale du ^{14}C associé au carbone organique.

Activité du ^{14}C organique dissous (AOD) : activité totale du ^{14}C associé au carbone organique dissous.

Activité du ^{14}C organique particulaire (AOP) : activité totale du ^{14}C associé au carbone organique particulaire.

1.3 APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

Cet essai de simulation s'applique aux substances organiques non volatiles ou légèrement volatiles testées à de faibles concentrations. Si l'on utilise des flacons ouverts à l'atmosphère (par exemple, fermés par des tampons d'ouate), les substances dont les constantes de Henry sont inférieures à environ $1\text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ (approximativement $10^{-5}\text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$) peuvent être considérées comme non volatiles en pratique. En utilisant des flacons fermés pourvus d'un espace libre au-dessus du liquide, il est possible de mettre à l'essai des substances légèrement volatiles (avec des constantes de Henry $< 100\text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ ou $< 10^{-3}\text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$) sans que le système expérimental ne fuie. Des pertes de substances marquées au ^{14}C peuvent se produire si les précautions requises ne sont pas prises, lors de l'extraction du CO_2 . Dans ces situations, il peut être nécessaire de piéger le CO_2 dans un absorbeur interne renfermant un produit alcalin ou d'utiliser un dispositif externe d'absorption du CO_2 (détermination directe du $^{14}\text{CO}_2$; voir annexe 3). Pour la détermination de la cinétique de biodégradation, les concentrations de la substance d'essai doivent être inférieures à la solubilité de cette dernière dans l'eau. Remarquons, toutefois que les valeurs d'hydrosolubilité mentionnées dans les publications peuvent dépasser de beaucoup la solubilité de la substance d'essai dans les eaux naturelles. Il est possible, le cas échéant, de déterminer la solubilité des substances d'essai particulièrement peu solubles dans l'eau en utilisant les eaux naturelles mises à l'essai.

La méthode permet de simuler la biodégradation dans des eaux superficielles exemptes de particules grossières («essai pélagique») ou dans des eaux superficielles troubles, comme celles qui peuvent se trouver à proximité d'une interface eau-sédiments («essai en suspension de sédiments»).

1.4 PRINCIPE DE L'ESSAI

On réalise l'essai par lots, en incubant la substance d'essai dans l'eau superficielle uniquement («essai pélagique»), ou dans l'eau superficielle enrichie d'une suspension de solides/sédiments de 0,01 à 1 g/l de poids sec («essai en suspension de sédiments») pour simuler un plan d'eau contenant des solides en suspension ou des sédiments resuspendus. La plupart des eaux superficielles renferment des solides/sédiments en suspension à une concentration correspondant aux valeurs inférieures de cette gamme. Les flacons d'essai

sont incubés dans l'obscurité à la température de l'environnement étudié, en aérobiose et sous agitation. Il faut utiliser au moins deux concentrations différentes de la substance d'essai pour déterminer la cinétique de dégradation. Les concentrations devraient être espacées d'un facteur de 5 à 10 et représenter la gamme de concentrations supposée régner dans l'environnement. La concentration maximale de la substance d'essai ne devrait pas excéder 100 µg/l, mais il est préférable d'appliquer des concentrations maximales inférieures à 10 µg/l pour s'assurer que la biodégradation obéit à une cinétique de premier ordre. La concentration la plus faible ne devrait pas dépasser 10 µg/l, mais il vaut mieux choisir une concentration minimale de 1 à 2 µg/l ou inférieure à 1 µg/l. En règle générale, une concentration aussi faible peut être correctement analysée en utilisant des substances marquées au ¹⁴C vendues dans le commerce. Compte tenu des limites analytiques, il est souvent impossible de mesurer la concentration de la substance d'essai avec la précision requise si cette substance est appliquée à une concentration ≤ 100 µg/l (voir deuxième alinéa du paragraphe 1.7.2). Des concentrations plus élevées de la substance d'essai (>100 µg/l et quelquefois > 1 mg/l) peuvent être utilisées pour l'identification et la quantification des principaux produits de transformation, ou s'il n'existe pas de méthode d'analyse spécifique pourvue d'un seuil de détection bas. En testant des concentrations élevées de la substance d'essai, on risque de ne pas pouvoir utiliser les résultats pour estimer la constante de dégradation de premier ordre et la demi-vie, car la dégradation n'obéira probablement pas à une cinétique de premier ordre.

La dégradation est suivie, à des intervalles de temps appropriés, par la mesure du ¹⁴C résiduel ou de la concentration résiduelle de la substance d'essai lorsqu'on utilise une méthode spécifique d'analyse chimique. Le marquage au ¹⁴C de la partie la plus stable de la molécule permet de déterminer la minéralisation totale, tandis que le marquage d'une partie moins stable de la molécule, de même que le recours à une analyse spécifique, ne permettra d'évaluer que la biodégradation primaire. Néanmoins, la partie la plus stable n'inclut pas nécessairement le groupement fonctionnel pertinent de la molécule (qui peut lui conférer une propriété particulière, telle que la toxicité, la bioaccumulation, etc.). Si c'est le cas, il peut être utile d'utiliser une substance d'essai, marquée au ¹⁴C, dans le groupement fonctionnel, afin de suivre l'élimination de la propriété particulière.

1.5 INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Cet essai convient aussi bien aux substances radiomarquées qu'aux substances non marquées. Le marquage recommandé est celui au ¹⁴C et devrait normalement s'effectuer sur la ou les parties les plus stables de la molécule (voir également paragraphe 1.4). Pour les substances renfermant plus d'un cycle aromatique, il est préférable de marquer un ou plusieurs atomes de carbone de chaque cycle. En outre, il est préférable de marquer au ¹⁴C un ou plusieurs atomes de carbone situés de part et d'autre d'une liaison chimique facilement dégradable. La pureté chimique et/ou radiochimique de la substance d'essai devrait être supérieure à 95 %. En ce qui concerne les substances radiomarquées, une activité spécifique d'au moins quelque 50 µCi/mg (1,85 MBq) est préférable pour faciliter la mesure du ¹⁴C dans les essais réalisés avec de faibles concentrations initiales. Les informations suivantes sur la substance d'essai devraient être connues :

- solubilité dans l'eau [Méthode A.6];
- solubilité dans un ou plusieurs solvants organiques (substances appliquées avec un solvant ou peu solubles dans l'eau) ;
- constante de dissociation (pKa) si la substance est sujette à la protonation ou à la déprotonation [Ligne directrice TG 112 de l'OCDE] (5) ;
- pression de vapeur [Méthode A.4] et constante de Henry ;
- stabilité chimique dans l'eau et dans l'obscurité (hydrolyse) [Méthode C.7].

Si des substances peu solubles dans l'eau sont mises à l'essai dans de l'eau de mer, il peut aussi être utile de connaître la constante de désalination (ou «constante de Setschenow») K_s , définie par l'expression suivante : $\log (S/S') = K_s \cdot C_m$, où S et S' représentent respectivement la solubilité de la substance dans l'eau douce et dans l'eau de mer, et C_m la concentration molaire des sels.

Si l'essai est un «essai en suspension de sédiments», on devrait également disposer des informations suivantes :

- coefficient de partage n-octanol/eau [Méthode A.8];
- coefficient d'adsorption [Méthode C.18];

Parmi les autres renseignements utiles, citons :

- la concentration dans la nature, si elle est connue ou estimée ;
- la toxicité de la substance d'essai pour les microorganismes [Méthode C.11];
- la biodégradabilité immédiate et/ou intrinsèque [Méthodes C.4 A-F, C.12, C.9, ligne directrice TG 302 de l'OCDE (5)] ;
- la biodégradabilité aérobie ou anaérobie dans le sol et les études de transformation sédiment/eau [Méthodes C.23, C.24].

1.6 SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Il convient d'utiliser une substance de référence qui, normalement, se dégrade facilement en aérobiose (aniline ou benzoate de sodium, par exemple). La dégradation de l'aniline et du benzoate de sodium prend généralement moins de deux semaines. L'emploi de substances de référence sert à vérifier que l'activité microbienne de l'eau d'essai se situe dans une certaine gamme, autrement dit, que l'eau renferme une flore microbienne active.

1.7 CRITÈRES DE QUALITÉ

1.7.1 Récupération

Immédiatement après l'ajout de la substance d'essai, chaque concentration expérimentale initiale devrait être vérifiée par une mesure de l'activité du ^{14}C , ou par des analyses chimiques s'il s'agit de substances non marquées, dans au moins deux échantillons. Cette mesure nous renseigne sur l'applicabilité et la répétabilité de la méthode d'analyse et sur l'homogénéité de la répartition de la substance d'essai. Normalement, on utilise l'activité du ^{14}C initiale mesurée, équivalant à la concentration de la substance d'essai, dans les analyses ultérieures des résultats plutôt que la concentration nominale, ce qui compense les pertes par sorption et les erreurs de dosage. Pour les substances d'essai marquées au ^{14}C , le taux de récupération à la fin de l'expérience est fourni par le bilan massique (voir dernier alinéa du paragraphe 1.8.9.4). Idéalement, le bilan massique radiomarké devrait se situer entre 90 % et 110 %, tandis que la méthode d'analyse devrait donner un taux de récupération initial compris entre 70 % et 110 % pour les substances d'essai non marquées. Ces intervalles sont donnés à titre indicatif et ne devraient pas servir de critères d'acceptation pour l'essai. On peut, si on le souhaite, déterminer l'exactitude de la méthode d'analyse pour la substance d'essai à une concentration inférieure à la concentration initiale et pour les principaux produits de transformation.

1.7.2 Répétabilité et sensibilité de la méthode analytique

La répétabilité de la méthode analytique (notamment l'efficacité de l'extraction initiale) pour quantifier la substance d'essai, et les produits de transformation le cas échéant, devrait être vérifiée par cinq analyses identiques d'extraits de l'eau superficielle.

Le seuil de détection de la méthode analytique pour la substance d'essai et les produits de transformation devrait, si possible, atteindre au moins 1 % de la quantité introduite initialement dans le système expérimental. La limite de quantification devrait être inférieure ou égale à 10 % de la concentration appliquée. Les analyses chimiques de nombreuses substances organiques et de leurs produits de transformation exigent souvent des concentrations relativement élevées de la substance d'essai, à savoir > 100 µg/l.

1.8 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

1.8.1 **Matériel**

L'essai peut être effectué dans des flacons cylindriques ou coniques d'une capacité adéquate (0,5 ou 1,0 litre, par exemple), fermés par des bouchons en silicone ou en caoutchouc, ou dans des bouteilles à sérum munies de couvercles étanches au CO₂ (avec des bouchons cloisonnés (septa) en caoutchouc butylique, par exemple). Une autre possibilité consiste à pratiquer l'essai avec plusieurs flacons et à prélever des flacons entiers (au moins deux identiques) à chaque intervalle de prélèvement (voir dernier alinéa du paragraphe 1.8.9.1). Pour les substances d'essai non volatiles et non radiomarquées, il n'est pas nécessaire d'employer des bouchons ou des couvercles étanches aux gaz ; des tampons d'ouate empêchant la contamination par l'air suffisent (voir deuxième alinéa du paragraphe 1.8.9.1). Les substances légèrement volatiles devraient être testées dans un système de type biomètre fournissant une agitation douce à la surface de l'eau. Si l'on veut être sûr d'empêcher toute contamination bactérienne, on peut éventuellement stériliser les récipients en les chauffant ou en les autoclavant avant l'emploi. En outre, les instruments courants de laboratoire suivants sont nécessaires :

- une table tournante ou des agitateurs magnétiques pour agiter en continu les flacons expérimentaux ;
- une centrifugeuse ;
- un pH-mètre ;
- un turbidimètre pour les mesures néphélométriques de la turbidité ;
- un four ou un four à micro-ondes pour les déterminations pondérales ;
- un appareil de filtration à membrane ;
- un autoclave ou un four pour stériliser la verrerie ;
- instruments permettant de manipuler les substances marquées au ¹⁴C ;
- appareil permettant de quantifier l'activité du ¹⁴C dans des échantillons de solutions piégeant le CO₂ et, si nécessaire, dans des échantillons de sédiment ;
- instruments analytiques pour doser la substance d'essai (et de référence) si l'on pratique une analyse chimique spécifique (chromatographie en phase gazeuse, en phase liquide à haute pression, par exemple).

1.8.2 **Solutions mères de la substance d'essai**

Les solutions mères de la substance d'essai et de la substance de référence sont préparées avec de l'eau désionisée (voir premier alinéa du paragraphe 1.8.7). L'eau désionisée devrait être exempte de substances susceptibles d'être toxiques pour les microorganismes et la teneur en carbone organique dissous (COD) ne devrait pas dépasser 1 mg/l (6).

1.8.3 **Prélèvement et transport de l'eau de surface**

Quelle que soit la situation, le site de prélèvement de l'eau superficielle sera choisi en fonction de la finalité de l'essai. Il faut se renseigner sur le déversement antérieur d'éventuels effluents agricoles, industriels ou domestiques et en tenir compte dans la sélection du site. S'il s'avère qu'un milieu aquatique a été contaminé par la substance d'essai ou l'un de ses analogues de structure au cours des quatre dernières années, l'eau d'essai ne doit pas y être prélevée, à moins que l'expérimentateur n'étudie précisément la vitesse de dégradation dans des sites précédemment exposés. Le pH et la température de l'eau sont à mesurer sur le lieu de prélèvement. On notera également la profondeur de prélèvement et l'aspect de l'échantillon d'eau (couleur et turbidité, par exemple) (voir paragraphe 3). Il faut mesurer la concentration d'oxygène et/ou le potentiel redox dans l'eau et dans la couche superficielle du sédiment afin de démontrer l'aérobiose, sauf si cette condition est patente à en juger par l'apparence et une connaissance préalable du site. L'eau superficielle doit être transportée dans un récipient très bien nettoyé. Durant le transport, la température de l'échantillon n'excédera guère la température appliquée dans l'essai. Le refroidissement à 4°C est recommandé si le transport dure plus de 2 ou 3 heures. Il ne faut pas congeler l'échantillon d'eau.

1.8.4 **Stockage et préparation de l'eau superficielle**

Il est préférable de commencer l'essai au plus tard le lendemain du prélèvement de l'échantillon. Le cas échéant, le stockage de l'eau sera réduit au minimum et n'excédera en aucun cas 4 semaines. L'échantillon d'eau devrait être conservé à 4°C, sous aération, jusqu'à utilisation. Les particules grossières devront être éliminées de l'échantillon d'eau avant son utilisation, par exemple par filtration à travers une toile de nylon dont les mailles mesurent quelque 100 µm ou un papier filtre grossier, ou par sédimentation.

1.8.5 **Préparation de l'eau additionnée de sédiment (facultatif)**

Pour l'essai en suspension de sédiment, on ajoute le sédiment superficiel aux flacons contenant l'eau naturelle (filtrée pour être exempte de particules grossières, comme décrit au paragraphe 1.8.4), afin d'obtenir une suspension; la concentration des solides suspendus devrait être comprise entre 0,01 et 1 g/l. Le sédiment superficiel devrait provenir du même site que l'échantillon d'eau. Suivant les particularités du milieu aquatique, le sédiment superficiel peut se caractériser soit par une teneur élevée en carbone organique (2,5-7,5 %) et une texture fine, soit par une faible teneur en carbone organique (0,5-2,5 %) et une texture grossière (3). Le sédiment superficiel peut être préparé de la façon suivante : extraire plusieurs carottes de sédiment au moyen de tubes en plastique transparent, découper les tranches contenant les couches supérieures aérobies (à une profondeur maximale de 5 mm à partir de la surface) immédiatement après le prélèvement, et les réunir. L'échantillon de sédiment ainsi obtenu devrait être transporté dans un récipient muni d'un vaste espace libre au-dessus du contenu, de façon à maintenir le sédiment en aérobiose (refroidir à 4°C si le transport dure plus de 2 à 3 heures). L'échantillon de sédiment devrait être suspendu dans l'eau d'essai dans une proportion de 1/10 et conservé à 4°C sous aération jusqu'à son utilisation. Le cas échéant, le stockage du sédiment sera réduit au minimum et n'excédera en aucun cas 4 semaines.

1.8.6 **Procédé semi-continu (facultatif)**

Une incubation prolongée (plusieurs mois) peut s'avérer nécessaire lorsqu'il s'écoule une longue période de latence avant qu'il ne soit possible de mesurer une dégradation sensible de la substance d'essai. Si des expérimentations antérieures ont révélé que tel était le cas de la substance d'essai, l'essai peut débuter par un procédé semi-continu qui permet le renouvellement périodique d'une partie de l'eau ou de la suspension d'essai (voir Annexe 2). Par ailleurs, l'essai normal par lots peut être converti en essai semi-continu si

aucune dégradation de la substance d'essai n'est observée après une soixantaine de jours d'essai (voir deuxième alinéa du paragraphe 1.8.8.3).

1.8.7 **Ajout de la substance d'essai (ou de référence)**

Pour les substances dont l'hydrosolubilité est élevée ($> 1 \text{ mg/l}$) et la volatilité faible (constante de Henry $< 1 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ ou $< 10^{-5} \text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$), la solution mère peut être préparée dans de l'eau désionisée (voir paragraphe 1.8.2) : on verse le volume nécessaire de solution mère dans les récipients expérimentaux pour obtenir la concentration voulue. Le volume de solution mère ajouté ne devrait pas excéder le minimum pratique ($< 10 \%$ du volume de liquide final, si possible). Un autre procédé consiste à dissoudre la substance d'essai dans un plus grand volume d'eau d'essai, au lieu de recourir à des solvants organiques, par exemple.

S'il est impossible de procéder autrement, les solutions mères de substances non volatiles et peu solubles dans l'eau sont préparées à l'aide d'un solvant organique volatil, mais la quantité de solvant ajoutée au système expérimental ne doit pas dépasser 1% v/v, ni nuire à l'activité microbienne. Le solvant ne devrait pas affecter la stabilité de la substance d'essai dans l'eau. On enlève le solvant jusqu'à ce qu'il n'en subsiste qu'une quantité extrêmement faible, de façon à ce qu'il n'augmente pas sensiblement la teneur en COD de l'eau ou de la suspension d'essai. Ce point est à vérifier par une analyse de la substance d'essai ou, si possible, du COD (6). On veillera à limiter la quantité de solvant transférée au strict minimum pour dissoudre la quantité de substance d'essai dans le volume final d'eau d'essai. D'autres techniques permettant d'introduire la substance d'essai dans les récipients expérimentaux peuvent être utilisées, comme cela a été décrit dans les références (7) et (8). Lorsqu'on utilise un solvant organique pour appliquer la substance d'essai, les témoins au solvant contenant l'eau d'essai (sans aucun ajout) et l'eau d'essai additionnée de la substance de référence devraient être traités de la même manière que les récipients expérimentaux renfermant la substance d'essai véhiculée par le solvant. Les témoins au solvant servent à mettre en évidence d'éventuels effets nocifs de ce dernier pour la flore microbienne, d'après la dégradation de la substance de référence.

1.8.8 **Conditions expérimentales**

1.8.8.1 *Température*

L'incubation devrait avoir lieu dans l'obscurité (de préférence) ou sous une lumière diffuse, à une température réglée ($\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) qui peut être la température relevée sur le site ou une température standard de $20\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$. La température du site peut être la température de l'échantillon au moment du prélèvement ou une température moyenne du site de prélèvement.

1.8.8.2 *Agitation*

Il convient de fournir une agitation continue, afin de maintenir les particules et les microorganismes en suspension. L'agitation facilite également le transfert d'oxygène de l'espace libre situé au-dessus du liquide vers le liquide, ce qui permet de maintenir correctement l'aérobiose. Les flacons sont placés sur une table tournante (agitation d'environ 100 rpm) ou munis d'agitateurs magnétiques. L'agitation doit être continue, mais aussi douce que possible, de façon à maintenir l'homogénéité de la suspension.

1.8.8.3 *Durée de l'essai*

La durée de l'essai ne devrait normalement pas dépasser 60 jours, à moins qu'on ait opté pour le procédé semi-continu avec renouvellement périodique de la suspension expérimentale (voir paragraphe 1.8.6 et annexe 2). Toutefois, l'essai par lots peut-être

prolongé jusqu'à 90 jours au maximum si la dégradation de la substance d'essai a débuté au cours des 60 premiers jours. La dégradation est contrôlée, à intervalles appropriés, par la détermination de l'activité du ^{14}C résiduel ou du $^{14}\text{CO}_2$ dégagé (voir paragraphe 1.8.9.4) et/ou par analyse chimique (paragraphe 1.8.9.5). Le temps d'incubation doit être suffisamment long pour permettre d'évaluer le processus de dégradation. Il serait préférable que la dégradation excède 50 % ; pour les substances lentement dégradables, le degré de dégradation doit être suffisant (normalement supérieur à 20 %) pour permettre l'estimation d'une constante cinétique de la vitesse de dégradation.

Le pH et la concentration d'oxygène sont à mesurer périodiquement dans le système expérimental, à moins que l'expérience acquise par des essais identiques menés sur des échantillons d'eau et de sédiments prélevés sur le même site ne rende ces mesures superflues. Dans certaines conditions, le métabolisme de substrats primaires présents à des concentrations bien plus élevées dans l'eau ou le sédiment pourrait engendrer un dégagement de CO_2 et une diminution d'oxygène tels qu'ils modifieraient sensiblement les conditions expérimentales durant l'essai.

1.8.9 Mode opératoire

1.8.9.1 *Préparation des flacons destinés à l'essai pélagique*

On transfère un volume approprié d'au moins quelque 100 ml d'eau d'essai dans les flacons expérimentaux, de façon à les remplir environ au tiers. Si on utilise plusieurs flacons (de façon à prélever des flacons entiers à chaque moment de prélèvement), le volume approprié d'eau d'essai s'élève aussi à environ 100 ml, les petits volumes risquant d'influencer la longueur de la phase de latence. La substance d'essai est ajoutée à partir d'une solution mère, comme décrit aux paragraphes 1.8.2 et 1.8.7. Il faudrait utiliser au moins deux concentrations de la substance d'essai, espacées d'un facteur de 5 à 10, pour déterminer la cinétique de dégradation et calculer la constante cinétique de la vitesse de dégradation. Les deux concentrations choisies devraient être inférieures à 100 $\mu\text{g/l}$ et de préférence comprises dans l'intervalle 1-10 $\mu\text{g/l}$.

Les flacons sont fermés avec des bouchons ou des couvercles étanches à l'air et au CO_2 . Pour les substances d'essai non volatiles et non marquées au ^{14}C , des tampons d'ouate empêchant la contamination par l'air suffisent (voir paragraphe 1.8.1), à condition que les principaux produits de dégradation soient notoirement non volatils et que l'on procède à une détermination indirecte du CO_2 (voir Annexe 3).

Les flacons sont incubés à la température choisie (voir paragraphe 1.8.8.1). Les échantillons destinés à l'analyse chimique ou à la détermination du ^{14}C sont prélevés au début de l'essai (avant le début de la biodégradation; voir paragraphe 1.7.1), puis à une fréquence appropriée au cours de l'essai. Le prélèvement peut s'effectuer par l'extraction de sous-échantillons (aliquotes de 5 ml, par exemple) de chaque expérience identique ou par la collecte de flacons entiers à chaque moment de prélèvement. La minéralisation de la substance d'essai se détermine directement ou indirectement (voir Annexe 3). Habituellement, il est nécessaire d'inclure au moins cinq points de prélèvement durant la phase de dégradation (après la fin de la phase de latence) pour estimer une constante de vitesse fiable, sauf si l'on peut justifier que trois points de prélèvement suffisent pour les substances rapidement dégradables. Les substances à dégradation lente se prêtent aisément à plus de mesures durant la phase de dégradation, si bien qu'il faut inclure plus de points pour l'estimation de k . Il est impossible de prescrire un calendrier fixe pour les prélèvements puisque la vitesse de biodégradation varie; on recommande toutefois d'effectuer un prélèvement par semaine si la dégradation est lente. Si la substance d'essai se dégrade rapidement, les prélèvements devraient avoir lieu une fois par jour durant les trois premiers jours, puis tous les deux ou trois jours. Dans certaines circonstances, notamment dans le cas de substances s'hydrolysant très rapidement, il pourra être nécessaire de

pratiquer un prélèvement horaire. On recommande d'effectuer une étude préliminaire avant l'essai, afin de déterminer le rythme de prélèvement approprié. Si l'on doit conserver des échantillons en vue d'autres analyses spécifiques, il est préférable de prélever davantage d'échantillons et de sélectionner ensuite ceux à analyser à la fin de l'expérience suivant une logique d'ordre inverse, c'est-à-dire que les derniers échantillons seront analysés en premier (le deuxième alinéa du paragraphe 1.8.9.5 donne des conseils sur la façon de préserver la stabilité des échantillons durant le stockage).

1.8.9.2 *Nombre de flacons et d'échantillons*

Préparer suffisamment de flacons expérimentaux de façon à disposer de :

- flacons d'essai : au moins deux flacons pour chaque concentration de la substance d'essai (de préférence au moins 3) ou une série de flacons d'essai pour chaque concentration si des flacons entiers sont prélevés à chaque moment de prélèvement (symbolisés par F_T) ;
- flacons d'essai pour le calcul du bilan massique : au moins deux flacons pour chaque concentration expérimentale (symbolisés par F_M) ;
- témoins sans substance d'essai : au moins un flacon ne contenant que l'eau d'essai (symbolisé par F_B) ;
- témoins de référence : deux flacons contenant la substance de référence (aniline ou benzoate de sodium, par exemple, à 10 $\mu\text{g/l}$) (symbolisés par F_C). Le témoin de référence sert à confirmer l'existence d'une activité microbienne minimale. S'il y a lieu, une substance de référence radiomarquée peut être utilisée, y compris lorsque la dégradation de la substance d'essai est suivie par des analyses chimiques ;
- témoins stériles : un ou deux flacons contenant de l'eau d'essai stérilisée pour vérifier l'existence éventuelle d'une dégradation abiotique ou d'une autre élimination non biologique de la substance d'essai (symbolisés par F_S). L'activité biologique peut être supprimée par autoclavage (121°C; 20 min) de l'eau d'essai ou par ajout d'un toxique (par exemple : azoture de sodium (NaN_3) à 10-20 g/l, chlorure de mercure (HgCl_2) à 100 mg/l ou formaline à 100 mg/l) ou par irradiation gamma. Si l'on utilise du HgCl_2 , il faudra l'éliminer comme un déchet toxique. Il est difficile de stériliser une eau renfermant une grande quantité de sédiments ajoutés; dans ce cas, un autoclavage répété est recommandé (par exemple trois fois). Il faut tenir compte du fait que les caractéristiques de sorption du sédiment peuvent être altérées par l'autoclavage.
- témoins au solvant contenant l'eau d'essai ainsi que l'eau d'essai et la substance de référence : des flacons en double exemplaire contenant la même quantité de solvant, appliquée de la même façon que la substance d'essai. Ces témoins servent à détecter une éventuelle nocivité du solvant, d'après la dégradation de la substance de référence.

En concevant l'essai, l'expérimentateur doit apprécier l'importance relative de l'augmentation du nombre d'expériences identiques au regard de l'augmentation de la fréquence des prélèvements. Le nombre exact de flacons requis dépendra de la méthode employée pour mesurer la dégradation (voir troisième alinéa du paragraphe 1.8.9.1 et du paragraphe 1.8.9.4 ainsi que l'annexe 3).

On prélève deux sous-échantillons (par exemple des aliquotes de 5 ml) dans chaque flacon expérimental, à chaque moment de prélèvement. Si on utilise une série de flacons afin de prélever des flacons entiers, il faut sacrifier au moins deux flacons à chaque moment de prélèvement (voir premier alinéa du paragraphe 1.8.9.1).

1.8.9.3 *Préparation des flacons destinés à l'essai en suspension de sédiments (facultatif)*

On verse les volumes nécessaires d'eau d'essai et de sédiments, le cas échéant, dans les flacons expérimentaux (voir paragraphe 1.8.5). Les flacons destinés à l'essai en suspension de sédiments sont préparés de la même façon que les flacons pour l'essai pélagique (voir paragraphes 1.8.9.1 et 1.8.9.2). On utilise de préférence des bouteilles à sérum ou des flacons ayant la même forme. Les flacons fermés sont placés horizontalement sur un agitateur. Il va de soi que les flacons ouverts contenant les substances non volatiles, non marquées au ^{14}C doivent être placés en position verticale ; dans ce cas, il est recommandé d'utiliser des agitateurs magnétiques et des barres magnétiques enrobées de verre. Si nécessaire, on aère les bouteilles pour maintenir une aérobiose adéquate.

1.8.9.4 *Déterminations radiochimiques*

Le $^{14}\text{CO}_2$ dégagé se mesure directement et indirectement (voir Annexe 3). Le $^{14}\text{CO}_2$ est mesuré indirectement d'après la différence entre l'activité initiale du ^{14}C dans l'eau d'essai ou la suspension et l'activité résiduelle totale au moment du prélèvement, mesurée après avoir acidifié l'échantillon à pH 2-3 et extrait le CO_2 . Le carbone minéral est ainsi éliminé et l'activité résiduelle mesurée provient des composés organiques. Le $^{14}\text{CO}_2$ ne doit pas être déterminé indirectement s'il y a des composés volatils parmi les principaux produits de transformation qui se forment (voir Annexe 3). Si possible, le dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ est mesuré directement (voir Annexe 3) à chaque moment de prélèvement dans au moins un flacon expérimental ; ce mode opératoire permet de vérifier le bilan massique et le processus de biodégradation, mais il ne convient qu'aux essais réalisés avec des flacons fermés.

Si le $^{14}\text{CO}_2$ dégagé est mesuré directement au cours de l'essai, il convient de prévoir un plus grand nombre de flacons à cet effet au début de l'essai. La détermination directe du $^{14}\text{CO}_2$ est recommandée s'il y a des composés volatils parmi les principaux produits de transformation de la substance d'essai. À chaque point de mesure, les flacons expérimentaux supplémentaires sont acidifiés à pH 2-3 et le $^{14}\text{CO}_2$ est collecté dans un absorbeur interne ou externe (voir Annexe 3).

On peut, si on le souhaite, déterminer les concentrations de la substance d'essai marquée au ^{14}C et des principaux produits de transformation par radiochromatographie (par exemple, chromatographie en couche mince, RAD-TLC) ou HPLC couplée à une détection radiochimique.

On peut aussi, si on le souhaite, déterminer la répartition entre les phases de la radioactivité restante (voir Annexe 1), ainsi que de la substance d'essai résiduelle et des produits de transformation.

À la fin de l'essai, le bilan massique devrait être établi par une mesure directe du $^{14}\text{CO}_2$, effectuée à l'aide de flacons expérimentaux distincts d'où aucun échantillon n'a été prélevé au cours de l'essai (voir Annexe 3).

1.8.9.5 *Analyse chimique spécifique*

Si l'on dispose d'une méthode analytique spécifique sensible, la biodégradation primaire peut être évaluée par une mesure de la concentration résiduelle totale de la substance d'essai, plutôt que par des techniques de radiomarquage. Si l'on utilise une substance d'essai radiomarquée (pour mesurer la minéralisation totale), des analyses chimiques spécifiques peuvent être pratiquées en parallèle pour fournir des informations supplémentaires utiles et vérifier le procédé. Des analyses chimiques spécifiques peuvent aussi être utilisées pour mesurer les produits de transformation formés durant la dégradation de la substance d'essai et cette procédure est recommandée pour les substances dont la demi-vie de minéralisation dépasse 60 jours. La concentration de la substance d'essai et des produits de transformation

à chaque moment de prélèvement devrait être mesurée et rapportée (en termes de concentration et de pourcentage appliqué). En général, les produits de transformation détectés à ≥ 10 % de la concentration appliquée, à un quelconque moment de prélèvement, doivent être identifiés à moins que le contraire se justifie. On envisagera aussi d'identifier les produits de transformation dont les concentrations s'accroissent continuellement au cours de l'étude, même si leur concentration n'atteint pas le seuil susmentionné, car cela pourrait être un signe de persistance. On envisagera d'analyser les produits de transformation présents dans les témoins stériles si une transformation abiotique rapide de la substance d'essai (par hydrolyse, par exemple) est jugée possible. La nécessité de quantifier et d'identifier les produits de transformation est à évaluer au cas par cas et à justifier dans le rapport. Les techniques d'extraction faisant appel à un solvant organique doivent être appliquées selon les instructions données pour le procédé d'analyse respectif.

Tous les échantillons doivent être stockés à une température de 2 à 4 °C dans des récipients étanches à l'air si l'analyse est réalisée dans les 24 heures, ce qui est préférable. Si la période de stockage est plus longue, les échantillons doivent être congelés à -18 °C ou conservés chimiquement. Il est déconseillé d'acidifier les échantillons pour les conserver, car l'acidification risque de les rendre instables. Si les échantillons ne sont pas analysés dans les 24 heures et sont conservés au-delà de ce délai, une étude de stabilité du stockage doit être effectuée pour démontrer la stabilité des produits chimiques en question à -18 °C ou dans des conditions de conservation. Si la méthode d'analyse requiert une extraction au solvant ou une extraction de la phase solide, l'extraction doit être menée immédiatement après le prélèvement ou après le stockage de l'échantillon au réfrigérateur durant 24 heures au maximum.

Suivant la sensibilité de la méthode analytique, il pourra être nécessaire de prélever des échantillons d'un volume supérieur à celui indiqué au paragraphe 1.8.1. Il est facile de réaliser l'essai avec des volumes d'un litre contenus dans des flacons d'une capacité de 2 à 3 litres, ce qui permet de recueillir des échantillons d'environ 100 ml.

2. **RÉSULTATS ET RAPPORT**

2.1 **TRAITEMENT DES RÉSULTATS**

2.1.1 **Représentation graphique des résultats**

Il convient d'arrondir les intervalles de prélèvement à un nombre d'heures entier (sauf si la substance se dégrade fortement en l'espace de quelques heures ou minutes), mais pas à un nombre de jours entier. On produit un tracé linéaire et un tracé semi-logarithmique des estimations de l'activité résiduelle de la substance d'essai (pour les substances marquées au ^{14}C) ou de la concentration résiduelle (pour les substances non marquées) en fonction du temps (voir figures 1a et 1b). S'il y a eu une dégradation, on compare les résultats des flacons F_T à ceux des flacons F_S . Si les moyennes des résultats des flacons contenant la substance d'essai (F_T) et des flacons stériles (F_S) s'écartent de moins de 10 %, on peut supposer que la dégradation observée est principalement abiotique. Si la dégradation mesurée dans les flacons F_S est inférieure, les résultats peuvent être utilisés pour corriger ceux obtenus dans les flacons F_T (par soustraction), en vue d'estimer l'ampleur de la biodégradation. Si des analyses facultatives sont effectuées sur les principaux produits de transformation, il faut fournir un tracé de leur formation et disparition en fonction du temps, en plus d'un tracé de la disparition de la substance d'essai.

On estime la durée de la phase de latence t_L à partir de la courbe de dégradation (tracé semi-logarithmique), en extrapolant sa partie linéaire jusqu'à une dégradation nulle ou en déterminant la durée d'une dégradation d'environ 10 % (voir figures 1a et 1b). À partir du tracé semi-logarithmique, on estime la constante de vitesse de premier ordre, k , et son

écart-type par régression linéaire du \ln (activité résiduelle du ^{14}C ou concentration de la substance d'essai) en fonction du temps. Avec les mesures du ^{14}C en particulier, on n'utilisera que les résultats se rapportant à la partie linéaire initiale de la courbe, située après la phase de latence, et l'on s'attachera à sélectionner un petit nombre de résultats représentatifs, plutôt qu'un grand nombre de résultats incertains. Ici, l'incertitude comprend les erreurs inhérentes à l'utilisation directe recommandée des activités résiduelles du ^{14}C mesurées (voir plus bas). Il peut parfois s'avérer pertinent de calculer deux constantes de vitesse différentes, si la dégradation suit un mode biphasique. À cet effet, on délimite deux phases différentes de la courbe de dégradation. Il convient de calculer la constante de vitesse, k , et la demi-vie, $t_{1/2} = \ln 2/k$, pour chacun des flacons des expériences identiques, lorsque des sous-échantillons sont prélevés à partir du même flacon, ou en utilisant les valeurs moyennes, lorsque l'on recueille des flacons entiers à chaque moment de prélèvement (voir paragraphe 1.8.9.2). Si l'on applique le premier procédé mentionné, la constante de vitesse et la demi-vie doivent être rapportées individuellement pour chacun des flacons en double et exprimées sous la forme d'une moyenne avec un écart-type. Si les concentrations de la substance d'essai sont élevées, la courbe de dégradation pourrait s'écarter considérablement d'une droite (tracé semi-logarithmique) et la cinétique de premier ordre risque de ne pas être valable. Dans ces circonstances, la détermination d'une demi-vie n'aurait pas de sens. Cependant, il est possible d'appliquer une cinétique de pseudo-premier ordre à une gamme limitée de résultats et d'estimer la demi-vie de dégradation TD_{50} (temps nécessaire pour atteindre 50 % de dégradation). On gardera toutefois à l'esprit qu'il est impossible de prédire la durée de la dégradation au-delà de la gamme limitée de résultats en utilisant la TD_{50} qui n'est qu'un descripteur d'un ensemble donné de résultats. Les outils analytiques facilitant les calculs statistiques et l'ajustement des courbes sont faciles à se procurer et l'usage de ce type de logiciel est recommandé.

Si des analyses chimiques spécifiques sont pratiquées, on estime les constantes de vitesse et les demi-vies pour la dégradation primaire comme indiqué plus haut pour la minéralisation totale. Si la dégradation primaire est le processus limitant, les résultats ponctuels se rapportant à la totalité du processus de dégradation peuvent quelquefois être utilisés. Et ce, parce qu'il s'agit de mesures directes, contrairement aux mesures de l'activité du ^{14}C .

Si l'on utilise des substances marquées au ^{14}C , le bilan massique devrait être exprimé en pourcentage de la concentration initiale appliquée, au moins à la fin de l'essai.

2.1.2 **Activité résiduelle**

Lorsque le fragment marqué au ^{14}C d'une substance organique est biodégradé, la majeure partie du ^{14}C est convertie en $^{14}\text{CO}_2$, tandis qu'une autre partie est mobilisée par la croissance de la biomasse et/ou la synthèse de métabolites extra-cellulaires. Aussi, la biodégradation complète, «finale», d'une substance ne correspond-elle pas à une conversion à 100 % de son carbone en $^{14}\text{CO}_2$. Le ^{14}C intégré aux produits biosynthétisés est ensuite libéré lentement sous la forme de $^{14}\text{CO}_2$ à la suite d'une «minéralisation secondaire». C'est pourquoi les tracés de l'activité du ^{14}C organique résiduel (mesurée après l'extraction du CO_2) ou du $^{14}\text{CO}_2$ produit en fonction du temps se prolongent au-delà de la fin de la dégradation. Cela complique l'interprétation cinétique des résultats, de sorte que seule la première partie de la courbe (juste après la fin de la phase de latence et avant que la dégradation atteigne environ 50 %) devrait normalement être utilisée pour l'estimation de la constante de vitesse de dégradation. Si la substance d'essai est dégradée, l'activité du ^{14}C résiduel organique total est toujours supérieure à l'activité du ^{14}C associée à la substance d'essai intacte restante. Si la substance d'essai est dégradée par une réaction de premier ordre et qu'une fraction constante α est minéralisée en CO_2 , la pente initiale de la courbe de disparition du ^{14}C (^{14}C organique total en fonction du temps) sera égale à α fois la pente de la courbe correspondante de concentration de la substance d'essai (ou, plus précisément, du fragment de la substance d'essai marqué au ^{14}C). Les mesures de l'activité du ^{14}C organique

total utilisées n'étant pas corrigées, la constante de vitesse de dégradation sera calculée avec une marge de sécurité. Des procédés permettant d'estimer les concentrations de la substance d'essai à partir des activités radiochimiques mesurées, sur la base de diverses hypothèses simplificatrices, ont été décrits dans des publications (2)(9)(10)(11). Ces procédés s'appliquent le plus facilement aux substances rapidement dégradables.

2.2 INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

S'il s'avère que k est indépendant de la concentration (si le k calculé est à peu près identique aux différentes concentrations de la substance d'essai), on peut supposer que la constante de vitesse de premier ordre est représentative des conditions expérimentales appliquées, à savoir la substance d'essai, l'échantillon d'eau et la température de l'essai. Il appartient à un expert d'apprécier dans quelle mesure les résultats peuvent être généralisés ou extrapolés à d'autres systèmes. Si la substance d'essai est testée à une concentration élevée et que, de ce fait, la dégradation n'obéit pas à une cinétique de premier ordre, les résultats ne peuvent servir à estimer directement une constante de vitesse de premier ordre ou la demi-vie correspondante. Cependant, les données fournies par un essai mené à une concentration élevée de la substance d'essai peuvent toujours être utilisées pour estimer le degré de minéralisation totale et/ou détecter et quantifier les produits de transformation.

Si les vitesses de phénomènes de disparition autres que la biodégradation sont connues (hydrolyse ou volatilisation, par exemple), elles peuvent être soustraites de la vitesse de disparition nette relevée durant l'essai, pour fournir une estimation approximative de la vitesse de biodégradation. Les valeurs concernant l'hydrolyse peuvent, par exemple, être obtenues à partir du témoin stérile ou d'un essai parallèle mené à une concentration plus élevée de la substance d'essai.

Les déterminations indirecte et directe du $^{14}\text{CO}_2$ (paragraphe 1.8.9.4 et annexe 3) ne peuvent être utilisées que pour mesurer l'ampleur de la minéralisation de la substance d'essai en CO_2 . La radiochromatographie en couche mince (RAD-TLC) ou la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) peuvent servir à analyser la concentration de la substance d'essai marquée au ^{14}C et la formation des principaux produits de transformation (troisième alinéa du paragraphe 1.8.9.4). La demi-vie ne peut être estimée directement qu'en l'absence de tous les principaux produits de transformation (définis comme étant $\geq 10\%$ de la quantité de substance d'essai appliquée). En présence de produits de transformation principaux (selon la définition ci-dessus), une évaluation détaillée des résultats est requise. Cette évaluation peut inclure l'essai et/ou l'identification répétés des produits de transformation (voir premier alinéa du paragraphe 1.8.9.5), à moins que le devenir des produits de transformation ne puisse être raisonnablement évalué d'après l'expérience antérieure (par exemple, des informations sur les voies de dégradation). La proportion de carbone de la substance d'essai convertie en CO_2 variant (en grande partie en fonction de la concentration de la substance d'essai et des autres substrats disponibles, des conditions expérimentales et de la flore microbienne), cet essai ne permet pas d'estimer directement la biodégradation finale, comme dans un essai de disparition du carbone organique dissous; mais le résultat est similaire à celui obtenu avec l'essai au respiromètre. Le degré de minéralisation sera donc inférieur ou égal au degré minimal de biodégradation finale. Pour obtenir un tableau plus complet de la biodégradation finale (minéralisation et incorporation dans la biomasse), il faudrait analyser la répartition du ^{14}C entre les phases à la fin de l'essai (voir Annexe 1). Le ^{14}C présent dans les matières particulaires consistera en ^{14}C incorporé dans la biomasse bactérienne et en ^{14}C sorbé sur les particules organiques.

2.3 VALIDITÉ DE L'ESSAI

Si la substance de référence ne se dégrade pas au cours de la période prévue (pour l'aniline et le benzoate de sodium, généralement moins de deux semaines), la validité de l'essai est incertaine et demande à être vérifiée ; sinon, l'essai peut aussi être répété avec un nouvel échantillon d'eau. À l'issue d'un essai tournant de la méthode, organisé par l'ISO, auquel sept laboratoires européens ont participé, les constantes de vitesse de dégradation adaptées de l'aniline s'échelonnaient entre 0,3 et 1,7 jour⁻¹, avec une moyenne de 0,8 jour⁻¹ à 20°C et un écart-type de ±0,4 jour⁻¹ ($t_{1/2} = 0,9$ jour). Les périodes de latence étaient généralement comprises entre 1 et 7 jours. Les eaux examinées renfermaient une biomasse bactérienne correspondant à 10³ - 10⁴ unités formant colonie par ml. Les eaux riches en éléments nutritifs de l'Europe tempérée accusaient des vitesses de dégradation supérieures aux eaux oligotrophes de l'Europe septentrionale, probablement à cause d'une différence d'état trophique ou d'une exposition préalable à des substances chimiques.

La récupération totale (bilan massique) à la fin de l'expérience devrait se situer entre 90 % et 110 % pour les substances radiomarquées, tandis que le taux de récupération au début de l'expérience devrait être compris entre 70 % et 110 % pour les substances non marquées. Toutefois, ces gammes ne sont mentionnées qu'à titre indicatif et ne devraient pas servir de critère d'acceptation pour l'essai.

3. RAPPORT D'ESSAI

Le type d'essai, à savoir pélagique ou en suspension de sédiments, doit être stipulé clairement dans le rapport d'essai, qui fournira également, au minimum, les informations suivantes :

Substance d'essai et substance(s) de référence :

- noms courants, noms chimiques (suivant la nomenclature recommandée par l'IUPAC et/ou le CAS), numéros CAS, formule structurale (indiquant la position du ¹⁴C, dans le cas d'une substance radiomarquée) et propriétés physico-chimiques pertinentes de la substance d'essai et de la (des) substance(s) de référence (voir paragraphes 1.5 et 1.6);
- noms chimiques, numéros CAS, formule structurale (indiquant la position du ¹⁴C, dans le cas d'une substance radiomarquée) et propriétés physico-chimiques pertinentes des substances servant d'étalon pour l'identification et la quantification des produits de transformation;
- pureté (impuretés) de la substance d'essai et de la (des) substance(s) de référence ;
- pureté radiochimique de la substance marquée et activité spécifique (le cas échéant).

Eau superficielle :

Il convient de fournir, au minimum, les informations suivantes sur l'échantillon d'eau prélevé :

- localisation et description du site de prélèvement et, si possible, son histoire en matière de contamination ;
- date et heure du prélèvement de l'échantillon ;
- éléments nutritifs (N total, ammonium, nitrite, nitrate, P total, orthophosphate dissous) ;
- profondeur du prélèvement ;
- aspect de l'échantillon (couleur et turbidité, par exemple) ;

- carbone organique dissous et carbone organique total;
- demande biologique en oxygène;
- température et pH sur le lieu et à l'heure du prélèvement;
- oxygène ou potentiel redox (obligatoire seulement si l'aérobiose n'est pas évidente);
- salinité ou conductivité (dans le cas d'une eau de mer ou d'une eau saumâtre);
- solides en suspension (dans le cas d'un échantillon trouble);
- éventuellement autres informations pertinentes sur le lieu de prélèvement au moment du prélèvement (par exemple, données actuelles ou antérieures sur le débit des cours d'eau ou les courants marins, présence d'importantes sources de rejets à proximité et nature des rejets, conditions météorologiques précédant le moment du prélèvement),

et, à titre facultatif :

- biomasse microbienne (comptage direct à l'orangé d'acridine ou unités formant colonie, par exemple);
- carbone minéral;
- estimation de la biomasse des algues d'après la concentration en chlorophylle a.

De surcroît, si l'essai est réalisé en suspension de sédiments, il faudrait fournir les renseignements suivants sur le sédiment :

- profondeur de prélèvement du sédiment ;
- aspect du sédiment (coloré, boueux, vaseux ou sableux, par exemple) ;
- texture (pourcentages de sable grossier, sable fin, limon et argile, par exemple) ;
- poids sec en g/l des solides suspendus, concentration du carbone organique total ou mesure de la teneur en matière organique d'après la perte de poids à l'incinération ;
- pH ;
- oxygène ou potentiel redox (obligatoire seulement si l'aérobiose n'est pas évidente).

Conditions expérimentales :

- temps écoulé entre le prélèvement de l'échantillon et son utilisation dans l'essai en laboratoire, stockage et traitement préalable de l'échantillon, dates auxquelles les études ont été menées ;
- quantité de substance d'essai appliquée, concentration expérimentale et substance(s) de référence ;
- méthode d'application de la substance d'essai, notamment utilisation de solvants, le cas échéant ;
- volume d'eau superficielle utilisé, et de sédiment le cas échéant, et volume prélevé à chaque moment d'analyse ;
- description du système expérimental utilisé ;

si l'obscurité ne s'impose pas, informations sur les paramètres de la lumière diffuse ;

- informations sur la ou les méthodes utilisées pour préparer des témoins stériles (température, durée et nombre d'autoclavages, par exemple) ;
- température d'incubation ;

- renseignements sur les techniques analytiques et la ou les méthodes appliquées pour les mesures radiochimiques, la vérification du bilan massique et la détermination de la répartition entre les phases (le cas échéant);
- nombre d'expériences identiques;

Résultats :

- pourcentages de récupération (voir paragraphe 1.7.1);
- répétabilité et sensibilité des méthodes analytiques employées, y compris les seuils de détection et de quantification (voir paragraphe 1.7.2);
- toutes les données mesurées (y compris les heures de prélèvement), les valeurs calculées présentées sous forme de tableau et les courbes de dégradation ; pour chaque concentration expérimentale et chaque flacon en double, indiquer le coefficient de corrélation linéaire de la pente du tracé logarithmique, la durée estimée de la phase de latence, une constante de vitesse de premier ordre ou de pseudo-premier ordre (si possible) et la demi-vie de dégradation correspondante (ou le temps de demi-vie, $t_{1/2}$) ;
- consigner les valeurs importantes telles que les moyennes des résultats observés pour chaque double, par exemple la longueur de la phase de latence, la constante de vitesse de dégradation et la demi-vie de dégradation (ou $t_{1/2}$);
- déterminer si le système est adapté ou non, d'après l'aspect de la courbe de dégradation et l'influence éventuelle de la concentration d'essai ;
- résultats de la vérification du bilan massique final et résultats des mesures de la répartition entre les phases (le cas échéant) ;
- fraction de ^{14}C minéralisé et, si des analyses spécifiques ont été menées, niveau final de la dégradation primaire ;
- identification, concentration molaire et pourcentage des principaux produits de transformation (voir premier alinéa du paragraphe 1.8.9.5), le cas échéant ;
- proposition d'un chemin réactionnel pour la transformation, s'il y a lieu ;
- analyse des résultats.

4. **BIBLIOGRAPHIE**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test
2. ISO/DIS 14592-1 (1999). Qualité de l'eau – Évaluation de la biodégradabilité aérobie des composés organiques présents en faibles concentrations – Partie 1 : Essai en lots de flacons agités avec des eaux de surface ou des suspensions eaux de surface/sédiments.
3. Méthode d'essai C.23. Transformation aérobie et anaérobie dans les systèmes sédimentaires aquatiques.
4. Méthode d'essai C.24. Transformation aérobie et anaérobie dans le sol.
5. OCDE (1993). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris.
6. ISO 8245 (1999). Qualité de l'eau – Lignes directrices pour le dosage du carbone organique total (COT) et du carbone organique dissous (COD).
7. ISO 10634 (1995). Qualité de l'eau – Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22 (to be published summer 2000).
9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394-401.
10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ¹⁴C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274-283.
11. ISO/CD 14592-1 (1999). Qualité de l'eau – Évaluation de la biodégradabilité aérobie des composés organiques présents en faibles concentrations – Partie 1 : Essai en lots de flacons agités avec des eaux de surface ou des suspensions eaux de surface/sédiments.

ANNEXE 1

RÉPARTITION DU ^{14}C ENTRE LES PHASES

Afin de contrôler le procédé employé, il convient de compléter les mesures systématiques de l'activité totale du ^{14}C organique (AOT) résiduel par des mesures du bilan massique comportant une détermination directe du $^{14}\text{CO}_2$ émis après piégeage dans un absorbeur (voir Annexe 3). En soi, la formation de $^{14}\text{CO}_2$ constitue une preuve directe de biodégradation, par opposition à la dégradation abiotique ou à d'autres mécanismes de disparition, tels que la volatilisation et la sorption. D'autres renseignements utiles caractérisant la biodégradabilité peuvent être tirés des mesures de la répartition de l'AOT entre la phase dissoute (activité du ^{14}C organique dissous, AOD) et la phase particulaire (activité du ^{14}C organique particulaire, AOP), après la séparation des particules par filtration sur membrane ou centrifugation. L'AOP se rapporte à la substance d'essai sorbée sur la biomasse microbienne et sur d'autres particules ainsi qu'au carbone de la substance d'essai qui a été mobilisé pour synthétiser de nouveaux matériaux cellulaires et incorporé de ce fait dans la fraction particulaire de la biomasse. La formation du ^{14}C organique dissous peut être estimée d'après l'AOD à la fin de la biodégradation (plateau sur la courbe de dégradation en fonction du temps).

On estime la répartition du ^{14}C résiduel entre les phases dans des échantillons choisis en filtrant les échantillons sur un filtre à membrane composé d'un matériau qui n'adsorbe, le cas échéant, que des quantités négligeables de la substance d'essai (les filtres en polycarbonate, par exemple, conviennent) et dont les pores mesurent 0,22 μm ou 0,45 μm . Si la sorption de la substance d'essai sur le filtre est trop importante pour être négligée (à vérifier avant l'expérience), la filtration peut être remplacée par une centrifugation à grande vitesse (2 000 g ; 10 min).

Le filtrat ou le centrifugat sont traités comme les échantillons non filtrés (voir à l'Annexe 3). Les membranes des filtres sont dissoutes dans un liquide à scintillation approprié et le comptage s'effectue comme d'habitude, en principe uniquement à l'aide de la méthode du quotient avec un étalon externe pour corriger l'extinction, ou à l'aide d'un dispositif oxydant l'échantillon. Si l'on a utilisé la centrifugation, il faut resuspendre la boulette formée par la fraction particulaire dans 1 à 2 ml d'eau distillée et transférer le tout dans un petit tube à scintillation. Après deux rinçages du tube à centrifuger avec 1 ml d'eau distillée, l'eau de rinçage est transférée dans le petit tube à scintillation. Si nécessaire, la suspension peut être incorporée à un gel pour le comptage par scintillation liquide.

ANNEXE 2

PROCÉDÉ SEMI-CONTINU

Il est parfois nécessaire de prolonger l'incubation durant plusieurs mois afin de dégrader suffisamment les substances récalcitrantes. L'essai ne doit normalement pas dépasser 60 jours, sauf si les caractéristiques de l'échantillon d'eau original sont maintenues grâce au renouvellement de la suspension d'essai. Cependant, la durée de l'essai peut être prolongée jusqu'à 90 jours maximum sans renouvellement de la suspension d'essai si la dégradation de la substance d'essai a débuté au cours des 60 premiers jours.

Si l'incubation couvre une longue période, la diversité de la flore microbienne risque de s'amenuiser, du fait de divers mécanismes de disparition et de l'appauvrissement possible de l'échantillon d'eau en éléments nutritifs essentiels et en substrats carbonés primaires. Il est donc recommandé de recourir à l'essai semi-continu pour déterminer correctement la vitesse de dégradation des substances qui se dégradent lentement. L'essai devrait débuter par un procédé semi-continu si des données expérimentales laissent supposer qu'une période d'incubation de trois mois est nécessaire pour que la substance se dégrade à 20 %. Sinon, l'essai en lots peut être converti en essai semi-continu si la substance d'essai ne s'est pas dégradée au terme d'un essai en lots mené sur une soixantaine de jours. Il est possible de mettre fin à un essai semi-continu et de poursuivre l'expérience selon le procédé en lots si une dégradation substantielle a été enregistrée (> 20 %, par exemple).

Dans l'essai semi-continu, toutes les deux semaines, environ un tiers du volume de la suspension d'essai est remplacé par un volume d'eau venant d'être prélevé, dans lequel a été ajoutée la quantité requise de substance d'essai pour rétablir sa concentration initiale. De la même façon, on ajoute la quantité nécessaire de sédiment dans l'eau de remplacement pour rétablir la concentration initiale de sédiment (entre 0,01 et 1 g/l) si l'on effectue l'essai facultatif en suspension de sédiments. Si l'essai est mené avec des sédiments solides en suspension, il importe que le système demeure totalement suspendu et ce, également lors du renouvellement de l'eau, et il convient d'appliquer un temps de séjour identique pour les solides et l'eau, sinon on risquerait de perdre la similarité voulue avec un système aqueux homogène sans phases fixes. C'est pourquoi, il est préférable que la concentration initiale des sédiments suspendus se situe dans la partie inférieure de l'intervalle spécifié lorsqu'on utilise un procédé semi-continu.

L'ajout de la substance d'essai, tel qu'il est prescrit, implique que le renouvellement partiel de la suspension d'essai n'entraîne pas de dépassement de la concentration initiale de la substance d'essai, et qu'on évite par conséquent l'adaptation couramment observée avec des concentrations élevées de la substance d'essai. Le procédé prévoyant une réinoculation et une compensation des carences en éléments nutritifs et en substrats primaires, la diversité microbienne originale est rétablie et la durée de l'essai peut, en principe, être prolongée à l'infini. Lorsqu'on applique le procédé semi-continu, il est important de noter que la concentration résiduelle de la substance d'essai doit être corrigée en fonction des quantités de substance d'essai ajoutées et ôtées à chaque renouvellement. La concentration totale de la substance d'essai et sa concentration à l'état dissous peuvent être utilisées de façon interchangeable pour les composés peu sujets à la sorption. La sorption est négligeable (< 5%) dans les conditions spécifiées (0,1-1 g solides/l) pour les substances dont le $\log K_{oc} < 3$ (valable pour les substances neutres, lipophiles). L'exemple de calcul présenté ci-dessous illustre ce qui précède. En gros, 0,1 g/l de solides correspond à 10 mg de carbone par litre (fraction de carbone $f_C = 0,01$).

Soit :

Log K_{oe} (de la substance d'essai) = 3

$$K_{co} = 0,42 \cdot K_{oe}$$

Coefficient de partage, $K_d = f_C \cdot K_{co}$

alors, la fraction dissoute de la concentration totale (C-eau (C_e)/C-total (C_t)) est égale à :

$$C_e/C_t = 1/(1 + K_d \cdot SS) = 1/(1 + K_{co} \cdot f_C \cdot SS) = 1/(1 + 0,42 \cdot 10^3 \cdot 0,01 \cdot 0,1 \cdot 10^{-3}) = 0,999$$

ANNEXE 3

DÉTERMINATION DU $^{14}\text{CO}_2$

Détermination indirecte du $^{14}\text{CO}_2$

Pour les mesures systématiques, la méthode indirecte est normalement la plus rapide et la plus précise, si la substance d'essai est non volatile et ne se transforme pas en produits volatils. Pour ce faire, il suffit de transférer des échantillons non filtrés, d'un volume de 5 ml par exemple, dans des tubes à scintillation. L'activité initiale adéquate des échantillons est comprise entre 5 000 dpm et 10 000 dpm (80-170 Bq) et l'activité initiale minimale est de quelque 1 000 dpm. Le CO_2 doit être extrait après acidification à pH 2-3 avec une ou deux gouttes d' H_3PO_4 ou d' HCl concentrés. L'extraction du CO_2 peut se faire par barbotage à l'air durant 1/2 heure à 1 heure. Sinon, les flacons peuvent être agités vigoureusement durant une à deux heures (par exemple sur un agitateur à microplaque) ou plus doucement, mais jusqu'au lendemain. Il faut vérifier l'efficacité du procédé d'extraction du CO_2 (en prolongeant l'aération ou la durée de l'agitation). Ensuite, un liquide à scintillation approprié au comptage des échantillons aqueux est ajouté et l'échantillon est homogénéisé au moyen d'un mélangeur rotatif ; on détermine la radioactivité par comptage en scintillation liquide en retranchant l'activité de fond relevée sur les témoins (F_B). À moins que l'eau d'essai ne soit très colorée ou renferme une concentration élevée de particules, les échantillons présentent normalement une extinction uniforme et il suffit de corriger l'extinction à l'aide d'un étalon externe. Si l'eau d'essai est très colorée, il peut être nécessaire de corriger l'extinction par ajout d'un étalon interne. Si la concentration des particules est élevée, il peut s'avérer impossible d'obtenir une solution ou un gel homogène, ou la variation d'extinction entre les échantillons risque d'être importante. Dans ce cas, la méthode de comptage décrite ci-après pour les boues d'essai peut être utilisée. Si l'essai est mené en suspension de sédiments, on peut mesurer le $^{14}\text{CO}_2$ indirectement en prenant un échantillon homogène de 10 ml de l'eau/suspension d'essai et en séparant les phases par centrifugation à une vitesse appropriée (par exemple à 40 000 m/s^2 durant 15 min). La phase aqueuse doit ensuite être traitée comme décrit plus haut. On détermine l'activité du ^{14}C de la phase particulaire (AOP) en resuspendant le sédiment dans un petit volume d'eau distillée, en le transférant dans des tubes à scintillation et en ajoutant un liquide à scintillation de façon à obtenir un gel (il existe des liquides à scintillation spécialement destinés à cet usage). Selon la nature des particules (par exemple, leur teneur en matières organiques), il peut être possible de faire digérer l'échantillon par un solubilisant pour tissus en le laissant agir jusqu'au lendemain et de l'homogénéiser ensuite avec un mélangeur rotatif, avant d'ajouter le liquide à scintillation. Sinon, l'AOP peut être déterminée par combustion en excès d'oxygène au moyen d'un dispositif oxydant l'échantillon. Des étalons internes doivent toujours être inclus lors du comptage et il est parfois nécessaire de corriger l'extinction en ajoutant un étalon interne pour chaque échantillon.

Détermination directe du $^{14}\text{CO}_2$

Si le $^{14}\text{CO}_2$ dégagé est mesuré directement, il faut prévoir un plus grand nombre de flacons au début de l'essai, prélever les flacons d'essai à chaque moment de mesure, acidifier leur contenu à pH 2-3 et recueillir le $^{14}\text{CO}_2$ dans un absorbeur interne (disposé dans chaque flacon d'essai au début de l'essai) ou externe. Un milieu absorbant alcalin (par exemple une solution 1 N de NaOH ou une pastille de NaOH), ou constitué d'éthanolamine ou à base d'éthanolamine, ainsi que les absorbeurs vendus dans le commerce peuvent être utilisés. Pour la mesure directe du $^{14}\text{CO}_2$, les flacons doivent être fermés au moyen de bouchons cloisonnés (septa) en caoutchouc butylique, par exemple.

Figure 1a. Exemple d'un tracé arithmétique des résultats (activité résiduelle en fonction du temps)

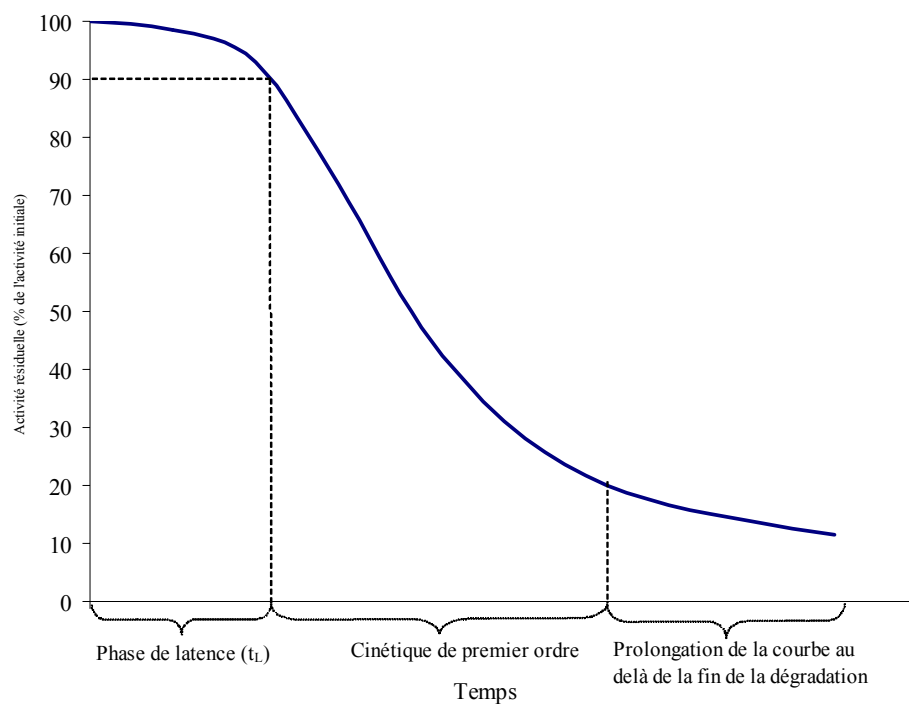
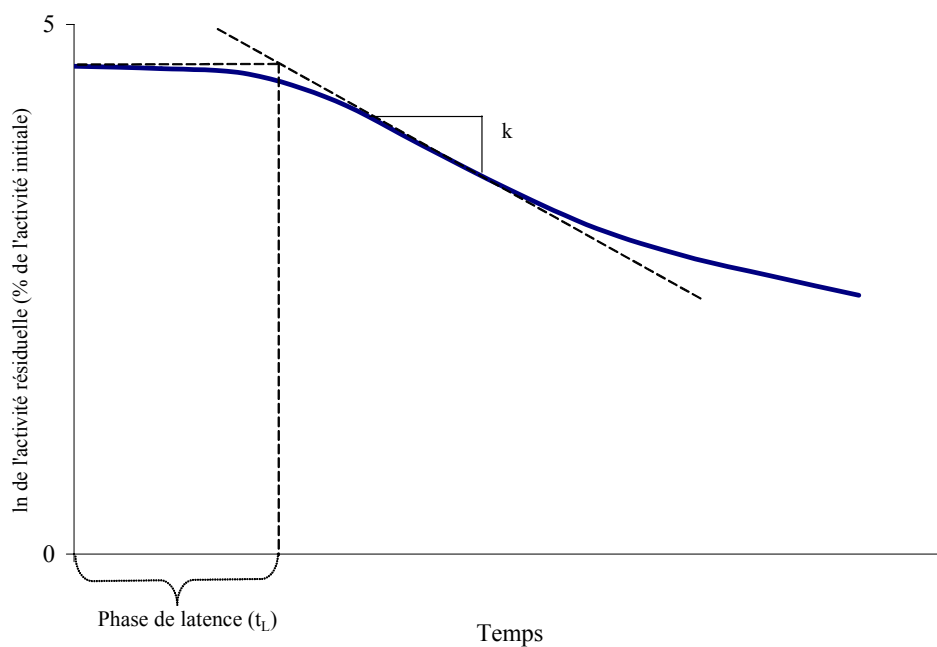


Figure 1b. Exemple de tracé semi-logarithmique des résultats (ln de l'activité résiduelle en fonction du temps)



Annexe VI

C.26. *Lemna* sp. ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE

1. MÉTHODE

La présente méthode est équivalente à la ligne directrice TG 221 (2006) de l'OCDE (1). Il existe un vaste consensus des autorités de l'UE sur le fait que l'essai sur les *Lemna* constitue une solution de substitution acceptable à un essai sur les algues pour les substances fortement colorées (2) (3).

1.1 INTRODUCTION

Cette méthode d'essai est destinée à évaluer la toxicité de substances sur des plantes dulcicoles du genre *Lemna* (lentille d'eau). Conçue à partir de lignes directrices existantes (4)(5)(6)(7)(8)(9), elle a fait l'objet de modifications afin de tenir compte des dernières avancées en recherche et des consultations d'experts sur un certain nombre de points essentiels. La méthode proposée ici a été validée par un essai tournant international (10).

Cette méthode d'essai décrit des essais de toxicité sur *Lemna gibba* et *Lemna minor*, deux espèces abondamment étudiées et visées par les références susmentionnées. La taxonomie des espèces du genre *Lemna* est complexe, notamment à cause de l'existence des nombreux phénotypes. Bien qu'il puisse y avoir une variation génétique pour la réaction des espèces de *Lemna* aux toxiques, nous ne sommes pas encore en mesure de recommander l'usage d'un clone particulier pour cette méthode d'essai, faute de données suffisantes sur cette source de variabilité. Notons que cet essai n'est pas réalisé dans des conditions axéniques, mais qu'à différentes étapes du mode opératoire il inclut des mesures permettant de limiter au maximum la contamination par d'autres organismes.

Les procédés avec renouvellement (semi-statique et à écoulement continu dit «dynamique») et sans renouvellement (statique) de la solution expérimentale sont décrits en détail. En fonction des objectifs de l'essai et des exigences réglementaires, on envisagera d'appliquer les méthodes semi-statique et dynamique, par exemple pour les substances qui disparaissent rapidement de la solution par volatilisation, photodégradation, précipitation ou biodégradation. Des orientations supplémentaires sont fournies dans la référence (11).

1.2 DÉFINITIONS

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

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

Chlorose : jaunissement du tissu des thalles.

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

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

CE_x : concentration de la substance d'essai dissoute dans le milieu d'essai entraînant une réduction de x% (par exemple 50 %) de la croissance de *Lemna* durant une période d'exposition définie (à mentionner explicitement si elle dépasse la durée normale ou totale de l'essai). Afin de distinguer les valeurs de la CE mesurées en fonction du taux de

croissance de celles mesurées en fonction du rendement, on utilise les abréviations CE_t , s'agissant du taux de croissance, et CE_r , s'agissant du rendement, suivies par la mention de la variable utilisée, par exemple CE_t (nombre de thalles).

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

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

Gibbosité : bosse ou renflement apparaissant sur les thalles.

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

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

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

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

Monoculture : culture monospécifique.

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

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

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

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

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

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

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

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

Rendement :

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

1.3 PRINCIPE DE L'ESSAI

Des monocultures du genre *Lemna*, en phase de croissance exponentielle, sont exposées à différentes concentrations de la substance d'essai sur une période de sept jours. Cet essai vise à quantifier les effets de la substance sur la multiplication végétative des lentilles d'eau durant cette période, d'après l'évaluation de plusieurs variables choisies. Le nombre de thalles représente la première variable mesurée, mais on en détermine au moins une autre (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) car certaines substances sont susceptibles d'avoir un impact beaucoup plus prononcé sur des variables autres que le nombre de thalles. Afin de quantifier les effets de la substance, la croissance des lentilles d'eau dans les solutions expérimentales est comparée à celle des témoins, et la concentration induisant un pourcentage défini $x\%$ d'inhibition de la croissance (par exemple 50%) est déterminée et exprimée sous la forme de CE_x (par exemple CE_{50}).

Dans cet essai, l'effet observé est l'inhibition de la croissance, exprimé en termes d'accroissement logarithmique de la variable mesurée (taux de croissance spécifique moyen) durant la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage donné d'inhibition du taux de croissance (par exemple 50%) est déterminée en fonction des taux de croissance spécifiques moyens relevés dans une série de solutions expérimentales et exprimée sous la forme $C_x E_t$ (par exemple $C_{50} E_t$).

Cette méthode d'essai comporte également une variable étudiée supplémentaire, le rendement, requise par la réglementation de certains pays. Il est défini comme étant la différence entre la valeur des variables mesurées à la fin de la période d'exposition et la valeur des variables mesurées au début de la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage donné d'inhibition du rendement (par exemple 50%) est calculée à partir du rendement enregistré dans une série de solutions expérimentales et exprimée en termes de $C_x E_r$ (par exemple $C_{50} E_r$).

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

1.4 INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

Il faudrait disposer d'une méthode analytique suffisamment sensible pour quantifier la substance d'essai dans le milieu expérimental.

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

Lorsque la maîtrise du pH du milieu expérimental est particulièrement importante, par exemple lorsqu'on teste des métaux ou des substances hydrolytiquement instables, il est recommandé d'ajouter un tampon au milieu de croissance (voir premier alinéa du paragraphe 1.7.4). D'autres indications sur le traitement des substances qui se prêtent difficilement à cet essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont données dans la référence (11).

1.5 SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

Des substances de référence telles que le 3,5-dichlorophénol utilisé dans l'essai tournant international (10) peuvent servir à vérifier le procédé expérimental. Il est conseillé de tester la substance de référence au moins deux fois par an ou, si l'essai est mené moins fréquemment, parallèlement à la détermination de la toxicité de la substance d'essai.

1.6 VALIDITÉ DE L'ESSAI

Pour que l'essai soit valable, le temps de dédoublement du nombre de thalles chez les témoins doit être inférieur à 2,5 jours (60 heures), ce qui correspond approximativement à une multiplication par sept de ce nombre en sept jours et à un taux de croissance spécifique moyen de 0,275 par jour. Si l'on utilise le milieu et les conditions expérimentales décrits dans cette méthode d'essai, ce critère peut être atteint avec une méthode d'essai statique (8). Ce critère devrait aussi pouvoir être rempli dans des conditions semi-statiques et dynamiques. Le calcul du temps de dédoublement est exposé au paragraphe 2.1.

1.7 DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1.7.1 **Appareillage**

Tout le matériel entrant en contact avec le milieu expérimental doit être en verre ou fait d'un autre matériau chimiquement inerte. La verrerie destinée aux cultures et à l'essai doit être stérile et exempte de tous les contaminants chimiques risquant d'être lessivés dans le milieu d'essai. Les récipients d'essai doivent être suffisamment larges pour permettre aux thalles des différentes colonies dans les récipients témoins de croître sans se recouvrir à la fin de l'essai. Il importe peu que les racines touchent le fond des récipients d'essai, mais il est conseillé d'utiliser des récipients d'essai d'une profondeur minimale de 20 mm et d'un volume minimal de 100 ml. Tout récipient répondant à ces critères peut être utilisé. Des béciers en verre, des cristallisoirs et des boîtes de Petri en verre aux dimensions appropriées se sont avérés adéquats. Les récipients d'essai seront couverts pour minimiser l'évaporation et la contamination accidentelle, tout en autorisant les échanges nécessaires avec l'air. Les récipients d'essai, et en particulier leurs couvercles, ne doivent pas réduire l'intensité lumineuse ni modifier les caractéristiques spectrales de la lumière.

Les récipients expérimentaux et ceux contenant les cultures ne doivent pas être conservés ensemble. Le meilleur moyen d'y parvenir consiste à les garder dans des enceintes de croissance, des incubateurs ou des pièces séparés. Il faut pouvoir régler l'éclairage et la température et les maintenir à un niveau constant (voir paragraphes 1.7.8).

1.7.2 **Organisme expérimental**

Cet essai se pratique sur *Lemna gibba* ou *Lemna minor*. L'Appendice 1 fournit une brève description condensée des espèces de lentilles d'eau ayant servi à des essais de toxicité. Le matériel végétal peut être obtenu auprès d'une collection de cultures, d'un autre laboratoire ou être récolté sur le terrain. Dans ce dernier cas, les plantes doivent être maintenues dans le même milieu que celui qui servira à l'essai durant au moins huit semaines avant leur utilisation. Les cultures de départ ne seront prélevées que sur des sites manifestement non contaminés. Si les cultures proviennent d'un autre laboratoire ou d'une collection de cultures, elles seront également maintenues dans le même milieu que celui de l'essai durant au moins trois semaines. La source du matériel végétal ainsi que l'espèce et le clone (s'il est connu) utilisés pour l'essai doivent toujours figurer sur le rapport.

Il convient d'utiliser des monocultures visiblement non contaminées par d'autres organismes tels que des algues et des protozoaires. Les représentants sains de *L. minor*

forment des colonies de deux à cinq thalles tandis que les colonies saines de *L. gibba* peuvent comprendre jusqu'à sept thalles.

La qualité et l'uniformité des plantes utilisées pour l'essai sont susceptibles d'avoir une influence sensible sur le résultat de l'essai et les plantes doivent par conséquent être choisies avec soin. On utilisera des plantes jeunes, en croissance rapide et dépourvues de lésions visibles ou de parties décolorées (chlorose). Une fréquence élevée de colonies comprenant au moins deux thalles atteste la bonne qualité des cultures. Un nombre important de thalles uniques indique que les plantes vivent dans des conditions de stress, telles que carence en éléments nutritifs, et le matériel végétal issu de ces cultures ne peut servir à l'essai.

1.7.3 **Culture**

Afin d'alléger le travail d'entretien des cultures (par exemple, lorsque aucun essai n'est prévu sur les *Lemna* durant un certain temps), les cultures peuvent être maintenues à une température et sous un éclairage réduits (4-10 °C). L'Appendice 2 fournit des précisions sur la culture. En cas de contamination visible par des algues ou d'autres organismes, il faut stériliser en surface un sous-échantillon de thalles de *Lemna* et le transférer dans un milieu nouvellement préparé (voir Appendice 2). Dans cette éventualité, le reste de la culture contaminée est à éliminer.

Au moins sept jours avant l'essai, un nombre suffisant de colonies est transféré aseptiquement dans un milieu frais stérile et cultivé durant 7 à 10 jours dans les conditions de l'essai.

1.7.4 **Milieu expérimental**

Les différents milieux recommandés pour *Lemna minor* et *Lemna gibba* sont décrits ci-après. La prudence sera de rigueur en ce qui concerne l'ajout d'un tampon au milieu d'essai (MOPS (acide 4-morpholinepropanesulfonique, numéro CAS : 1132-61-2; numéro EINECS : 214-478-5) au milieu de *L. minor*, et NaHCO₃ au milieu de *L. gibba*) si l'on soupçonne le tampon de réagir avec la substance d'essai et d'influencer l'expression de sa toxicité. Le milieu de Steinberg (12) est acceptable pour autant que les critères de validité soient respectés.

On préconise de cultiver et de tester *L. minor* sur une version modifiée du milieu de croissance pour *Lemna* établi par la norme suédoise (SIS). La composition de cette version modifiée est indiquée à l'Appendice 3.

Le milieu de croissance 20X - AAP, décrit à l'Appendice 3, est recommandé pour la culture et l'essai de *L. gibba*.

Le milieu de Steinberg, décrit à l'Appendice 3, convient à *L. minor*, mais peut aussi être employé pour *L. gibba* à condition que les critères de validité soient respectés.

1.7.5 **Solutions expérimentales**

Les solutions expérimentales sont généralement préparées par dilution d'une solution mère, elle-même préparée par dissolution de la substance dans le milieu de croissance.

La plus haute concentration testée de la substance d'essai ne doit normalement pas dépasser l'hydrosolubilité de la substance dans les conditions de l'essai. Il est à noter toutefois que les espèces du genre *Lemna* flottent à la surface et risquent d'être exposées à des substances qui s'accumulent à l'interface eau-air (par exemple des substances peu solubles dans l'eau ou hydrophobes ou des tensio-actifs). Dans ces circonstances, l'exposition résultera de substances autres que celles qui sont en solution, de sorte que les concentrations expérimentales pourraient, suivant les caractéristiques de la substance d'essai, dépasser la

solubilité dans l'eau. Pour les substances d'essai peu solubles dans l'eau, il peut être nécessaire de préparer une solution mère concentrée ou une dispersion de la substance au moyen d'un solvant organique ou d'un dispersant, afin de faciliter l'ajout de quantités précises de substance d'essai au milieu expérimental et de favoriser sa dispersion et sa dissolution. Le recours à ces auxiliaires doit être évité dans toute la mesure du possible. Les solvants ou les dispersants auxiliaires ne doivent pas induire de phytotoxicité. L'acétone et le diméthylformamide sont des exemples de solvants courants qui n'engendrent aucune phytotoxicité à des concentrations allant jusqu'à 100 µl/l. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant, sa concentration finale doit être limitée et ne peut pas dépasser 100 µl/L; elle doit être identique dans tous les récipients traités et témoins et spécifiée dans le rapport. La référence (11) donne des indications supplémentaires sur l'utilisation des dispersants.

1.7.6 Groupes traités et témoins

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

Le choix de la gamme des concentrations d'essai (de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur ou de l'essai de toxicité) doit tenir compte des aspects suivants :

- Pour déterminer la CE_x , les concentrations expérimentales doivent entourer la valeur de la CE_x afin que le niveau de confiance soit suffisant. Par exemple, s'il s'agit d'estimer la CE_{50} , la concentration expérimentale la plus élevée doit dépasser la valeur de la CE_{50} . Si la CE_{50} sort de la gamme des concentrations expérimentales, les intervalles de confiance seront larges et il risque d'être impossible d'évaluer correctement la validité de l'ajustement statistique du modèle.
- S'il s'agit d'estimer la CME0 et la CSEO, la plus petite concentration expérimentale doit être suffisamment basse pour que la croissance des lentilles d'eau ne soit pas ralentie de manière significative par rapport à celle des témoins. De plus, la concentration expérimentale la plus élevée doit être suffisamment élevée pour que la croissance soit sensiblement inférieure à celle des témoins. Si ce n'est pas le cas, l'essai devra être répété à une gamme de concentrations différente (à moins que la concentration la plus élevée atteigne la limite de solubilité ou la concentration limite supérieure autorisée, par exemple 100 mg/l).

Chaque essai doit inclure des témoins sans substance d'essai, mais identiques aux récipients traités pour ce qui est du milieu nutritif, du nombre de thalles et de colonies, des conditions environnementales et du procédé expérimental. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant auxiliaire, il faut inclure un témoin supplémentaire contenant le solvant ou le dispersant à la même concentration que dans les récipients contenant la substance d'essai. Le nombre de récipients témoins identiques (et de témoins contenant le solvant, le cas échéant) doit être au moins égal, et idéalement deux fois supérieur, au nombre de récipients d'essai utilisés à chaque concentration expérimentale.

Si la détermination de la CSEO n'est pas requise, la conception de l'essai peut être modifiée pour augmenter le nombre de concentrations et diminuer le nombre d'expériences identiques par concentration. Toutefois, le nombre de témoins identiques doit être au moins égal à trois.

1.7.7 **Exposition**

Des colonies formées de 2 à 4 thalles visibles sont prélevées dans la culture de l'inoculum et réparties au hasard dans les récipients d'essai dans des conditions d'asepsie. Chaque récipient d'essai doit contenir 9 à 12 thalles au total. Le nombre de thalles et de colonies doit être identique dans chaque récipient d'essai. L'expérience acquise avec cette méthode et l'essai tournant montrent que l'utilisation de trois expériences identiques par traitement, comprenant chacune 9 à 12 thalles au départ, suffit pour détecter des différences de croissance entre les traitements équivalant à environ 4 à 7 % d'inhibition, si celles-ci sont calculées d'après le taux de croissance, et de 10 à 15 % si elles sont calculées d'après le rendement (10).

L'emplacement des récipients expérimentaux dans l'incubateur doit être aléatoire, afin de réduire au minimum l'influence des différences spatiales d'intensité lumineuse ou de température. La disposition des récipients au moment d'effectuer les observations (ou plus souvent de remettre en place les récipients) est également régie par un plan en blocs ou une procédure aléatoire.

Si un essai de stabilité préliminaire montre que la concentration de la substance d'essai ne peut être maintenue (la concentration mesurée tombe en dessous de 80% de la concentration mesurée initialement) sur la durée de l'essai (7 jours), on recommande la méthode semi-statique. Dans ce cas, les colonies doivent être exposées au moins deux fois durant l'essai (par exemple les troisième et cinquième jours) à des solutions d'essai et à des solutions témoins nouvellement préparées. La fréquence de l'exposition à un milieu renouvelé dépendra de la stabilité de la substance d'essai : une fréquence plus élevée peut s'avérer nécessaire pour maintenir des concentrations presque constantes dans le cas de substances très instables ou volatiles. Certaines circonstances appellent une méthode dynamique (11)(13).

La voie d'exposition par application foliaire (pulvérisation) n'est pas reprise dans cette méthode d'essai, mais la référence (14) donne des informations à ce sujet.

1.7.8 **Conditions d'incubation**

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

La température des récipients d'essai est maintenue à 24 ± 2 °C. Le pH du milieu témoin ne peut augmenter de plus de 1,5 unité au cours de l'essai. Toutefois, un écart supérieur à 1,5 unité n'invalidera pas l'essai, si le respect des critères de validité peut être démontré. Il faudra être particulièrement attentif aux variations du pH dans certains cas particuliers, notamment avec des substances instables et des métaux. La référence (11) fournit des indications supplémentaires à ce sujet.

1.7.9 **Durée**

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

1.7.10 **Mesures et déterminations analytiques**

Au début de l'essai, on dénombre les thalles présents dans les récipients d'essai et on consigne ces valeurs en prenant soin de compter les thalles émergents bien visibles. Les nombres de thalles paraissant normaux ou anormaux sont déterminés au début de l'essai, au moins une fois tous les trois jours durant la période d'exposition (c'est-à-dire à au moins deux occasions au cours de la période de 7 jours) et à la fin de l'essai. Il y a lieu de noter les changements affectant le développement des plantes, par exemple en ce qui concerne la taille et l'aspect des thalles, les signes de nécrose, de chlorose ou les gibbosités, la fragmentation des colonies ou la diminution de leur flottabilité ainsi que la longueur et l'aspect des racines. Les caractéristiques significatives du milieu d'essai (par exemple, la présence de matières non dissoutes, le développement d'algues dans les récipients d'essai) doivent également être rapportées.

Durant l'essai, en plus de la détermination du nombre de thalles, on mesure aussi les effets de la substance d'essai sur une ou plusieurs des variables suivantes :

- i) superficie totale des thalles
- ii) poids sec
- iii) poids frais.

La superficie totale des thalles présente l'avantage de pouvoir être déterminée pour chaque récipient traité et témoin au début, pendant et à la fin de l'essai. Le poids sec ou frais est déterminé au début de l'essai à partir d'un échantillon de la culture de l'inoculum représentatif du matériel utilisé pour entamer l'essai et à la fin de l'essai avec le matériel végétal de chaque récipient traité et de chaque récipient témoin. Si la superficie des thalles n'est pas mesurée, le poids sec est préférable au poids frais.

La superficie totale des thalles, le poids sec et le poids frais peuvent être déterminés comme suit :

- i) superficie totale des thalles: La superficie totale des thalles de toutes les colonies peut être déterminée par analyse de l'image. On saisit la silhouette du récipient expérimental et des plantes avec une caméra vidéo (en plaçant le récipient sur une boîte lumineuse) et on numérise l'image obtenue. Un étalonnage réalisé avec des formes planes de superficie connue permet ensuite de déterminer la superficie totale des thalles dans un récipient d'essai. On veillera à éviter toute interférence avec le bord du récipient d'essai. Une autre méthode plus laborieuse consiste à photocopier les récipients d'essai contenant les plantes, à découper la silhouette résultante des colonies et à déterminer leur superficie à l'aide d'un analyseur de la surface foliaire ou de papier millimétré. D'autres techniques (par exemple le quotient du poids de la silhouette découpée dans le papier par le poids d'un morceau de papier de superficie connue) conviennent également.
- ii) poids sec: Toutes les colonies sont prélevées dans chaque récipient d'essai et rincées avec de l'eau distillée ou désionisée. Elles sont déposées sur un buvard qui absorbe l'excès d'eau et séchées à 60°C jusqu'à ce qu'elles atteignent un poids constant. Tous les fragments de racines doivent être inclus. Le poids sec doit être exprimé avec une précision d'au moins 0,1 mg.

- iii) poids frais: Toutes les colonies sont transférées dans des tubes de polystyrène (ou d'un autre matériau inerte) tarés et percés de petits trous (1 mm) dans leur fond arrondi. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3 000 tpm pendant 10 minutes à température ambiante. Les tubes contenant les colonies ainsi séchées sont repesés et le poids frais est calculé par déduction de la tare du tube.

1.7.10.1 *Fréquence des mesures et des déterminations analytiques*

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

L'intensité lumineuse est mesurée dans l'enceinte de croissance, dans l'incubateur ou dans la pièce à des points situés à la même distance de la source de lumière que les thalles de *Lemna*, et ce au moins une fois au cours de l'essai. La température du milieu est mesurée au moins une fois par jour dans un récipient d'essai supplémentaire gardé dans les mêmes conditions que les autres dans l'enceinte de croissance, l'incubateur ou la pièce.

Durant l'essai, les concentrations de la substance d'essai sont déterminées à intervalles appropriés. Dans les essais statiques, il faut déterminer les concentrations au moins au début et à la fin de l'essai.

Dans les essais semi-statiques, où l'on s'attend à ce que la concentration de la substance d'essai ne reste pas dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale, il est nécessaire d'analyser toutes les solutions d'essai nouvellement préparées et les mêmes solutions à chaque renouvellement (voir troisième alinéa du paragraphe 1.7.7). Néanmoins, pour les essais où la concentration de la substance d'essai mesurée initialement ne se situe pas dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale, mais où suffisamment d'indices attestent que les concentrations initiales sont répétables et stables (c'est-à-dire dans l'intervalle de 80-120 % de la concentration initiale), les analyses chimiques peuvent n'être effectuées qu'aux concentrations expérimentales maximale et minimale. Dans tous les cas, la détermination des concentrations de la substance d'essai avant le renouvellement pourra n'être effectuée que dans un seul des récipients identiques de chaque concentration expérimentale (ou dans un récipient dans lequel on aura mélangé le contenu de tous les récipients traités de manière identique).

Un régime de prélèvement identique à celui décrit pour les essais semi-statiques pourra être appliqué aux essais dynamiques, avec une analyse au début, au milieu et à la fin de l'essai, mais sans l'analyse des solutions «utilisées» qui ne se justifie pas dans ce cas. Dans ce type d'essai, le débit du diluant et de la substance d'essai ou de la solution mère de la substance d'essai doit être contrôlé quotidiennement.

S'il s'avère que la concentration de la substance d'essai a pu se maintenir tout au long de l'essai dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale ou mesurée initialement, l'analyse des résultats peut s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement. Si l'écart par rapport à la concentration nominale ou mesurée initialement est supérieur à $\pm 20\%$, l'analyse des résultats devra reposer sur la moyenne géométrique de la concentration relevée durant l'exposition ou sur des modèles décrivant le déclin de la concentration de la substance d'essai (11).

1.7.11 *Essai limite*

Dans certaines circonstances, par exemple lorsqu'un essai préliminaire indique que la substance d'essai n'exerce aucun effet toxique à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/l ou à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (suivant celle qui est la plus basse), on peut effectuer un essai limite afin de comparer les réactions d'un groupe témoin avec celles

d'un groupe traité (à 100 mg/l ou à une concentration égale à la limite de solubilité). Il est fortement recommandé d'étayer cet essai par une analyse de la concentration d'exposition. Tous les critères de validité et conditions expérimentales décrits précédemment s'appliquent à l'essai limite, si ce n'est que le nombre de récipients traités de manière identique doit être doublé. La croissance des lentilles d'eau dans le groupe témoin et dans le groupe traité peut être analysée au moyen d'un test statistique permettant de comparer les moyennes, par exemple un test t de Student.

2. RÉSULTATS ET RAPPORT

2.1 TEMPS DE DOUBLEMENT

La formule suivante, appliquée avec les données provenant des récipients témoins, permet de déterminer le temps de doublement (T_d) du nombre de thalles et de vérifier si l'étude respecte ce critère de validité (paragraphe 1,6) :

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

où μ est le taux de croissance spécifique moyen calculé suivant les indications des deux premiers alinéas du paragraphe 2.2.1.

2.2 VARIABLES ÉTUDIÉES

Cet essai est destiné à déterminer les effets de la substance d'essai sur la multiplication végétative de *Lemna*. Cette méthode d'essai décrit deux variables, de manière à répondre aux différentes préférences et exigences réglementaires des pays membres. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables dans tous les pays membres, les effets doivent être évalués en fonction des deux variables étudiées (a) et (b) définies ci-dessous.

- a) taux de croissance spécifique moyen : cette variable étudiée est calculée d'après les changements affectant, d'une part, les logarithmes du nombre de thalles et, d'autre part, les logarithmes d'un autre paramètre mesuré (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) en fonction du temps (exprimé en jours), chez les témoins et dans chaque groupe traité. Elle est quelquefois appelée «taux de croissance relatif» (15).
- b) rendement : cette variable étudiée est calculée d'après les modifications du nombre de thalles et d'un autre paramètre mesuré (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) chez les témoins et dans chaque groupe traité, jusqu'à la fin de l'essai.

Notons que les valeurs de toxicité calculées avec ces deux variables étudiées ne sont pas comparables et qu'il faut tenir compte de cette différence lorsqu'on utilise les résultats de l'essai. Les valeurs de la CE_x basées sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) seront généralement supérieures à celles basées sur le rendement (C_xE_r), si les conditions expérimentales de cette méthode d'essai sont appliquées, en raison du fondement mathématique de chacune de ces approches. Cette différence n'est due qu'au calcul mathématique, il ne s'agit pas d'une différence de sensibilité entre les deux variables étudiées. Le concept du taux de croissance spécifique moyen repose sur le schéma général de croissance exponentielle des lentilles d'eau dans des cultures non limitées, où la toxicité est estimée d'après les effets sur le taux de croissance, sans tenir compte du niveau absolu du taux de croissance spécifique du témoin, de la pente de la courbe concentration-effet, ni de la durée de l'essai. En revanche, les résultats basés sur la variable de rendement dépendent de toutes ces autres variables. La C_xE_r dépend du taux de croissance spécifique de l'espèce de lentille d'eau utilisée dans chaque essai et du taux de croissance spécifique maximal, susceptible de varier d'une espèce à une autre, voire d'un clone à l'autre. Cette variable ne doit pas être utilisée pour comparer la sensibilité de différentes espèces voire de différents clones de lentilles d'eau. S'il est préférable, du point de vue scientifique,

d'estimer la toxicité d'après le taux de croissance spécifique moyen, la présente méthode d'essai propose également des estimations basées sur le rendement afin de satisfaire à la réglementation en vigueur dans certains pays

Les estimations de la toxicité doivent reposer sur le nombre de thalles ainsi que sur une autre variable mesurée (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais), parce que certaines substances peuvent avoir un effet bien plus prononcé sur une variable autre que le nombre de thalles, qui pourrait ne pas être détecté par le seul calcul du nombre de thalles.

On dresse un tableau réunissant le nombre de thalles et toute autre variable mesurée (c'est à dire superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) ainsi que les concentrations de la substance d'essai relevées à chaque mesure. Les analyses ultérieures, par exemple pour estimer la CMEO, la CSEO ou la CE_x, doivent s'appuyer sur les valeurs de chaque expérience identique d'un même essai et non sur les moyennes calculées pour chaque groupe traité.

2.2.1 Taux de croissance spécifique moyen

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

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

où :

- μ_{i-j} : taux de croissance spécifique moyen du temps i au temps j
- N_i : variable mesurée dans le récipient témoin ou traité au temps i
- N_j : variable mesurée dans le récipient témoin ou traité au temps j
- t : période de temps comprise entre i et j

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

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

Le pourcentage d'inhibition du taux de croissance (I_t) peut ensuite être calculé pour chaque concentration expérimentale (groupe traité) selon la formule suivante :

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

où :

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

2.2.2 Rendement

Les effets sur le rendement sont déterminés en fonction de deux variables mesurées : le nombre de thalles et une autre variable (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) mesurées dans chaque récipient d'essai au début et à la fin de l'essai. En ce qui concerne le poids frais ou sec, la biomasse de départ est déterminée à partir d'un échantillon de thalles prélevé dans le lot qui a servi à ensemercer les récipients d'essai (voir deuxième alinéa du paragraphe 1.7.3). Pour chaque concentration expérimentale et le témoin, calculer un rendement moyen ainsi que les estimations de la variance. Le pourcentage moyen d'inhibition du rendement ($\%I_r$) peut être calculé pour chaque groupe traité d'après la formule suivante :

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

où :

- $\% I_r$: pourcentage de réduction du rendement
- b_C : biomasse finale moins la biomasse de départ dans le groupe témoin
- b_T : biomasse finale moins la biomasse de départ dans le groupe traité

2.2.3 Tracé des courbes concentration-effet

On trace des courbes concentration-effet décrivant le pourcentage d'inhibition moyen de la variable étudiée (I_t ou I_r calculées comme indiqué au dernier alinéa des paragraphes 2.2.1 ou 2.2.2) en fonction du logarithme de la concentration de la substance d'essai.

2.2.4 Estimation de la CE_x

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

2.3 MÉTHODES STATISTIQUES

L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de la régression. Il est possible d'utiliser une régression linéaire pondérée après avoir effectué une transformation linéarisant les valeurs décrivant l'effet observé - par exemple en unités probit ou logit ou Weibull (16), mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression non linéaire, celles-ci traitant mieux les irrégularités inévitables des valeurs et les écarts par rapport aux distributions régulières. Proches de zéro ou de l'inhibition totale, ces irrégularités risquent d'être amplifiées par la transformation et d'interférer avec l'analyse (16). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull sont destinées à être utilisées avec des effets par tout ou rien (mortalité ou survie, par exemple) et doivent être modifiées pour pouvoir être utilisées avec les valeurs du taux de croissance ou du rendement. Les références (17)(18) et (19) décrivent des procédures permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues.

Pour chaque variable étudiée à analyser, utiliser la relation concentration-effet pour calculer des estimations ponctuelles des valeurs de CE_x . Déterminer, si possible, les limites de confiance à 95 % pour chaque estimation. La validité de l'ajustement des données décrivant les effets au modèle de régression est à évaluer par un procédé statistique ou graphique. L'analyse de la régression doit s'appuyer sur les effets relevés dans chaque récipient traité de manière identique et non sur les moyennes des groupes traités.

Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec bootstrap (rééchantillonnage) (20), si les modèles ou méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.

Afin d'estimer la CME0, et par conséquent la CSEO, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par une analyse de la variance (ANOVA). La moyenne de chaque concentration doit ensuite être comparée avec la moyenne du témoin à l'aide d'un test approprié à comparaisons multiples ou de tendance. Les essais de Dunnett ou de William peuvent être utiles (21)(22)(23)(24). Il est nécessaire de vérifier si l'hypothèse de l'ANOVA de l'homogénéité de la variance se confirme. Cette vérification peut être pratiquée par un procédé graphique ou par un test formel (25), notamment les tests de Levene ou de Bartlett. L'infirmité de l'hypothèse de l'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance est extrême et ne peut être rectifiée par une transformation, on envisagera des méthodes d'analyse telles que les tests de tendance régressifs de Jonkheere. La référence (19) livre des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.

Des découvertes récentes conduisent les scientifiques à préconiser l'abandon de la notion de CSEO au profit d'estimations ponctuelles de la CE_x fondées sur la régression. Aucune valeur appropriée de x n'a encore été établie pour cet essai sur les *Lemna*. Néanmoins, une gamme de 10 à 20% semble convenir (suivant la variable étudiée sélectionnée) et il est préférable de mentionner à la fois la CE_{10} et la CE_{20} dans le rapport.

3. RAPPORT

3.1 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

Substance d'essai :

- état physique et propriétés physico-chimiques, notamment la limite de solubilité dans l'eau ;

- données d'identification chimique (par exemple numéro CAS), y compris la pureté.

Espèce soumise à l'essai :

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

Conditions expérimentales :

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

Résultats :

- données brutes : nombre de thalles et autres variables mesurées dans chaque récipient traité et témoin à chaque observation et à chaque analyse ;
- moyennes et écarts-types de chaque variable mesurée ;
- courbes de croissance à chaque concentration (il est recommandé d'ajouter la transformation logarithmique de la variable mesurée, voir deuxième alinéa du paragraphe 2.2.1) ;
- temps de doublement/taux de croissance chez le témoin d'après le nombre de thalles ;
- calcul des variables étudiées pour chaque expérience identique à chaque concentration, avec valeurs moyennes et coefficient de variation des expériences identiques ;
- représentation graphique de la relation concentration-effet ;
- estimation des effets toxiques pour les variables étudiées, par exemple CE_{50} , CE_{20} , CE_{10} et intervalles de confiance associés; si elles ont été calculées, la CME0 et/ou la CSEO ainsi que les méthodes statistiques utilisées pour les déterminer ;
- si on a pratiqué une analyse de la variance, la puissance de l'effet détectable (par exemple, la différence la moins significative) ;
- toute stimulation de la croissance, le cas échéant, dans un groupe traité ;
- tout signe visuel de phytotoxicité et observations des solutions d'essai ;

- analyse des résultats, y compris l'influence d'un éventuel écart par rapport à cette méthode d'essai.

4. BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE LD 221 (2006) *Lemna* sp. Essais d'inhibition de la croissance
- (2) L'utilisation des études sur les *lemna* pour les substances colorées est détaillée au point 13.5.3 du Manuel des décisions de l'UE daté de juillet 2006, disponible à l'adresse <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals>
- (3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment - Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, disponible à l'adresse http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1234958685#A
- (4) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.
- (5) USEPA - United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.
- (6) AFNOR - Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pages.
- (7) Institut suédois de normalisation (SIS). (1995). Qualité de l'eau - Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, lentille d'eau, sur sept jours. SS 02 82 13. 15pages (en suédois).
- (8) Environment Canada. (1999). Méthode d'essai biologique : essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 – 120 pages.
- (9) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.
- (10) Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc - Environment Agency.
- (11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23.
- (12) ISO DIS 20079. Qualité de l'eau - Détermination de l'effet toxique des constituants de l'eau et des eaux résiduaires vis-à-vis des lentilles d'eau (*Lemna minor*) - Essai d'inhibition de la croissance des lentilles d'eau.
- (13) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory - Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

- (14) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 - 359.
- (15) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.
- (16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.
- (17) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.
- (18) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.
- (19) OECD. (2004). *Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data*.
- (20) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.
- (21) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096-1121.
- (22) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.
- (23) 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.
- (24) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
- (25) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

APPENDICE 1

DESCRIPTION DE *Lemna* SPP.

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

La sensibilité étant susceptible de varier d'une espèce à l'autre, seules les comparaisons de sensibilités intraspécifiques sont valables.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sources d'espèces de *Lemna*

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

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

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
SWEDEN
Tel: +46 8 674 7240
Fax +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Germany
e-mail: lemna@uba.de
<http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm>

Bibliographie

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

APPENDICE 2

ENTRETIEN D'UNE CULTURE MÈRE

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

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

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

APPENDICE 3

MILIEUX

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

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

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

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

- Pour préparer un litre de milieu SIS, ajouter les ingrédients suivants à 900 ml d'eau désionisée :
 - 10 ml de solution mère I
 - 5 ml de solution mère II
 - 5 ml de solution mère III

- 5 ml de solution mère IV
- 1 ml de solution mère V
- 5 ml de solution mère VI
- 1 ml de solution mère VII (facultatif).

Note : la solution mère VII (tampon MOPS) peut être nécessaire pour certaines substances d'essai (voir dernier alinéa du paragraphe 1.4).

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

Milieu de croissance 20X AAP

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

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

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

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

Solution mère n°	Substance	Concentration dans la solution mère (g/l)*	Concentration dans le milieu préparé (mg/l)*	Milieu préparé	
				Élément	Concentration (mg/l)*
A1	NaNO ₃	26	510	Na ; N	190 ; 84
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	12	240	Mg	58,08
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,4	90	Ca	24,04
A2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	15	290	S	38,22
A3	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1,4	30	K ; P	9,4 ; 3,7
B	H ₃ BO ₃				
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,19	3,7	B	0,65
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,42	8,3	Mn	2,3
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,16	3,2	Fe	0,66
	O	0,30	6,0	-	-
	ZnCl ₂	3,3 mg·l ⁻¹	66 µg·l ⁻¹	Zn	31 µg·l ⁻¹
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,4 mg·l ⁻¹	29 µg·l ⁻¹	Co	7,1 µg·l ⁻¹
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7,3 mg·l ⁻¹	145 µg·l ⁻¹	Mo	58 µg·l ⁻¹
O	0,012 mg·l ⁻¹	0,24 µg·l ⁻¹	Cu	0,080 µg·l ⁻¹	
C	NaHCO ₃	15	300	Na ; C	220 ; 43

* Sauf mention contraire

Note :

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

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

Concentrations et solutions mères

- Dans la norme ISO 20079, le milieu modifié de Steinberg n'est utilisé que pour *Lemna minor* (puisque seule *Lemna minor* est autorisée dans les essais relevant de cette norme), mais des essais ont montré que *Lemna gibba* pouvait également donner de bons résultats.
- Ce milieu doit être préparé avec des produits de qualité «réactif» ou «pour analyse» et de l'eau désionisée.
- Préparer le milieu nutritif à partir de solutions mères ou du milieu dix fois plus concentré (permettant d'atteindre une concentration maximale sans précipitation).

Tableau 1 – milieu de STEINBERG À pH stabilisé (modifié par Altenburger)

Substance		Milieu nutritif	
Macroéléments	poids molaire	mg/l	mmol/l
KNO ₃	101,12	350,00	3,46
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236,15	295,00	1,25
KH ₂ PO ₄	136,09	90,00	0,66
K ₂ HPO ₄	174,18	12,60	0,072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,37	100,00	0,41
Microéléments	poids molaire	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃	61,83	120,00	1,94
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,43	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241,92	44,00	0,18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	197,84	180,00	0,91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	270,21	760,00	2,81
EDTA dihydrate de sodium	372,24	1 500,00	4,03

Tableau 2 – Solutions mères (macroéléments)

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

Tableau 3 – Solutions mères (microéléments)

2. Microéléments (concentrés 1 000 fois)	mg/l
<u>Solution mère 4:</u> H ₃ BO ₃	120,0
<u>Solution mère 5:</u> ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
<u>Solution mère 6:</u> Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0
<u>Solution mère 7:</u> MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0
<u>Solution mère 8:</u> FeCl ₃ · 6H ₂ O EDTA dihydrate de sodium	760,00 1 500,00

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

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

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

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

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