



Section 3

Devenir et comportement dans l'environnement

Essai n° 321:
Hyallela Azteca Bioconcentration Test
(HYBIT)

25 juin 2024



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

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

Essai de bioconcentration chez *Hyaella azteca* (HYBIT)

INTRODUCTION

1. L'essai de bioconcentration sur *Hyaella Azteca* est un test utilisant des organismes non-vertébrés pour la bioconcentration dans les environnements aquatiques.
2. L'essai HYBIT a été développé de telle sorte qu'il est très proche du concept décrit dans la Ligne directrice OCDE 305, partie 1 (1).
3. Dans les études menées suivant la présente Ligne directrice, on peut envisager de recourir non seulement au régime d'essai en dynamique bien connu et couramment appliqué dans les études de bioconcentration, mais aussi à des régimes semi-statiques. Les deux régimes ont été validés dans le cadre d'un essai circulaire international (2).
4. L'essai d'exposition dans l'eau est principalement applicable à des produits chimiques organiques dont le $\log K_{ow}$ se situe entre 1.5 et 6.0, mais il peut tout de même être utilisé pour des produits chimiques hautement hydrophobes ($\log K_{ow} > 6.0$) à la condition qu'il puisse être montré que le produit chimique d'essai atteint une concentration stable et est totalement dissous dans l'eau (3)(4). La mesure du $\log K_{ow}$ repose sur la thermodynamique des solutés à l'état stationnaire, ce qui signifie que l'essai reposant sur le $\log K_{ow}$ peut ne pas convenir pour caractériser la bioaccumulation des produits chimiques, tels que les PFAS et autres produits chimiques ayant des propriétés tensioactives, pour lesquels les valeurs de $\log K_{ow}$ peuvent être difficile, voire impossible à déterminer parce que d'autres processus sont plus limitants que le partitionnement thermodynamique.
5. L'essai de bioconcentration s'appuie en général sur la mesure de la bioaccumulation d'un produit chimique parent. Des produits chimiques d'essai radiomarqués peuvent permettre une analyse sensible d'échantillons aqueux et tissulaires. Des procédés de séparation (par exemple, la chromatographie sur couche mince ou la chromatographie en phase liquide à haute performance, CLHP) doivent être pratiqués avant la radiodétection afin de permettre l'analyse quantitative du produit chimique parent et des produits issus de la transformation. Les pics associés au produit chimique parent et aux produits de transformation doivent être contrôlés en recourant à des produits de référence certifiés non marqués. De plus, le résidu lié (la fraction non-extrayable) du produit chimique radioactif dans l'homogénat de tissu doit être quantifié quand un produit chimique testé radioactif est utilisé. Lorsqu'on applique des techniques de séparation, la détermination du FBC pour le produit chimique d'essai parent doit se baser sur la concentration du produit chimique d'essai parent dans les *H. azteca* et non sur le total des résidus radioactifs. Si le total des résidus radioactifs (TRR) est déterminé (p. ex., par combustion ou par solubilisation des tissus), la radioactivité et donc le FBC reposent sur la radioactivité totale associée au produit chimique d'essai parent, aux métabolites retenus et au carbone assimilé. Les valeurs du FBC basé sur le TRR peuvent se révéler trop

prudentes et non directement comparables à un FBC dérivé de l'application d'une méthode d'extraction suivie d'une analyse chimique spécifique du seul produit chimique d'essai parent.

6. Le choix de recourir à un régime d'exposition en dynamique ou semi-statique doit reposer sur la faisabilité de maintenir des concentrations d'exposition stables dans l'eau pendant la phase d'absorption dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la moyenne des valeurs mesurées [cf. paragraphe 17(c)]. Il convient de tenir compte de facteurs importants qui peuvent influencer ce choix, notamment par exemple le potentiel d'adsorption du produit chimique d'essai sur les récipients d'essai et sur l'équipement, ou la stabilité du produit chimique d'essai dans une solution aqueuse, par exemple. L'information concernant ces questions pratiques peut être trouvée dans d'autres essais de toxicité aquatique. Si aucune information n'est disponible, un essai préalable peut être mené pour confirmer que le régime d'exposition choisi est adapté (5).

7. Il convient de vérifier que la concentration d'exposition dans l'eau qui doit être appliquée entre dans la plage de solubilité du produit chimique d'essai dans le milieu d'essai aqueux [cf. paragraphe 17(d) ; paragraphe 14(b)]. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour maintenir la stabilité des concentrations du produit chimique d'essai dissous, par exemple l'emploi de solutions mères ou de systèmes de dosage passif (p. ex., méthode par colonne d'élution) (6). Il doit être montré par des mesures régulières que des concentrations stables peuvent être maintenues.

PRINCIPE DE L'ESSAI

8. L'essai se décompose en deux phases : l'exposition (absorption) et la post-exposition (élimination). Pendant la phase d'absorption, un groupe de *H. azteca* (c.à.d. 1200-1500 amphipodes mâles) est exposé au produit chimique d'essai à une ou plusieurs concentrations choisies en fonction des propriétés du produit chimique d'essai (cf. paragraphes 14 et 38). Il est ensuite transféré dans un milieu dépourvu de produit chimique d'essai et la phase d'élimination commence. La concentration du produit chimique d'essai dans et sur les *H. azteca* analysés est suivie pendant les deux phases de l'essai. Les paramètres qui caractérisent le potentiel de bioaccumulation sont la constante cinétique d'absorption (k_1), la constante cinétique d'élimination (k_2), le facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES}) et le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_K). Il convient de prévoir, en plus du groupe soumis à l'exposition, un témoin dans l'eau de procédure qui sera soumis aux mêmes conditions (y compris l'échantillonnage) : les éventuels effets néfastes observés pendant l'essai de bioconcentration seront comparés aux observations faites sur le groupe témoin correspondant. S'il s'avère nécessaire d'utiliser un solvant (cf. paragraphe 23), il faut un témoin dans de l'eau contenant le solvant (au lieu du témoin dans l'eau de procédure) en parallèle du ou des groupes exposés. L'utilisation d'un groupe témoin double le nombre de *H. azteca* requis pour la conduite de l'essai.

9. Dans l'essai de bioconcentration, la phase d'absorption dure en général de 3 à 14 jours (cf. paragraphes 28). Pour prévoir la durée de la phase d'absorption et le temps nécessaire pour atteindre l'état stationnaire, on peut se reporter à des connaissances empiriques (3) et aux résultats d'un essai préalable (cf. paragraphe 27). La phase d'élimination commence dès que les *H. azteca* ne sont plus exposés au produit chimique d'essai, avec le transfert des *H. azteca* dans un récipient propre contenant un milieu d'essai exempt de produit chimique d'essai.

10. Le facteur de bioconcentration (FBC) devra être calculé de deux façons en utilisant la cinétique et l'approche de l'état stationnaire. L'estimation du facteur de bioconcentration cinétique (FBC_K) est fournie par le rapport entre les constantes cinétiques d'absorption (k_1) et d'élimination (k_2) dans l'hypothèse d'une

cinétique de premier ordre (cf. annexe 1, définitions et unités). Le facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES}) doit aussi être calculé comme suit : le rapport entre les concentrations dans les *H. azteca* (C_H) et dans l'eau (C_e) au moment de l'état stationnaire apparent (cf. paragraphe 29 et annexe 5). En principe, le FBC_{ES} doit être comparable au FBC_K , mais des écarts sont possibles (cf. paragraphe 62). Si aucun « état stationnaire » n'est atteint en 14 jours, le calcul du FBC repose exclusivement sur la méthode cinétique (cf. annexe 5).

11. La constante cinétique d'absorption, la constante cinétique d'élimination (de perte) (ou les constantes, si des modèles plus complexes sont utilisés), le facteur de bioconcentration (à l'état stationnaire et/ou cinétique) et, si possible, les intervalles de confiance de chacun de ces paramètres, sont calculés suivant le modèle qui décrit le mieux les concentrations de produit chimique d'essai mesurées dans les *H. azteca* et dans l'eau (cf. annexe 5).

12. L'éventuelle augmentation de la masse de *H. azteca* pendant l'essai peut être négligée, car l'essai utilise des individus adultes (2). Il n'est donc pas nécessaire d'effectuer une correction du FBC cinétique pour tenir compte de la dilution par la croissance.

13. Le FBC dépend de la concentration totale du produit chimique parent dans les *H. azteca* (c.-à-d., est exprimé par rapport au poids frais total d'échantillon de *H. azteca*). Étant donné que, pour beaucoup de produits chimiques organiques, il existe un lien clair entre le potentiel de bioconcentration et l'hydrophobicité, il existe également un lien correspondant entre la teneur en lipides des organismes *H. azteca* utilisés dans l'essai et la bioconcentration des produits chimiques hydrophobes observée. Ainsi, pour réduire cette source de variabilité des résultats de l'essai lorsqu'on teste des produits chimiques d'essai au $\log K_{ow} > 3$, la bioconcentration doit être normalisée par rapport à des *H. azteca* présentant une teneur en lipides par défaut de 3 % du poids frais total corps entier. La teneur en lipides de *H. azteca* élevés en laboratoire est généralement comprise entre 1 et 4 % (p/p) (1). La teneur en lipides des amphipodes devra être mesurée sur des animaux prélevés directement dans les récipients d'essai (cf. annexe 6). Cette normalisation des valeurs de FBC estimées est nécessaire, car elle fournit une base de comparaison des résultats obtenus avec différents produits chimiques et différentes études.

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI

14. Avant la conduite de l'essai de bioaccumulation, il faut disposer des informations suivantes sur le produit chimique d'essai :

(a) Une méthode analytique validée est obligatoire pour quantifier le produit chimique testé (cf. paragraphe 16)

(b) Solubilité dans l'eau [LD 105 de l'OCDE ; (6)] ; celle-ci doit être déterminée selon une méthode (méthode de la colonne d'éluion ou méthode du flacon) adaptée à la plage de solubilité (estimée) afin d'obtenir une valeur fiable.

(c) Coefficient de partage octanol/eau, KOW [LD 107 de l'OCDE (7), 117 (8), 123 (9)] ; cela doit être déterminé selon une méthode appropriée pour le coefficient de partage octanol/eau, KOW afin d'obtenir une valeur fiable. La LD 107 est une méthode pour les $\log K_{ow}$ compris entre -2 et 4 (éventuellement jusqu'à 5), et donc elle ne convient pas pour les valeurs de K_{ow} plus élevées, par contre les LD 117 et LD 123 sont plus communément utilisées pour les valeurs élevées de $\log K_{ow}$. Une estimation de la valeur du $\log K_{ow}$ au moyen du logiciel

EPI Suite™/K_{OW}WIN™ peut être une alternative ou une première étape si des valeurs mesurées ne sont pas disponibles ;

- (d) Stabilité du produit chimique d'essai dans l'eau (hydrolyse [LD 111 de l'OCDE (10)]).
- (e) Information sur la phototransformation pertinente au vu des conditions d'éclairage de l'essai (11).
- (f) Tension de surface (à savoir, pour les produits chimiques dont le log K_{OW} ne peut pas être déterminé) [LD 115 de l'OCDE (12)].
- (g) Pression de vapeur [LD 104 de l'OCDE (13)] et constante de la loi de Henry.
- (h) Toute information relative à la dégradation biotique ou abiotique dans l'eau, notamment la biodégradabilité immédiate [LD de l'OCDE n° 301 A à F (14), 310 (15)], si nécessaire.
- (i) Information sur les métabolites, le cas échéant : structure, log K_{OW}, formation et dégradabilité.
- (j) Constante d'acidité (pK_a) pour les produits chimiques d'essai susceptibles de s'ioniser. Si possible, le pH de l'eau de l'essai doit être ajusté pour garantir que le produit chimique d'essai est présent sous sa forme non ionisée pendant l'essai, si ce pH est compatible avec la présence de *H. azteca*. Des solutions d'acide chlorhydrique (HCl) ou d'hydroxyde de sodium (NaOH) à des forces de ≤1N doivent normalement être utilisées pour tout ajustement de pH (16). Le pH ajusté de l'eau dans les récipients d'essai doit se trouver entre 6.0 et 8.5 (cf. paragraphe 21).

15. La concentration d'exposition choisie ne doit pas provoquer d'effets néfastes sur l'espèce utilisée dans l'essai. S'il manque des informations à ce sujet, un essai de détermination de la plage de toxicité est mené au préalable (cf. paragraphe 39 ; annexe 9). Il est aussi possible d'utiliser d'autres effets de toxicité mesurés, lesquels sont estimés à partir d'essais sur des invertébrés (p. ex., LD de l'OCDE n° 202 (17) ou 211 (18)).

16. Il faut disposer d'une méthode analytique dont l'exactitude, la précision et la sensibilité pour quantifier le produit chimique d'essai dans les solutions d'essai et dans le matériel biologique sont connues, ainsi que d'informations précises sur la préparation et le stockage des échantillons. La limite analytique de quantification du produit chimique d'essai dans l'eau et dans les tissus de *H. azteca* doit également être connue. Le produit chimique d'essai utilisé doit être le plus pur possible (de préférence > 98 %, par exemple). Lorsqu'un produit chimique d'essai radiomarqué est utilisé, le pourcentage de radioactivité associé aux impuretés doit être connu.

CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

17. Les critères de validité de l'essai sont les suivants :

- a. la température de l'eau dans les récipients d'essai est d'environ $23 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant la durée de l'étude. Cependant la variation de température n'est pas supérieure à $\pm 1^\circ\text{C}$ sur toute période de 24 h ;
- b. la concentration de l'oxygène dissous ne descend jamais en dessous de 50 % de saturation pendant l'essai ;
- c. la concentration du produit chimique d'essai dans les récipients d'essai est maintenue à $\pm 20\%$ de la moyenne des valeurs mesurées pendant la phase d'absorption ;

- d. la concentration du produit chimique d'essai est inférieure à la limite de solubilité de ce produit chimique dans le milieu d'essai (en tenant compte de l'effet que la composition du milieu d'essai peut avoir sur la solubilité réelle) ;
- e. la mortalité de *H. azteca* est inférieure à 20 % à la fin de l'essai, tant dans le témoin que dans le ou les groupes exposés. Une mortalité supérieure à 20% à la fin de l'essai peut indiquer une toxicité potentielle du produit chimique testé ou un problème critique provenant des conditions expérimentales (cf. annexe 4).

Si un écart (minime) par rapport aux critères de validité de l'essai est observé, les conséquences doivent être appréciées au regard de la fiabilité des résultats de l'essai et ces écarts et leur appréciation doivent être consignés dans le rapport d'essai.

PRODUITS CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

18. Il peut être utile de recourir à des produits chimiques de référence dont le potentiel de bioconcentration est connu (et qui sont faiblement métabolisés) pour vérifier le bon déroulement du protocole expérimental, si nécessaire (p. ex., si un laboratoire n'a jamais pratiqué cet essai ou si les conditions expérimentales ont été modifiées). En outre, les produits chimiques de référence peut aider à confirmer de façon régulière (par ex. une fois par an) que le FBC ne dérive pas. Lorsqu'un régime en dynamique est utilisé avec des produits chimiques hautement hydrophobes ($\log K_{ow}$ 5 - 6), l'hexachlorobenzène (HCB ; CAS No.118-74-1) est un produit chimique de référence adapté. Lorsqu'un régime semi-statique est utilisé avec des produits chimiques modérément lipophiles, des produits chimiques tels que le prochloraz (CAS No. 67747-09-5) ou le terbutryn (CAS No. 886-50-0) sont adaptés. Ces trois produits chimiques ont été appliqués pendant l'essai circulaire HYBIT, dont les résultats renseignent sur les plages de FBC attendues (2). Cependant, moyennant une justification appropriée, d'autres produits chimiques peuvent aussi être utilisés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Appareillage

19. Il convient d'éviter l'utilisation de matériel ou d'éléments d'équipement susceptibles de se dissoudre, de s'adsorber ou de connaître une lixiviation, ou encore d'avoir des effets néfastes sur *H. azteca*. Les récipients d'essai peuvent être des aquariums communs rectangulaires en verre d'un volume de 20 L. Afin de permettre aux *H. azteca* de se mettre à l'abri, une grille en acier inoxydable (850 - 1 000 μm , en forme de tunnel) peut être placée dans l'aquarium pendant l'essai. On évitera autant que possible l'emploi de tubes souples en plastique pour préférer des tubes en Teflon®, en acier inoxydable et/ou en verre lorsque cela est possible. Les tubes en Téflon® peuvent être utilisés mais devraient de préférence être évités pour certains produits chimiques testés (par ex. les PFAS). Il est préférable d'exposer les systèmes d'essai aux concentrations du produit chimique d'essai qui seront employées dans l'étude pendant au moins trois jours pour montrer, au moyen de mesures analytiques quotidiennes, que l'on peut maintenir des concentrations d'exposition stables avant d'introduire les organismes d'essai. Des mesures peuvent être prises pour éviter les pertes de produits chimiques difficiles à tester pendant la phase d'exposition tels que les produits volatiles, instables, ou fortement adsorbants (par. ex. le système dynamique est préféré, la fermeture des récipients d'essais, l'augmentation de fréquence des renouvellements de milieux).

Eau

20. Un milieu reconstitué approprié pour la culture et les essais est décrit à l'annexe 2. L'annexe 3 décrit toute eau de laboratoire et définit les critères chimiques et physiques de l'eau courante acceptable utilisée pour réaliser les dilutions. L'eau de dilution, c'est-à-dire l'eau mélangée avec le produit chimique d'essai avant d'être introduite dans le récipient d'essai (cf. paragraphes 21-22), doit être de qualité suffisante pour permettre la survie des *H. azteca* pendant toute la durée de l'acclimatation et de l'essai, sans que ceux-ci ne présentent un aspect ou un comportement anormal. Une phase d'acclimatation courte (24-48h) est requise pour permettre l'adaptation si l'on change de milieu entre l'élevage de *H. azteca* et la procédure d'essai. L'eau de dilution doit être caractérisée au minimum en termes de pH, de dureté, de solides totaux, de carbone organique total (COT), de teneur en ammonium et nitrites et aussi d'alcalinité. Certaines caractéristiques chimiques et physiques d'une eau courante acceptable pour les dilutions sont énumérées à l'annexe 3.

21. La qualité de l'eau de dilution doit rester constante tout au long de l'essai. Le pH de l'eau doit se situer entre 6.0 et 8.5 au début de l'essai et ne pas varier de plus de 0.5 unité au cours de l'essai. Si l'eau du robinet son utilisées plutôt qu'un milieu reconstitué, il convient de prélever des échantillons à intervalles réguliers afin de déterminer une série de paramètres de l'eau tels que ceux fournis à l'annexe 3, ceci afin de garantir que l'eau de dilution n'exercera pas une influence excessive sur le résultat de l'essai (par exemple, en créant des complexes avec le produit chimique d'essai) ou n'influera pas négativement sur la population de *H. azteca*. Les caractéristiques de l'eau de dilution doivent être mesurées au moins deux fois par an ou à tout moment en cas de soupçon que les paramètres de l'eau puissent avoir changé significativement.

22. Le contenu naturel en particules ainsi que le COT de l'eau de dilution doivent être aussi faibles que possible afin d'éviter tout phénomène d'adsorption du produit chimique d'essai sur de la matière organique, ce qui pourrait avoir pour effet de réduire la biodisponibilité du produit chimique et provoquerait une sous-estimation du FBC. La valeur maximale acceptable est de 5 mg/L pour les particules (matière sèche qui ne traverse pas un filtre de 0.45 µm) et de 2 mg/L pour le COT (cf. annexe 3). Si nécessaire, il convient de filtrer l'eau de dilution avant de l'utiliser.

Solutions d'essai

23. Une solution mère du produit chimique d'essai doit être préparée à une concentration adéquate, de préférence par simple mélange ou agitation dans l'eau de dilution. Une autre possibilité qui peut être adaptée dans certains cas est d'utiliser un système de dosage par désorption d'une phase solide (19). De manière générale, il n'est pas recommandé d'utiliser des solvants (cf. (5)). Il peut certes être nécessaire de les utiliser pour atteindre une concentration suffisante de la solution mère, pour autant tout doit être entrepris pour limiter autant que possible leur utilisation. Des exemples de solvants qui peuvent être utilisés sont l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthylformamide et le triéthylène glycol. La concentration du solvant dans le milieu d'essai final doit être la même dans tous les traitements (c.-à-d., indépendamment de la concentration de produit chimique d'essai) et ne doit pas dépasser les seuils de toxicité déterminés pour le solvant dans les conditions d'essai. La concentration maximale est de 100 mg/L (ou 0.1 mL/L) (5). Il est peu probable qu'une concentration de solvant de 100 mg/L ait une incidence significative sur la concentration maximale dissoute de produit chimique d'essai qui peut être atteinte dans le milieu (5). La concentration de produit chimique d'essai doit être inférieure à la limite de solubilité du produit chimique d'essai dans le milieu d'essai indépendamment de l'utilisation d'un solvant. La contribution du solvant (associé au produit chimique d'essai) à la teneur globale en carbone organique dans l'eau d'essai doit être connue. Pendant toute la durée de l'essai, la concentration de COT dans les récipients d'essai ne doit pas dépasser de plus de 10 mg/L ($\pm 20\%$) la concentration de carbone organique provenant du produit

chimique d'essai et du solvant (1) éventuellement utilisés. Il faut noter que la teneur en matière organique peut avoir un effet significatif sur la quantité de produit chimique d'essai librement dissous, particulièrement lorsque le produit chimique est hautement lipophile (20). La microextraction en phase solide (MEPS) (21, 22) peut fournir des informations importantes relatives au ratio de produit chimique testé lié et de composés librement dissous, en partant du principe que ces derniers représentent la fraction biodisponible. Il convient de prendre des précautions lorsque des solvants facilement biodégradables sont utilisés (p. ex., le méthanol), car ceux-ci peuvent poser des problèmes liés à la formation de biofilms pouvant eux-mêmes provoquer des transferts nutritionnels du produit chimique d'essai et ainsi modifier la cinétique d'absorption. Tout biofilm qui se forme doit être retiré systématiquement, ou bien, si cela n'est pas possible, des essais en dynamique doivent être envisagés et effectués avec un système de dosage sans solvant tel que le dosage par désorption de phase solide (19) ou le dosage passif (23) (cf. paragraphe 24).

24. Les essais dynamiques requièrent un système qui délivre et dilue en continu une solution mère du produit chimique d'essai (par exemple une pompe doseuse, un diluteur proportionnel, un système de saturation), ou bien un système de dosage par désorption de phase solide, afin d'obtenir les concentrations d'essai dans les récipients d'essai. De préférence dans le régime dynamique, il faut prévoir au moins cinq renouvellements du milieu d'essai pour chaque récipient d'essai chaque jour. Un système semi-statique peut être utilisée pour des produits chimiques testés faiblement à moyennement hydrophobes, à condition de satisfaire aux critères de validité (cf. paragraphe 17).

La vitesse d'écoulement des solutions mères et de l'eau de dilution doit être vérifiée 48 h avant l'essai, puis au moins une fois par jour pendant l'essai. Il est recommandé de vérifier la vitesse d'écoulement dans chaque récipient d'essai (la vitesse ne doit pas varier de plus de 20 % entre deux mesures consécutives) afin de garantir que les conditions d'exposition sont constantes.

Conservation des *H. azteca*

25. Les *H. azteca* utilisés dans les essais de bioconcentration doivent de préférence être élevés en interne au laboratoire. Si l'élevage en interne n'est pas possible, les amphipodes peuvent être achetés dans le commerce. Dans ce cas de figure, les amphipodes doivent bénéficier d'une période d'acclimatation aux conditions de laboratoire (milieu, alimentation et température) pendant au moins un mois. La procédure recommandée pour l'élevage des *H. azteca* s'appuie sur un protocole reconnu qui utilise un milieu de culture contenant des nutriments minéraux essentiels (24). La nourriture recommandée pour l'élevage en laboratoire ou pour l'acclimatation aux conditions de laboratoire n'est pas la même que celle utilisée pendant l'essai. On trouvera un exemple de conditions d'élevage et de culture adéquates à l'annexe 2.

26. Les *H. azteca* utilisés dans les essais ne doivent pas souffrir d'une quelconque maladie ou anomalie visible. Les amphipodes malades doivent être éliminés. Les *H. azteca* ne doivent pas être traités contre une maladie pendant les deux semaines qui précèdent l'essai ni pendant l'essai.

RÉALISATION DE L'ESSAI

Essai préalable

27. Il peut être utile de mener une expérience préalable afin d'optimiser les conditions d'essai définitives, p. ex. le régime d'exposition, le choix de la ou des concentrations de produit chimique d'essai, ou encore la durée des phases d'absorption et d'élimination. De plus, concernant la toxicité du produit chimique testé, l'annexe 9 fournit une proposition d'essai préalable de toxicité.

Conditions d'exposition

Durée de la phase d'absorption

28. Contrairement à ce qui se fait pour les études de bioconcentration chez le poisson, il n'est pas possible de prédire la durée de la phase d'absorption à partir d'équations (1), mais on peut l'estimer à partir des valeurs de $\log K_{ow}$ comme décrit précédemment (3) :

- $\log K_{ow} < 4$: 3-4 jours ;
- $\log K_{ow}$ entre 4 et 5 : 4-10 jours ;
- $\log K_{ow} > 5$: jusqu'à 14 jours.

29. La phase d'absorption doit durer suffisamment longtemps pour permettre d'atteindre l'état stationnaire. Sur le tracé de la concentration du produit chimique d'essai présent dans les *H. azteca* (C_H) en fonction du temps, on atteint l'état stationnaire lorsque la courbe forme un plateau, lorsque trois mesures consécutives de C_H effectuées sur des échantillons prélevés à intervalles suffisamment grands par rapport à la durée de la phase d'absorption présentent un écart de seulement $\pm 20\%$, et lorsqu'il n'y a pas de hausse significative de C_H entre la première et la dernière des mesures consécutives. Dans le cas des produits chimiques d'essai présentant une hydrophobicité élevée et nécessitant une durée d'absorption de 10 jours au minimum avant l'état stationnaire, il convient d'attendre 48 heures entre chacun des trois derniers moments d'échantillonnage, afin de pouvoir évaluer la réalité de l'état stationnaire. Dans le cas des produits chimiques présentant une hydrophobicité faible à modérée, un intervalle plus resserré entre deux échantillonnages (par exemple, 24 heures entre les trois derniers moments d'échantillonnages) devrait suffire à vérifier que l'état stationnaire est atteint (cf. annexe 4). Si l'état stationnaire n'est toujours pas atteint après 14 jours d'exposition, le FBC est calculé suivant l'approche cinétique, qui ne dépend pas de l'état stationnaire. Cependant, la concentration du produit chimique d'essai dans les *H. azteca* à la fin de la phase d'absorption doit être suffisamment élevée pour permettre une estimation fiable des constantes cinétiques d'absorption et d'élimination. Dans quelques cas, il est possible qu'il n'y ait pas d'absorption mesurable du produit chimique d'essai à l'issue de la période d'exposition. S'il peut être montré que : 1) les critères de validité énoncés au paragraphe 17 sont remplis et 2) l'absence d'absorption n'est pas due à un autre défaut de l'essai (p. ex., durée insuffisante de la période d'absorption, sensibilité insuffisante de la méthode analytique, etc.), alors il peut être possible de conclure l'étude sans refaire l'essai.

Durée de la phase d'élimination

30. La phase d'élimination doit durer au moins aussi longtemps que la phase d'absorption et doit être assez longue pour permettre une réduction de 95 % de la charge corporelle du produit chimique d'essai (moyenne des concentrations tissulaires à l'état stationnaire). Si le temps nécessaire à la baisse de 95 % est trop long pour être atteint en pratique, l'étude peut s'arrêter après une durée égale au double de la phase d'absorption. Si des connaissances préalables sont disponibles concernant le comportement d'élimination du produit chimique d'essai, la phase d'élimination peut être abrégée ou prolongée selon les besoins. Si un produit chimique testé est éliminé très lentement, de sorte que la demi-vie exacte ne peut pas être déterminée pendant la phase d'élimination, l'information disponible peut néanmoins suffire aux fins de l'évaluation et indiquer un haut niveau de bioaccumulation.

Nombres de H. azteca utilisés dans l'essai

31. Le nombre de *H. azteca* par essai (concentration) doit être choisi de manière à ce que trois répliqués d'échantillons contenant chacun au minimum 20 amphipodes puissent être prélevés à chaque moment

d'échantillonnage (c.-à-d., un total d'au moins 60 amphipodes par moment d'échantillonnage). Un nombre minimum de 20 individus par échantillon est nécessaire pour garantir une masse d'échantillon suffisante (≥ 50 mg/échantillon regroupé) pour la détermination de la concentration du produit chimique testé (radioactif ou non-radioactif) dans les tissus. Un plus grand nombre de *H. azteca* regroupés par réplicat d'échantillon peut être nécessaire si la masse d'échantillon ciblé n'a pas été atteinte (< 50 mg/échantillon regroupé) ou si la procédure analytique l'exige. Si d'autres analyses sont prévues, il peut être nécessaire de prélever un plus grand nombre encore d'échantillons à chaque moment d'échantillonnage. La teneur en lipides doit être déterminée sur d'autres *H. azteca* prélevés dans le même récipient d'essai au même moment que les amphipodes utilisés pour déterminer la concentration du produit chimique d'essai (cf paragraphe 45). Comme pour l'analyse chimique, un nombre approprié d'amphipodes (par exemple, 20 amphipodes/échantillon) ayant une masse d'échantillon suffisante (> 50 mg/échantillon regroupé) doit être prélevé afin de garantir une détermination précise de la teneur en lipides (cf. annexe 6). Un plus grand nombre d'amphipodes (20% du lot estimé de *H. azteca*) devrait être ajouté lors du stockage dans les récipients d'essai pour compenser les pertes potentielles. Un exemple de schéma d'échantillonnage est fourni à l'annexe 4. Le nombre requis de mâles de *H. azteca* pour une étude est d'environ 1200-1500 amphipodes, qui est doublé pour la mise en place du groupe témoin (cf paragraphe 40).

32. Seuls des mâles sexuellement matures (âgés de plus de 8 semaines) sont utilisés afin d'éviter toute reproduction pendant l'essai. On a recours à des *H. azteca* mâles car leur taille et leur teneur en lipides sont plus uniformes que chez les femelles. La procédure de sexage visant à sélectionner les *H. azteca* mâles sexuellement matures est décrite à l'annexe 7. Les amphipodes soumis à l'essai doivent avoir un poids ≥ 2.5 mg (w/w) et ne doivent pas avoir plus de 6 mois au début de l'étude.

33. Les *H. azteca* utilisés au sein d'une même étude doivent provenir de la même source et du même lot d'élevage. L'âge approximatif des amphipodes soumis à l'essai doit être consigné.

Charge

34. Le volume de milieu d'essai présent dans le récipient d'essai (p. ex., 15 L) doit être suffisant pour fournir un rapport faible biomasse/eau (p. ex., 100 *H. azteca*/L) dans le système d'essai (exposition semi-statique). Ainsi, il est possible de négliger la potentielle réduction de la concentration du produit chimique testé dans l'eau au moment où sont ajoutés les *H. azteca* au début de l'essai, même si le rapport biomasse/eau augmente de façon temporaire (p. ex., 150 *H. azteca* /L). Dans les conditions d'un régime dynamique, il faut au moins cinq volumes de remplacement du milieu dans chaque récipient d'essai chaque jour, amenant à la baisse du rapport biomasse/eau en comparaison avec un régime d'exposition semi-statique. Dans les deux régimes d'exposition, l'aération n'est pas requise afin de garder la concentration d'oxygène dissous au-dessus de 50% de saturation pendant la durée de l'étude (cf paragraphe 17). Cependant, l'aération peut être faite afin de maintenir un niveau d'oxygène suffisant pendant l'essai.

Alimentation

35. Pendant la période d'essai, les *H. azteca* sont alimentés avec des flocons pour poisson moulus et incorporés dans de l'agar-agar (appelés Decotab). Ils sont nourris quotidiennement. Au début de l'étude, la quantité de nourriture apportée est plus élevée. Cinq cubes permettent d'alimenter environ 1 000 *H. azteca*. Puisque le nombre d'amphipodes soumis à l'essai diminue au cours de l'essai, le nombre de cubes de Decotab utilisés pour les nourrir diminue également. Avant d'ajouter de la nourriture fraîche, il convient d'enlever les Decotab non consommés. Chaque cube est réduit en petites portions avant d'être déposé dans le récipient d'essai. En utilisant des Decotab pour alimenter les *H. azteca*, on a la certitude que les animaux reçoivent une nourriture adaptée, à la teneur en lipides et en protéines totales connue, et en quantité suffisante pour qu'ils restent en bonne santé et conservent leur masse corporelle. Un protocole

détaillé reprenant le mode de préparation des Decotab est décrit à l'annexe 8. Il a été montré que l'alimentation par Decotab est la mieux adaptée chez *H. azteca* pour les études de détermination du FBC (24), c'est donc la méthode d'alimentation préférée dans l'essai HYBIT ; cependant, cela n'interdit pas d'utiliser d'autres méthodes adaptées, à condition qu'il ait été montré qu'elles sont équivalentes (p. ex., qu'elles remplissent les critères de validité pertinents). Alors que le FBC est calculé sur la base de la bioconcentration dans la phase aqueuse, l'alimentation Decotab pourrait générer une phase alimentaire. Cependant, l'effet de la prise alimentaire sur l'estimation du FBC peut être considéré comme négligeable, et en fonction de la chimie du produit testé cela devra nécessiter de plus amples recherches comme décrit dans la référence (25).

36. Le récipient d'essai doit être maintenu aussi propre que possible pendant toute la durée de l'essai, afin que la concentration en matière organique (p. ex., due aux déjections d'amphipodes ou aux restes d'aliments) soit la plus basse possible. La méthode de nettoyage du récipient d'essai dépend du choix de la configuration d'essai et de la méthode d'exposition. Il a été montré que l'alimentation par Decotab n'a pas d'incidence significative sur la qualité de l'eau. A la suite de cela, aucune hausse des COT supérieure aux valeurs seuils recommandées de 10 mg/L) n'a été mesurée dans les récipients d'essai (2).

Lumière et température

37. Une photopériode de 16 h et une température de 23 ± 2 °C sont recommandées. Des ampoules fluorescentes à large spectre (840 K) doivent être utilisées ; par ailleurs, l'utilisation de LED peut représenter une alternative à l'éclairage fluorescent. L'intensité lumineuse est mesurée à la surface de l'eau du récipient et ne doit pas dépasser $8-16 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ou 500 à 1 000 lx.

Concentrations d'essai

38. L'essai a initialement été conçu pour les produits chimiques organiques neutres. Une exposition à une concentration unique de ce type de produits chimiques devrait suffire, car aucun effet lié à la concentration n'est attendu sur la bioconcentration. Cette concentration d'exposition devra être bien en-dessous des limites de solubilité dans l'eau et de toxicité. Si des produits chimiques d'essai ne rentrant pas dans cette catégorie sont soumis à l'essai, ou si des informations sont connues qui indiquent une possible dépendance à la concentration, l'essai doit être réalisé avec au moins deux concentrations. Si une seule concentration est testée pour ce type de produits chimiques, ce choix doit être expliqué.

39. Des effets toxiques ne sont pas souhaitables et doivent être évités dans les études de bioconcentration.. Il est donc important de choisir une concentration d'exposition qui ne cause pas d'effets néfastes chez l'espèce testée. Cependant des informations suffisantes sur la toxicité du produit chimique chez les invertébrés aquatiques et/ou *H. azteca* ne sont pas toujours disponibles. L'annexe 9 décrit une proposition d'essai de toxicité préalable à l'essai HYBIT. Il est aussi possible d'effectuer un essai de détermination de la plage de toxicité pendant la même durée que celle anticipée pour la période d'absorption, afin d'estimer la concentration sans effet observé (CSEO) à retenir pour l'essai HYBIT à suivre. De manière générale, la concentration d'exposition doit dépasser d'au moins un ordre de grandeur la limite de quantification dans l'eau, telle que déterminée par la méthode analytique. De plus, il convient de veiller à ce que la concentration d'essai soit inférieure à la limite de solubilité du produit chimique d'essai dans le milieu d'essai.

Témoin

40. Un témoin de l'eau de procédure doit être prévu ; il permet de montrer que les conditions d'essai sont adaptées à *H. azteca* et garantissent un niveau de survie suffisant pendant toute la durée de l'étude ainsi

que pour l'obtention de concentration de fond suffisantes du produit chimique testé dans l'eau du témoin et dans les amphipodes. Il convient de prélever les *H. azteca* du groupe témoin en même temps que ceux du groupe d'essai, afin que la densité de peuplement reste la même dans les deux groupes. Le poids et la composition lipidique des témoins *H. azteca* doivent être déterminés sur des amphipodes collectés dans le système d'essai au début et à la fin de la phase d'absorption et à la fin de la phase d'élimination. A chacune des phases d'échantillonnage, trois réplicats ($n=3$; 20 *H. azteca* regroupé) sont prélevés de chaque récipient d'essai (cf. paragraphes 45 et 54). Si un solvant a été utilisé pour préparer une solution mère suffisamment concentrée, le groupe témoin doit être traité exactement de la même manière, en l'absence de produit chimique d'essai, afin que la concentration du solvant soit la même dans le témoin de l'eau de procédure (témoin solvant) et dans le ou les groupes traités. Si les conditions d'essai nécessitent d'ajuster le pH de l'eau de dilution, le pH du témoin de l'eau de procédure doit également être ajusté.

Fréquence des mesures de la qualité de l'eau

41. Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le COT, la dureté totale, le pH et la température sont mesurés dans tous les récipients d'essai. L'oxygène dissous, le pH et la température sont mesurés et consignés quotidiennement. Pour les essais dans lesquels la phase d'absorption et/ou de d'élimination ont une durée de plus d'une semaine, des intervalles de mesure d'oxygène ajustés et de pH sont permis, p.ex. mesure parallèle de *H. azteca* et du calendrier d'échantillonnage de l'eau. Le COT est mesuré au début de l'essai avant l'ajout des *H. azteca*, à la fin de la phase d'absorption et au début et à la fin de la phase d'élimination. Si un solvant organique est utilisé pendant la phase d'absorption, il est possible de rajouter des moments de mesure du COT. La dureté doit être vérifiée une fois au début de l'essai.

Échantillonnage et analyse des *H. azteca* et de l'eau

Calendrier d'échantillonnage des *H. azteca* et de l'eau

42. Des échantillons d'eau sont prélevés dans le récipient d'essai pour déterminer la concentration du produit chimique d'essai avant l'ajout des *H. azteca* dans le système d'essai, ainsi que pendant les phases d'absorption et d'élimination. Les échantillons d'eau (p. ex. duplicats : 1 pour l'analyse et un échantillon de retenue) sont recueillis avant l'alimentation, au moment où les *H. azteca* sont prélevés. Pendant la phase d'absorption, les concentrations de produit chimique d'essai doivent être déterminées afin de vérifier qu'elles respectent les critères de validité (cf. paragraphe 17). La concentration du produit chimique d'essai dans les solutions d'essai doit être maintenue à $\pm 20\%$ de la moyenne des valeurs mesurées pendant la phase d'absorption. Pendant la phase d'élimination, des échantillons d'eau supplémentaires doivent être prélevés par précaution, afin de confirmer l'absence de contamination du système d'essai pendant cette phase. Dans un régime en dynamique, il suffit de prélever un seul échantillon d'eau au début de la phase d'élimination (dans les 60 minutes qui suivent le transfert de tous les *H. azteca* restant dans une eau dépourvue de produit chimique d'essai), à condition que les résultats de l'analyse de l'eau montrent que le produit chimique d'essai n'est pas détecté ($< LQ$, limite de quantification). Si le produit chimique d'essai est toujours détecté pendant la phase d'élimination, il faut augmenter la vitesse de remplacement de l'eau et réaliser d'autres mesures quotidiennes, jusqu'à ce que la concentration soit inférieure à la LQ.

43. Dans le régime d'essai semi-statique, l'analyse de la concentration du produit chimique d'essai doit être menée sur des milieux frais et vieux prélevés pendant l'ensemble de la phase d'absorption. Les échantillons de milieux vieux sont prélevés avant le renouvellement quotidien du milieu. Le nombre d'analyses peut être réduit quand l'une des conditions suivantes est démontrée : 1) le produit chimique testé est stable (entre 80% et 120% de la concentration nominale) dans le système d'essai entre deux périodes de renouvellement, ou 2) là où la réduction dans le milieu d'essai vieux a été démontrée comme reproductible d'un renouvellement au suivant. Les intervalles de renouvellement du milieu peuvent être raccourcis ou rallongés si cela permet d'assurer la stabilité des conditions d'exposition. Le renouvellement

du milieu s'effectue en préparant un récipient (propre) rempli de milieu d'essai frais (phase d'absorption) ou d'eau de dilution (phase d'élimination) et en transférant tous les amphipodes restants dans le nouveau récipient à l'aide d'une petite épuisette. Dans le régime semi-statique les échantillons d'eau doivent être prélevés avant le premier renouvellement de milieu suivant la phase d'élimination.

44. Les *H. azteca* sont prélevés au moins cinq fois pendant la phase d'absorption et au moins quatre fois pendant l'élimination, afin de déceler à la fois les concentrations à l'état stationnaire et la cinétique. Dans certains cas, il peut être difficile d'estimer de manière suffisamment précise la valeur du FBC à partir de ce nombre d'échantillons (en particulier lorsque la cinétique d'absorption et d'élimination n'est pas simplement de premier ordre) ; dans ce cas, il peut être bon de prélever des échantillons plus fréquemment pendant les deux phases (cf. annexe 4). Les moments d'échantillonnage dépendent des caractéristiques du produit chimique d'essai, ainsi que de la configuration d'essai choisie. À chaque moment d'échantillonnage, trois réplicats ($n=3$, 20 *H. azteca* regroupés dans chacun) sont prélevés dans le récipient d'essai et leur poids frais est déterminé (cf. paragraphe 54).

45. La teneur en lipides doit être déterminée chez les amphipodes (groupes témoin et traités) prélevés du système d'essai au minimum au début et à la fin de la phase d'absorption et à la fin de la phase d'élimination. À chaque moment d'échantillonnage, trois réplicats ($n=3$, 20 *H. azteca* regroupés dans chacun) sont prélevés dans le récipient d'essai et leur poids frais est déterminé (cf. paragraphe 54). Le nombre de *H. azteca* par récipient d'essai au début de l'expérience doit être adapté en conséquence. Les individus qui paraissent en mauvaise santé (p. ex. décolorés), inactifs ou morts quand on les touche, ne sont pas utilisés pour l'analyse des concentrations de produit chimique d'essai ou de lipides, et doivent être retirés lors des inspections quotidiennes.

46. Avant le début de la phase d'élimination, les amphipodes sont transférés dans des récipients propres. Ils sont prélevés (par exemple, au moyen d'une petite épuisette à maille fine), délicatement rincés avec du milieu témoin, puis déposés dans le récipient d'élimination. L'étape de rinçage est nécessaire pour éliminer les résidus de milieu d'essai qui ne devraient pas être transférés dans le récipient propre.

47. À la fin de l'expérience, les amphipodes vivants sont comptés. Pour le calcul du taux de mortalité, les individus manquants sont considérés comme morts. Le système d'essai (rapport biomasse/eau, abri, alimentation) est conçu pour garder les pertes potentielles dues au cannibalisme aussi faibles que possible.

Échantillonnage et préparation des échantillons

48. Pour prélever les échantillons d'eau à analyser, on peut utiliser un tube inerte placé au centre du récipient d'essai et aspirer l'eau. Il est aussi possible de remuer délicatement l'eau du récipient d'essai pour la mélanger, puis de prélever les échantillons au moyen d'une pipette appropriée (p. ex., 10 mL). Pour les produits chimiques hautement hydrophobes en particulier (c.-à-d., les produits chimiques au $\log K_{ow} > 5$), pour lesquels une adsorption sur la maille du filtre ou sur les tubes à centrifuger est possible, les échantillons prélevés ne doivent être ni filtrés ni centrifugés. Dans ce cas, il convient de tout mettre en œuvre pour maintenir les récipients aussi propres que possible (cf. paragraphe 36) et la teneur en COT doit être surveillée pendant les phases d'absorption et d'élimination (cf. paragraphes 20 et 41). Afin d'éviter les problèmes de réduction de la biodisponibilité, l'échantillonnage par microextraction en phase solide (MEPS) peut être pratiqué lors d'essais portant sur des produits chimiques peu solubles et hautement hydrophobes.

49. Les amphipodes sont prélevés à l'aide d'une épuisette à maille fine, rincés précautionneusement à l'eau et séchés individuellement avec un tissu non pelucheux qui peut également servir à retirer le produit chimique associé à la surface des amphipodes. Pour terminer, la pesée des échantillons regroupés est effectuée.

50. Tous les échantillons doivent de préférence être analysés immédiatement après le prélèvement, afin

d'éviter toute dégradation ou autre perte du produit chimique d'essai, et pour permettre la surveillance de la concentration d'essai pendant l'ensemble de la période d'essai. S'ils ne sont pas analysés immédiatement, les échantillons doivent être conservés dans de bonnes conditions. Avant le début de l'étude, il convient de rechercher les informations relatives à la méthode de conservation spécifiquement adaptée au produit chimique d'essai, par exemple la possibilité de congélation, le maintien à 4°C, la durée de conservation, l'extraction, etc. Le rapport de validation (2) fournit des informations utiles sur l'extraction de produit chimique des échantillons de *H. azteca* et pourrait servir de point de départ à l'élaboration de méthodes d'extraction adéquates.

Qualité de la méthode analytique

51. La méthode analytique utilisée pour mesurer le produit chimique d'essai à la fois dans l'eau et dans les amphipodes, doit être validée avant l'utilisation. Par conséquent, il faut vérifier expérimentalement que l'exactitude, la précision, la sensibilité et la reproductibilité de la méthode analytique, ainsi que la récupération du produit chimique d'essai dans l'eau et dans les amphipodes, sont satisfaisantes avec la méthode retenue. Il faut également vérifier que le produit chimique d'essai est indétectable dans l'eau de dilution utilisée. L'eau et dans les amphipodes collectés au début de l'essai sont analysés pour exclure les concentrations de fond du produit chimique testé. Les échantillons d'amphipodes et d'eau doivent être manipulés avec précaution de manière à réduire autant que possible la contamination et la perte pendant l'étude (lesquelles pourraient par exemple résulter d'une adsorption par le matériel d'échantillonnage).

Analyse des échantillons tissulaires de *H. azteca*

52. La concentration du produit chimique d'essai doit être déterminée pour chaque échantillon regroupé pesé. Si des produits chimiques d'essai radiomarqués sont utilisés, l'analyse se fait communément sur le total des résidus radioactifs (TRR), c'est-à-dire le produit chimique d'essai parent et les métabolites retenus et les résidus liés (non-extrayables). Le TRR peut être encore subdivisé aux fins de l'analyse indépendante du seul produit chimique d'essai parent.

53. Les valeurs du FBC pour les produits chimiques d'essai qui s'accumulent dans les lipides doivent être normalisées par rapport à un tissu présentant une teneur en lipides de 3 % (du poids frais) ; ces valeurs normalisées s'ajoutent à celles extraites directement de l'étude. Une méthode adaptée doit être utilisée pour déterminer la teneur en lipides des amphipodes. Pour *H. azteca*, il est recommandé d'utiliser la méthode de Smedes en adaptant le protocole à des échantillons de faible masse (3, 26, 27) ; cependant, il n'est pas interdit d'utiliser d'autres méthodes adéquates, à condition qu'il soit montré que ces dernières sont équivalentes (par exemple, qu'elles remplissent les critères de validité pertinents). De manière générale, il convient de veiller à utiliser une microbalance adaptée (p. ex. précision de 0.01mg) pour déterminer la masse de petits échantillons, comme cela est le cas lorsqu'on détermine la teneur en lipides des amphipodes prélevés.

Mesure du poids de *H. azteca*

54. Le poids moyen des *H. azteca* prélevés à chaque moment d'échantillonnage (déterminé pour chaque réplicat d'échantillon regroupé) doit être mesuré (après un séchage minutieux) avant la conduite de l'analyse chimique (ou lipidique). Il est impératif d'utiliser une microbalance adaptée (cf. paragraphe 53).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

55. Pour obtenir la courbe d'absorption du produit chimique d'essai, on indique sa concentration dans les *H. azteca* (C_H) pendant la phase d'absorption en fonction du temps, sur des échelles arithmétiques. Si la

courbe atteint un plateau, c'est-à-dire, si elle devient presque asymptote à l'axe temporel (cf. paragraphe 29), et il n'y a plus d'augmentation significative de la concentration dans les tissus lors des trois derniers échantillonnages, il convient de calculer le FBC à l'état stationnaire (FBC_{ES}) selon le calcul suivant :

$$FBC_{ES} = \frac{C_H \text{ à l'état stationnaire (moyenne)}}{C_e \text{ sous forme de moyenne pondérée sur le temps (MPT)}} \quad [\text{Équation 1}]$$

La concentration d'exposition moyenne (C_e) étant influencée par la variation au fil du temps, la moyenne pondérée sur le temps (MPT C_e) de la concentration dans l'eau est plus pertinente et précise dans les études de bioaccumulation (en particulier dans un régime semi-statique), même si la variation reste dans la plage de validité appropriée ($\pm 20\%$ de la moyenne des valeurs mesurées). La moyenne de la C_e pondérée sur le temps (MPT C_e) est calculée comme illustré à l'annexe 5.

56. Le facteur de bioconcentration cinétique (FBC_K) est donné par le ratio k₁/k₂, les deux constantes cinétiques de premier ordre. Pour estimer les constantes cinétiques k₁ et k₂, ainsi que le FBC_K, on applique simultanément un modèle de calcul aux phases d'absorption et d'élimination (cf. annexe 5). Une alternative est de déterminer k₁ et k₂ l'une après l'autre (cf. annexe 5). Si la courbe d'absorption et/ou la courbe d'élimination ne sont manifestement pas de premier ordre, alors des modèles plus complexes sont utilisés (cf. bibliographie de l'annexe 5).

Données relatives au poids de *H. azteca*

57. Les poids frais de *H. azteca* doivent être déterminés individuellement pour chacun des (trois) réplicats d'échantillons regroupés à chaque moment d'échantillonnage, pour les groupes soumis à l'essai et le groupe témoin et pendant les phases d'absorption et d'élimination. Il faut veiller à utiliser une balance adaptée (précision 0.01mg) à la mesure du faible poids des organismes d'essai.

Facteurs de bioconcentration cinétique et à l'état stationnaire

58. Les facteurs de bioconcentration cinétique et à l'état stationnaire doivent aussi être rapportés par rapport à une teneur des tissus en lipides de 3 % (p/p) par défaut, sauf s'il existe des indications que le produit chimique d'essai ne s'accumule pas principalement dans les lipides. Les données de concentration dans les tissus de *H. azteca*, ou le FBC, sont normalisés en calculant le rapport entre la valeur de 3 % (cf. paragraphe 13) et la teneur moyenne en lipide réelle (individuelle) en pourcentage de poids frais estimé dans *H. azteca* collectés pour l'analyse lipidique dans le groupe traité (cf. paragraphe 45). Il est nécessaire de procéder à cette normalisation en fonction des lipides pour le FBC_K et le FBC_{ES}, car cela accroît la possibilité de comparer les résultats provenant de différents essais de bioconcentration chez *H. azteca*.

Interprétation des résultats

59. Les concentrations en dessus de la LQ de la méthode analytique peuvent être quantifiées de façon fiables. Cependant, les résultats doivent être interprétés avec précaution lorsque les concentrations mesurées dans les solutions d'essai sont sous ou même proches de la limite de détection (LDD) de la méthode analytique.

60. Si les courbes d'absorption et d'élimination sont nettes, cela indique que les données de bioconcentration sont de bonne qualité. Concernant les constantes cinétiques, le résultat d'un test d'ajustement du χ^2 doit montrer un bon ajustement (c.-à-d., un faible pourcentage d'erreur des mesures (28)) du modèle de bioaccumulation pour que les constantes cinétiques soient considérées comme fiables (cf. annexe 5).

61. Si au moins deux concentrations sont soumises à l'essai, on prend en compte les résultats à toutes les concentrations pour examiner la cohérence de ces résultats et voir s'il existe une dépendance du FBC à la

concentration.

62. En théorie, un état stable du FBC et la cinétique du FBC devraient être les mêmes. Cependant, un facteur important qui peut influencer l'état stable du FBC comparé à la cinétique du FBC est la croissance des amphipodes, puisque la dilution due à la croissance n'est pas prise en compte dans le calcul de l'état stable du FBC. Mais la croissance peut être négligée dans le calcul du FBC chez *H. azteca* à cause de la courte durée des études et l'utilisation de mâles adultes de mâles adultes de *H. azteca* dans les essais. Dans les cas où le FBC_{ES} tend à être plus élevé que le FBC_K , il convient de vérifier la possibilité d'erreurs lors de la détermination des constantes cinétiques d'absorption et d'élimination, et de les déterminer de nouveau. Un mode de calcul différent peut améliorer l'estimation du FBC_K (cf. annexe 5).

Rapport d'essai

63. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes :

Produit chimique d'essai

- État physique et, si nécessaire, propriétés physicochimiques ;
 - identification chimique, telle que désignation IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie), etc. ;
 - pour les produits chimiques hydrophobiques : fournir le coefficient de partage octanol-eau (K_{OE}) ;
 - pour les substances multiconstituants et les UVCB (substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques), décrire autant que possible l'identité chimique de chacun des constituants et indiquer pour chacun son pourcentage de la masse totale de la substance. Résumer comment la méthode analytique utilisée dans l'essai permet de mesurer fidèlement la concentration de la substance ;
 - si un produit chimique d'essai radiomarqué est utilisé, indiquer son activité spécifique, la position précise du ou des atomes marqués et le pourcentage de radioactivité associé aux impuretés ;
 - conditions de stockage du produit chimique d'essai.

Méthode analytique

- Description complète de toutes les procédures d'analyse de produit chimique employées, y compris les limites de détection et de quantification, la variabilité et l'efficacité de récupération du produit chimique, la matrice utilisée pour les préparations standards, le standard interne, etc.

Espèce utilisée pour l'essai

- Nom scientifique, origine, clade de *H. azteca*, tout traitement préalable, toute acclimatation, poids moyen mouillé à la collecte, âge, sexe.
- Informations détaillées sur l'élevage.

Conditions de l'essai

- Procédure d'essai retenue (p. ex., régime en dynamique ou semi-statique) ; méthode d'application (p. ex., solutions mères ou systèmes de dosage passif).
- Type et caractéristiques de l'éclairage utilisé et photopériode(s).
- Information détaillée sur l'élevage.

- Configuration de l'essai (p. ex., nombre et dimensions des récipients d'essai, vitesse de renouvellement du volume d'eau, taux de charge, nombre de réplicats, nombre de *H. azteca* par réplicat, nombre de concentrations d'essai (le cas échéant), durée des phases d'absorption et d'élimination, fréquence d'échantillonnage des *H. azteca* et de l'eau).
- Durée de l'essai et date d'introduction des organismes d'essai dans les solutions d'essai ;
- Type et caractéristiques de l'éclairage utilisé et photopériode(s) :
- Méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (si un solvant est utilisé, sa concentration et sa contribution au contenu en carbone organique de l'eau d'essai doivent être précisées) ou description du système de dosage alternatif.
- Concentration d'essai nominale dans le milieu d'essai, moyennes.
- Type de l'eau de dilution, milieu reconstitué, eau courante y compris description de tout traitement préalable et caractéristiques de l'eau de dilution : pH, dureté, température, concentration d'oxygène dissous, niveau résiduel de chlore (si mesuré), TOC et toute autre mesure effectuée.
- Caractéristiques des solutions d'essai: pH, dureté, COT, température et concentration d'oxygène dissous, y compris les méthodes et la fréquence des mesures effectuées.
- Information détaillée sur l'alimentation, p. ex. type d'aliment(s), source, quantité apportée et fréquence d'alimentation, ainsi que nettoyage des récipients d'essai.
- Information sur le traitement des échantillons de *H. azteca* et d'eau, y compris détails des procédures de préparation, de stockage, d'extraction et d'analyse (et précision de l'analyse) associées à la mesure de la teneur en produit chimique d'essai et en lipides.

Résultats

- Résultats de tous travaux préliminaires, y compris des études de toxicité.
- Mortalité des *H. azteca* pendant l'étude et information détaillée dans les groupes témoin et traités.
- Information relative à tout effet indésirable observé (p.ex. amphipode décoloré ou inactif, eau trouble...).
- Description complète de toutes les procédures analytiques employées, y compris les limites de détection et de quantification, la variabilité et la récupération.
- Teneur en lipides des *H. azteca*, y compris la méthode utilisée et, s'il a été calculé, le facteur de normalisation des lipides (L_n , facteur qui permet d'exprimer les résultats pour une teneur tissulaire en lipide de 3 %).
- Tableau résumant les poids frais de *H. azteca* et les liant à la concentration en produit chimique de chaque échantillon, tant pour le groupe témoin que pour le groupe exposé.
- Tableau reprenant les concentrations du produit chimique d'essai dans les *H. azteca* (C_H , liées à chacun des échantillons ; considérant également la présence de produit chimique dans les résidus liés) et dans l'eau (C_e) (avec valeurs MPT pour le groupe soumis à l'essai, l'écart type et la plage, si nécessaire) pour chaque moment d'échantillonnage (C_H exprimé en mg/kg de poids frais du corps entier ou de tissus précisés, p. ex. lipides, et C_e en mg/L). Valeurs de C_e pour la série témoin (le niveau de départ doit également être rapporté).
- Données de concentration de produit chimique sous la LQ sont considérés égales à zéro ;
- Tracés (comprenant toutes les données mesurées) montrant les informations suivantes:
 - absorption et élimination du produit chimique d'essai dans les *H. azteca*,
 - durée avant état stationnaire (s'il est atteint),
 - courbes des phases d'absorption et d'élimination, montrant les données par point et le tracé ajusté.

- Facteur de bioconcentration à l'état stationnaire (FBC_{ES}), si l'état stationnaire est atteint.
- Facteur de bioconcentration cinétique (FBC_K) et constantes cinétiques d'absorption (k_1) et d'élimination (k_2) dérivées, ainsi que la variance/les erreurs de k_2 (pente et ordonnée à l'origine si un ajustement séquentiel est effectué).
- Limites de confiance, écart type (ET) (si disponible) et méthodes de calcul/d'analyse des données pour chaque paramètre de chaque concentration de produit chimique d'essai utilisée.
- Toute information relative aux métabolites et à leur accumulation.
- Toute anomalie observée au cours de l'essai, tout écart par rapport à la procédure ici décrite et toute autre information pertinente.
- Tableau résumant les données mesurées et calculées pertinentes, selon l'exemple ci-dessous :

Tableau 1 : exemple de tableau résumant les constantes cinétiques d'absorption et d'élimination ainsi que les facteurs de bioconcentration d'une étude HYBIT

| | |
|---|---|
| k_1 (constante cinétique d'absorption globale ; $L\ kg^{-1}\ j^{-1}$) | Insérer valeur (IC 95 %) ⁽¹⁾ |
| k_2 (constante cinétique d'élimination globale ; j^{-1}) | Insérer valeur (IC 95 %) ⁽¹⁾ |
| C_H (concentration du produit chimique dans les <i>H. azteca</i> à l'état stationnaire ⁽¹⁾ ; $mg\ kg^{-1}$) | Insérer valeur \pm ET ⁽²⁾ |
| C_e (MPT ; concentration du produit chimique dans l'eau ; $mg\ L^{-1}$) | Insérer valeur \pm ET ⁽²⁾ |
| FBC_{ES} (FBC à l'état stationnaire ; $L\ kg^{-1}$) | Insérer valeur \pm ET ⁽²⁾ |
| FBC_{ESL} (FBC à l'état stationnaire normalisé en fonction des lipides ; $L\ kg^{-1}$) | Insérer valeur \pm ET ⁽²⁾ |
| FBC_K (FBC cinétique ; $L\ kg^{-1}$) | Insérer valeur (IC 95 %) ⁽¹⁾ |
| FBC_{KL} (FBC cinétique normalisé en fonction des lipides ; $L\ kg^{-1}$) | Insérer valeur (IC 95 %) ⁽¹⁾ |

(1) IC : intervalle de confiance (s'il est possible de le calculer)

(2) ET : écart type (s'il est possible de le calculer)

Bibliographie

1. OECD (2012), Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264185296-en>.
2. OECD (2024). Multi-laboratory ring trial to support development of OECD Test Guideline on *Hyalella azteca* bioconcentration test (HYBIT). Series on Testing and Assessment No. 403, ENV Publications, OECD, Paris. ENV/CBC/MONO(2024)18.
3. Schlechtriem C, Kampe S, Bruckert HJ, Bischof I, Ebersbach I, Kosfeld V, Kotthoff M, Schäfers C, L'Haridon J (2019), Bioconcentration studies with the freshwater amphipod *Hyalella azteca*: are the results predictive of bioconcentration in fish? Environ Sci Pollut Res 26:1628–1641. doi.org/10.1007/s11356-018-3677-4.
4. Schlechtriem C, Kühn S, Müller C (2022), Development of a bioaccumulation test using *Hyalella azteca*. TEXTE 134/2022, German Environment Agency, https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/1410/publikationen/2022-12-06_texte_134-2022_development-bioaccumulation-test-hyalella-azteca_0.pdf.
5. OECD (2019), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD Series on Testing and Assessment No. 23, (Second Edition), OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/0ed2f88e-en>.
6. OECD (1995), Test No. 105: Water Solubility, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069589-en>.
7. OECD (1995), Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069626-en>.
8. OECD (2022), Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069824-en>.
9. OECD (2022), Test No. 123: Partition Coefficient (1-octanol/Water): Slow-Stirring Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264015845-en>.
10. OECD (2004), Test No. 111: Hydrolysis as a Function of pH, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069701-en>.
11. OECD (1997), Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water, OECD Series on Testing and Assessment, No. 7, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264078000-en>.
12. OECD (1995), Test No. 115: Surface Tension of Aqueous Solutions, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069787-en>.
13. OECD (2006), Test No. 104: Vapour Pressure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069565-en>.
14. OECD (1992), Test No. 301: Ready Biodegradability, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070349-en>.
15. OECD (2014), Test No. 310: Ready Biodegradability - CO₂ in sealed vessels (Headspace Test), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264224506-en>.
16. Environment and Climate Change Canada (2017), Biological Test Method: Test for Survival and Growth in Sediment and Water Using the Freshwater Amphipod *Hyalella azteca*. Method Development and Applications, Unit Science and Technology Branch Environment and Climate

- Change Canada, Ottawa, Ontario Report RM/33, Third Edition - September 2017.
17. OECD (2004), Test No. 202: *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>.
 18. OECD (2012), Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264185203-en>.
 19. Schlechtriem C, Böhm L, Bebon R, Bruckert HJ, Düring RA (2017), Fish bioconcentration studies with column-generated analyte concentrations of highly hydrophobic organic chemicals. *Environ Toxicol Chem*; 36(4):906–916.
 20. Parkerton TF, Arnot JA, Weisbrod AV, Russom C, Hoke RA, Woodburn K, Traas T, Bonnell M, Burkhard LP, Lampi MA (2008), Guidance for evaluating in vivo fish bioaccumulation data. *Integr Environ Assess Manag* 4:139-155. https://doi.org/10.1897/IEAM_2007-057.1.
 21. Böhm L, Düring RA, Schlechtriem C (2017), Can solid-phase microextraction replace solvent extraction for water analysis in fish bioconcentration studies? *Environ Toxicol Chem* 36:2887-2894.
 22. Böhm L, Schlechtriem C, Düring RA (2016), Sorption of highly hydrophobic chemicals to organic matter relevant for fish bioconcentration studies. *Environ Sci Technol*. 50(15):8316–8323. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01778>.
 23. Wang H, Birch H, Sjöholm KK, Xia X, Mayer P (2022), In-tube passive dosing of hydrophobic organic chemicals: Controlling freely dissolved concentrations in flow-through and large-volume experiments. *Environ Sci Technol Letters*, 9(4):339-344. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.2c00158>.
 24. Borgmann U (1996), Systematic analysis of aqueous ion requirements of *Hyalella azteca*: A standard artificial medium including the essential bromide ion. *Arch Env Contam Toxicol*. 30(3):356–363.
 25. Kosfeld V, Fu Q, Ebersbach I, Esser D, Schauerte A, Bischof I, Hollender J, Schlechtriem C (2020), Comparison of alternative methods for bioaccumulation assessment: Scope and limitations of in vitro depletion assays with rainbow trout and bioconcentration tests in the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. *Environ Toxicol Chem* 39(9):1813–1825. <https://doi.org/10.1002/etc.4791>.
 26. Smedes F (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst* 124(11):1711–8. <http://xlink.rsc.org/?DOI=a905904k>.
 27. Schlechtriem C, Flidner A, Schäfers C (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of guideline OECD 305. *Environ Sci Eur* 24(4):1-7. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-24-13>.
 28. OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54, Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. [ENVJM/MONO\(2006\)18](https://doi.org/10.2306/230618ENVJM/MONO(2006)18). OECD Publishing, Paris, France.

ANNEXE 1 : DÉFINITIONS ET UNITÉS

FBC : le facteur de bioconcentration à n'importe quel instant de la phase d'absorption de cet essai d'accumulation est la concentration du produit chimique d'essai dans les *H. azteca* (C_H en mg/kg) divisée par la concentration du produit chimique dans le milieu environnant (C_e en mg/L). Le FBC est exprimé en $L \cdot kg^{-1}$. Il convient de noter que les corrections de la teneur en lipides type ne sont pas prises en compte.

FBC_K : le facteur de bioconcentration cinétique est le rapport entre la constante cinétique d'absorption, k_1 , et la constante cinétique d'élimination, k_2 (soit k_1/k_2 – voir les définitions de ces constantes). En principe, la valeur doit être comparable au FBC_{ES} (cf. définition), mais des écarts sont possibles si l'état stationnaire est incertain.

FBC_{KL} : le facteur de bioconcentration cinétique normalisé en fonction des lipides est normalisé par rapport à des tissus de *H. azteca* présentant une teneur en lipides de 3 %.

FBC_{ES} : le facteur de bioconcentration à l'état stationnaire ne varie pas de façon significative pendant une longue période, la concentration du produit chimique d'essai dans le milieu environnant étant constante pendant cette période (cf. définition d'état stationnaire).

FBC_{ESL} : le facteur de bioconcentration à l'état stationnaire normalisé des lipides est normalisé par rapport à des tissus de *H. azteca* présentant une teneur en lipides de 3 %.

Bioaccumulation : renvoie généralement à un processus selon lequel la concentration d'un produit chimique dans un organisme atteint un niveau qui excède celle mesurée dans le milieu environnant (par exemple, l'eau pour un poisson ou l'air pour un mammifère), dans la nourriture ou les deux (1).

Bioconcentration : accroissement de la concentration d'un produit chimique d'essai dans ou sur un organisme (ou un tissu spécifié de ce dernier) par rapport à la concentration du produit chimique d'essai dans le milieu environnant.

C_e : concentration du produit chimique testé dans l'eau ;

C_H : concentration du produit chimique testé dans *H. azteca* ;

Phase d'élimination : aussi appelée phase de post-exposition (perte) ; il s'agit de la période qui fait suite au transfert des *H. azteca* soumis à l'essai d'un milieu contenant le produit chimique d'essai vers un milieu dépourvu de ce produit chimique, période pendant laquelle on étudie l'élimination (ou la perte nette) du produit chimique par les *H. azteca* soumis à l'essai (ou par un tissu spécifié de ces derniers).

COD : le carbone organique dissous est une mesure de la concentration de carbone provenant de sources organiques dissoutes dans les milieux d'essai.

Phase d'exposition : cf. phase d'absorption.

HCB : l'hexachlorobenzène est un composé organochloré donc la formule moléculaire est C_6Cl_6 .

k_1 : la constante cinétique d'absorption est la valeur numérique qui représente la vitesse d'augmentation de la concentration du produit chimique d'essai dans les *H. azteca* soumis à l'essai (ou un tissu spécifié de ces derniers) lorsque les *H. azteca* sont exposés à ce produit chimique (k_1 est exprimée en $L \cdot kg^{-1} \cdot j^{-1}$).

k_2 : la constante cinétique d'élimination (de perte) est la valeur numérique qui représente la vitesse de réduction de la concentration du produit chimique d'essai dans les *H. azteca* soumis à l'essai (ou un tissu spécifié de ces derniers) à la suite du transfert des *H. azteca* soumis à l'essai d'un milieu contenant le produit chimique d'essai vers un milieu dépourvu de ce produit chimique (k_2 est exprimée en j^{-1}).

K_{OW} : le coefficient de partage octanol/eau est le ratio entre la solubilité d'un produit chimique dans l'octanol et dans l'eau à l'équilibre (Lignes directrices de l'OCDE n°107 (2), 117 (3), 123 (4)) ; aussi représenté par P_{OW} . Le logarithme de K_{OW} est utilisé comme indicateur du potentiel de bioconcentration d'un produit chimique par les organismes aquatiques.

CL₅₀ : concentration létale 50. La concentration d'exposition à un produit chimique toxique qui est létale pour la moitié des amphipodes soumis à l'essai.

LQ : limite de quantification ($\mu\text{g/L}$).

LDD : limite de détection ;

CSEO : concentration sans effet observé (mg/L).

ET : écart type.

MEPS : la microextraction en phase solide est une technique d'analyse réalisée sans solvant et développée pour les systèmes dilués. Elle consiste à exposer une fibre polymère à la phase gazeuse ou liquide contenant la substance à analyser. En général, un temps d'analyse minimum est imposé de manière à ce que les conditions d'équilibre soient établies entre les phases solide et fluide, en fonction des espèces testées. Par la suite, on peut déterminer la concentration de la substance à analyser directement à partir de la fibre ou après avoir extrait la substance de la fibre dans un solvant, en fonction de la technique de détermination utilisée.

État stationnaire : cet état est atteint sur la courbe représentant la concentration du produit chimique d'essai dans les *H. azteca* (C_H) en fonction de temps quand cette courbe devient parallèle à l'axe du temps et que les résultats de trois analyses successives de la C_H réalisées sur des échantillons prélevés à un intervalle approprié ne s'écartent pas de plus de 20 % l'un de l'autre, et qu'on ne constate aucune augmentation significative entre les trois périodes d'échantillonnage. Les échantillons regroupés font l'objet d'au moins trois analyses successives. Pour les produits chimiques d'essai qui sont absorbés lentement, les intervalles doivent être ajustés en conséquence.

COT : le carbone organique total (mg/L) est une mesure de la concentration de carbone provenant de toutes les sources organiques dans les milieux d'essai, y compris les sources particulières et dissoutes.

TRR : total des résidus radioactifs.

MPT : moyenne pondérée sur le temps (concentration dans l'eau, mg/L).

Phase d'absorption : aussi appelée phase d'exposition, elle correspond au temps pendant lequel les *H. azteca* sont exposés au produit chimique d'essai.

UVCB : substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques.

Bibliographie

1. Gobas FA, de Wolf W, Burkhard LP, Verbruggen E, Plotzke K. 2009, Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr Environ Assess Manag* 5:624–637.
2. OECD (1995), Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069626-en>.
3. OECD (2022), Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069824-en>.
4. OECD (2022), Test No. 123: Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264015845-en>.

ANNEXE 2 : PROPOSITION DE MÉTHODE D'ÉLEVAGE EN LABORATOIRE DE HYALELLA AZTECA

La procédure suggérée pour l'élevage en laboratoire de *H. azteca* s'appuie sur le protocole de Borgmann(1). Pendant l'élevage, conserver les amphipodes (15 mâles et 15 femelles) dans un milieu de culture dans des béciers de 2 L de capacité (p. ex., en polypropylène). Le milieu de culture est constitué à partir d'une méthode reconnue (1) et contient des nutriments minéraux essentiels (tableau A2-1). Pour le préparer, utiliser des solutions mères de minéraux concentrées d'un facteur de 500 (solutions 1 à 3, cf. tableau A2-1). Remplir les béciers de 2 L avec de l'eau de conservation et de l'eau de dilution ou de l'eau déminéralisée, et ajouter les trois solutions (4 mL chacune). La qualité de l'eau résultant du milieu de culture devrait être environ comme suit : dureté, 120 à 140mg/L de carbonate de calcium (CCo3) ; alcalinité, 60 à 80mg/L de CaCo3 ; conductivité, 300 à 500 µS/cm, pH de 6.5 à 8.0 (2).

Tableau A2-1 : milieu de culture des *H. azteca* (1)

| | | Milieu de culture [mM] | Solution mère [mM] | Solution mère [g/L] |
|------------|--------------------|------------------------|--------------------|---------------------|
| Solution 1 | CaCl ₂ | 1 | 500 | 73.51 |
| | NaBr | 0.01 | 5 | 0.5145 |
| | KCl | 0.05 | 25 | 1.864 |
| Solution 2 | NaHCO ₃ | 1 | 500 | 42.0 |
| Solution 3 | MgSO ₄ | 0.25 | 125 | 30.81 |

Il est possible d'utiliser d'autres milieux de culture (p. ex., Elenndt M4) pour l'élevage de *H. azteca* en laboratoire, à condition que des résultats comparables soient obtenus en termes de reproduction et de santé des amphipodes. Une description détaillée des conditions de culture doit figurer dans le rapport.

Conditions générales de conservation :

Tableau A2-2 : conditions de température, d'aération et d'éclairage pendant l'élevage des *H. azteca*

| | |
|----------------------------|--|
| Température de l'eau | 23 ± 2°C |
| Aération | Aucune aération supplémentaire pendant l'élevage |
| Éclairage | 500 à 1 000 lx |
| Qualité de l'éclairage | Ampoules fluorescentes à large spectre, 840 K |
| Photopériode | 16 h de lumière pour 8 h d'obscurité |
| Refuge pour les amphipodes | Gaze de coton ou tulle de nylon (carrés de 5 x 5 cm) |
| Alimentation | Deux fois par semaine avec des flocons pour poisson moulus ; une fois par semaine avec un mélange 4:1 de flocons pour poisson moulus:spiruline en poudre |

Nourrir les *H. azteca* avec des flocons de nourriture pour poisson achetés dans le commerce et qui ont été moulus en fine poudre à l'aide d'un mortier en porcelaine ou autre outil similaire. Nourrir les animaux deux fois par semaine en versant 20-30 mg de poudre de flocons pour poissons dans chaque bécier. Une fois par semaine, ajouter à chaque bécier la même quantité de nourriture contenant un mélange 4:1 de flocons moulus et de spiruline en poudre. Afin que la nourriture tombe sous la surface de l'eau, la nébuliser avec de l'eau de conservation et de dilution à l'aide d'un pulvérisateur manuel ou autre outil similaire. En outre, ajouter dans chaque bécier une pièce de gaze d'environ 5 x 5 cm qui sert de refuge aux animaux. La gaze étant progressivement consommée par les *H. azteca*, vérifier sa présence chaque semaine et remplacer la gaze si nécessaire. Pour établir un nouvel élevage de laboratoire, utiliser au moins 150-200 amphipodes adultes. Ces amphipodes sont répartis dans au moins cinq béciers et constituent la culture mère.

Chaque bécier contient 15 mâles et 15 femelles de *H. azteca*, les filtrer chaque semaine dans deux passoires à *Artemia* (900 µm et 180 µm) pour les séparer des amphipodes juvéniles. Les juvéniles recueillis

dans les cinq béciers forment un nouveau groupe de progéniture qui est placé dans un bécier de 2 L contenant du milieu de culture. Nourrir ces *H. azteca* avec des flocons pour poisson achetés dans le commerce et moulus, suivant la même procédure que celle employée avec la culture mère. Lorsque les progénitures atteignent l'âge de 7-9 semaines, de nouveaux groupes de culture mère (contenant 15 mâles et 15 femelles de *H. azteca*) peuvent être formés jusqu'à ce qu'au moins 20 groupes (20 béciers) soient constitués, ceux-ci étant nécessaires pour garantir un approvisionnement constant en *H. azteca* pendant les études de bioconcentration. Vérifier chaque mois le nombre d'amphipodes adultes par bécier de culture mère. Remplacer les amphipodes disparus par de jeunes amphipodes adultes (mâles ou femelles en fonction des besoins) prélevés parmi la progéniture et ayant atteint l'âge d'au moins huit semaines.

Dans la culture mère, remplacer le milieu de culture chaque semaine, au moment où les amphipodes juvéniles et adultes sont séparés par filtrage. Filtrer le groupe des progénitures (passoires de 900 µm et 180 µm) une fois toutes les trois ou quatre semaines au moment du renouvellement du milieu, afin d'enlever les amphipodes juvéniles. La formation d'un biofilm modéré sur les béciers a un effet positif sur les conditions de culture, les béciers doivent donc être utilisés en continu sans nettoyage pendant environ un mois.

Critères de santé et sélection des amphipodes pour l'essai

Les amphipodes dans les élevages doivent être vérifiés trois fois par semaine (p.ex. lundi, mercredi, vendredi) au minimum, et de préférence quotidiennement. Les individus qui apparaissent en mauvaise condition de santé (p. ex. décolorés ou stressés), inactifs, ou morts lorsqu'on les touche, ne doivent pas être utilisés pour les essais. Si plus de 20% des amphipodes dans une chambre d'élevage d'âge connu apparaissent morts ou inactifs dans les 48h précédent le début de l'essai, le groupe entier dans le récipient devrait être jeté (2).

Bibliographie

1. Borgmann U (1996), Systematic analysis of aqueous ion requirements of *Hyaletta azteca*: A standard artificial medium including the essential bromide ion. Arch Env Contam Toxicol. 30(3):356–363.
2. Environment and Climate Change Canada (2017), Biological Test Method: Test for Survival and Growth in Sediment and Water Using the Freshwater Amphipod *Hyaletta azteca*. Method Development and Applications, Unit Science and Technology Branch Environment and Climate Change Canada, Ottawa, Ontario Report RM/33, Third Edition - September 2017

ANNEXE 3 : INFORMATION SUR LES EAUX DE DILUTION ET D'ESSAI ADMISSIBLES

Le milieu de culture de *H. azteca* décrit dans l'annexe 2 peut aussi être utilisé comme eau de dilution dans les essais de bioconcentration. Un changement de milieu est possible avant l'essai de bioconcentration. Les types d'eau suivants ont été utilisés avec succès comme eau de dilution dans les études de bioconcentration chez *H. azteca* :

- milieu de Borgmann (1) (cf. annexe 2),
- eau déchlorée, eau faible en cuivre, eau du robinet aérée,
- eau reconstituée, p. ex. suivant la norme EN ISO 6341 (y compris NaBr),
- milieu Elendt M4 (y compris NaBr).

Le pH de l'eau de dilution et de l'eau d'essai devra se situer entre 6 et 8 (2). Cependant un pH supérieur jusqu'à 8.5 est acceptable, comme démontré dans l'essai circulaire (4). Il existe peu d'information sure concernant l'influence de la dureté de l'eau ou son alcalinité sur le bien-être de *H. azteca*. Cependant, la qualité du milieu de culture peut servir de guide pour définir les conditions correctes des essais de bioconcentration (cf. annexe 2).

Si l'eau courante est utilisée, certains seuils des paramètres de qualité de l'eau ne doivent pas être dépassés, comme énuméré au tableau A3-1.

Tableau A3-1 : Concentrations maximales recommandées pour une sélection de paramètres de l'eau, telles qu'énoncées dans la LD 305 de l'OCDE (2)

| Substance | Concentration limite |
|---|----------------------|
| Matière particulaire | 5 mg/L |
| Carbone organique total | 2 mg/L |
| Ammoniac non ionisé | 1 µg/L |
| Chlore résiduel | 10 µg/L |
| Pesticides organophosphorés totaux | 50 ng/L |
| Pesticides organochlorés totaux plus polychlorobiphényles | 50 ng/L |
| Chlore organique total | 25 ng/L |
| Aluminium | 1 µg/L |
| Arsenic | 1 µg/L |
| Chrome | 1 µg/L |
| Cobalt | 1 µg/L |
| Cuivre | 1 µg/L |
| Fer | 1 µg/L |
| Plomb | 1 µg/L |
| Nickel | 1 µg/L |
| Zinc | 1 µg/L |
| Cadmium | 100 ng/L |
| Mercure | 100 ng/L |
| Argent | 100 ng/L |

Bibliographie

1. Borgmann U (1996), Systematic analysis of aqueous ion requirements of *Hyalella azteca*: A standard artificial medium including the essential bromide ion. Arch Env Contam Toxicol. 30(3):356–363.

2. de March, BGE (1979), Survival of *Hyalella azteca* (Saussure) Raised Under Different Laboratory Conditions in a pH Bioassay, with References to Copper Toxicity. Can. Fish. Mar. Serv. Tech. Rep. No. 892.
3. OECD (2012), Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264185296-en>.
4. OECD (2024). Multi-laboratory ring trial to support development of OECD Test Guideline on *Hyalella azteca* bioconcentration test (HYBIT). Series on Testing and Assessment No. 403, ENV Publications, OECD, Paris. ENV/CBC/MONO(2024)18.

ANNEXE 4 : CALENDRIER D'ÉCHANTILLONNAGE TYPE

Tableau A4-1 : Calendrier d'échantillonnage type pour un essai d'exposition semi-statique

| | Heures | Analyse des échantillons tissulaires <i>H. azteca</i> | des échantillons de lipidiques <i>H. azteca</i> | des échantillons de | Échantillons de milieu d'essai (frais)* | Échantillons de milieu d'essai (vieux)* |
|---------------------|----------|---|---|--------------------------------------|---|---|
| Phase d'absorption | 0 | 3 x 20 <i>H.a.</i> ** | 3 x 20 <i>H.a.</i> ** | | 2 x 10 mL | |
| | 1 | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | | |
| | 4 | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | | |
| | 10 | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | | |
| | 24 | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | 2 x 10 mL | 2 x 10 mL |
| | 48 | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | 2 x 10 mL | 2 x 10 mL |
| | 72 | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | 2 x 10 mL |
| Phase d'élimination | 1 (73) | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | 2 x 10 mL | |
| | 4 (76) | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | | |
| | 10 (82) | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | | |
| | 24 (96) | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | 2 x 10 mL | 2 x 10 mL |
| | 48 (120) | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | 2 x 10 mL | 2 x 10 mL |
| | 72 (144) | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | 2 x 10 mL |
| | Résumé | | 13 x 60 <i>H.a.</i> = 780 <i>H.a.</i> | 3 x 60 <i>H.a.</i> = 180 <i>H.a.</i> | = | 12 x 10 mL |
| | | 780 <i>H.a.</i> + 180 <i>H.a.</i> = 960 <i>H.a.</i> | | | | |
| | | 960 <i>H.a.</i> x 1.2*** = 1152 <i>H.a.</i> | | | | |

* La concentration dans l'eau est contrôlée dans les milieux vieux et frais respectivement avant et après le renouvellement du milieu.

** À t=0, les *H. azteca* sont prélevés parmi les amphipodes mâles juste avant d'être ajoutés au récipient d'essai.

*** D'autres amphipodes (environ 20 %) doivent être ajoutés lors de la vérification des stocks dans les récipients d'essai, afin de compenser les éventuelles pertes.

Note : l'établissement d'un témoin eau dans la procédure requiert la même densité de stockage que dans les groupes traités. Cela doublera le nombre d'amphipodes requis pour l'essai de bioconcentration (~2300-2500 amphipodes au total).

Tableau A4-2 : Calendrier d'échantillonnage type pour un essai d'exposition en dynamique

| | Heures | Analyse des échantillons tissulaires <i>H. azteca</i> | des de | Analyse des échantillons lipidiques <i>H. azteca</i> | des de | Échantillons de milieu d'essai |
|------------------------|-------------|--|--|---|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Phase d'absorption | 0 | 3 x 20 <i>H.a.</i> * | | 3 x 20 <i>H.a.</i> * | | 2 x 10 mL |
| | 1 | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | | |
| | 4 | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | | |
| | 10 | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | | |
| | 24 | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | | 2 x 10 mL |
| | 48 | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | | 2 x 10 mL |
| | 72 | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | 2 x 10 mL |
| Phase d'élimination | 1 (73) | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | | 2 x 10 mL |
| | 4 (76) | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | | |
| | 10 (82) | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | | |
| | 24 (96) | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | | 2 x 10 mL |
| | 48 (120) | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | | | 2 x 10 mL |
| | 72 (144) | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | 3 x 20 <i>H.a.</i> | | 2 x 10 mL |
| | Résumé | | 13 x 60 <i>H.a.</i> 780 <i>H.a.</i> | = | 3 x 60 <i>H.a.</i> 180 <i>H.a.</i> | = |
| | | 780 <i>H.a.</i> + 180 <i>H.a.</i> = 960 <i>H.a.</i> | | | | |
| | | 960 <i>H.a.</i> x 1.2** = 1152 <i>H.a.</i> | | | | |

* À t=0, les *H. azteca* sont prélevés parmi les amphipodes mâles juste avant d'être ajoutés au récipient d'essai.

** D'autres amphipodes (environ 20 %) doivent être ajoutés afin de compenser les éventuelles pertes.

Note : l'établissement d'un témoin eau dans la procédure requiert la même densité de stockage que dans les groupes traités. Cela doublera le nombre d'amphipodes requis pour l'essai de bioconcentration (~2300-2500 amphipodes au total).

ANNEXE 5 : CALCULS

Le facteur de bioconcentration (FBC) est déterminé à partir des concentrations mesurées pendant l’essai dans les échantillons de *H. azteca* et d’eau prélevés au cours des phases d’absorption et d’élimination. La méthode servant à déterminer le FBC chez *H. azteca* repose en grande partie sur la méthode décrite chez le poisson à l’annexe 5 de la Ligne directrice 305 de l’OCDE (1). On trouvera dans cette LD 305 le détail des hypothèses sur lesquelles repose le modèle de bioconcentration appliqué. À la différence de ce qui se fait chez le poisson dans la LD 305, on peut négliger la croissance chez *H. azteca* lors du calcul du FBC, en raison de la courte durée des études et de l’utilisation d’individus adultes dans l’essai.

Dans un essai type de détermination du FBC, l’absorption et l’élimination peuvent être décrites en termes de deux processus cinétiques de premier ordre :

$$\text{Cinétique d'absorption} = k_1 \times C_e \quad \text{[Équation A5.1]}$$

$$\text{Cinétique d'élimination globale} = k_2 \times C_H \quad \text{[Équation A5.2]}$$

Où :

C_e : concentration du produit chimique testé dans l’eau

C_H : concentration du produit chimique testé dans *H. azteca*

À l’état stationnaire, en supposant que le développement et le métabolisme sont négligeables, la cinétique d’absorption est égale à la cinétique d’élimination, et donc en combinant les équations A5.1 et A5.2 on obtient la relation suivante :

$$FBC = \frac{C_{H-ES}}{MPT} = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{[Équation A5.3]}$$

Où

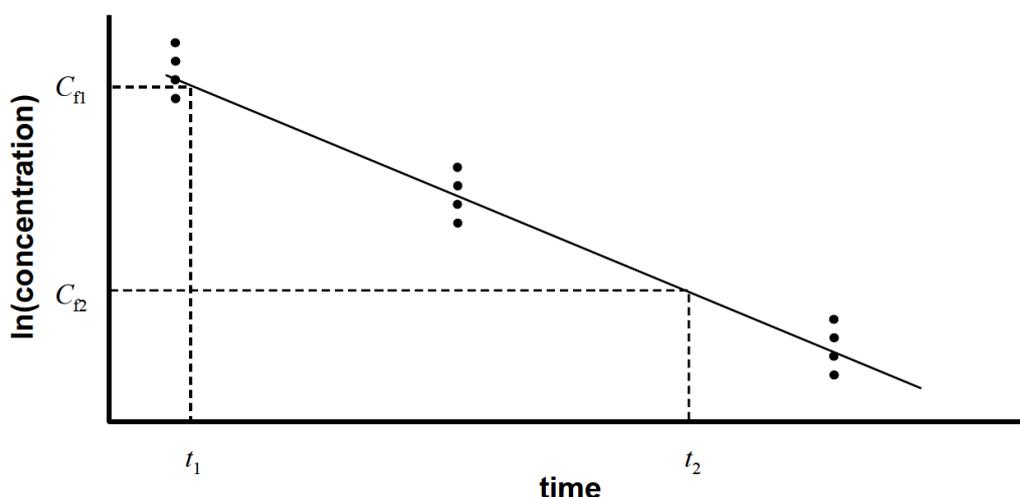
C_{H-ES} = concentration dans les tissus de *H. azteca* à l’état stationnaire (mg kg⁻¹ du poids frais).

MPT : moyenne pondérée dans le temps de la concentration dans l’eau (mg L⁻¹).

Le ratio k_1/k_2 correspond au FBC cinétique (FBC_K) et devrait être égal au FBC à l’état stationnaire (FBC_{ES}) obtenu à partir du rapport entre la concentration à l’état stationnaire dans les tissus de *H. azteca* et la concentration à l’état stationnaire dans l’eau, mais des écarts sont possibles si l’état stationnaire est incertain. Néanmoins, k_1 et k_2 étant des constantes, il n’est pas nécessaire que l’état stationnaire soit atteint pour obtenir un FBC_K.

Méthode séquentielle : détermination de la constante cinétique d’élimination (de perte) k_2

On a fait l’hypothèse que la plupart des données concernant la bioconcentration sont « raisonnablement » bien décrites par un modèle simple à deux compartiments/deux paramètres, comme le montre la courbe rectiligne qui relie approximativement les points représentant la concentration dans les *Hyalella* (sur un graphique logarithmique, ln), pendant la phase d’élimination.



La méthode graphique peut être mise à profit pour traiter les processus d'élimination qui s'écartent d'une cinétique de premier ordre. On remarquera que les écarts à la droite peuvent résulter d'un processus d'élimination plus complexe que celui régi par une cinétique de premier ordre. De tels écarts sont souvent observés si le total des résidus radioactifs (TRR) est utilisé comme base pour effectuer les calculs.

Pour calculer k_2 pour des temps de prélèvement multiples, il convient de réaliser une régression linéaire de $\ln(\text{concentration})$ par rapport au temps. La pente de la droite de régression est une estimation de la constante cinétique d'élimination k_2 (2). À partir de l'ordonnée à l'origine, la concentration moyenne dans les *H. azteca* au début de la phase d'élimination ($C_{0,d}$; qui est égale à la concentration moyenne dans les tissus de *H. azteca* à la fin de la phase d'absorption) peut être facilement calculée (y compris les marges d'erreur) (2).

$$C_{0,d} = e^{\text{ordonnée origine}} \quad [\text{Équation A5.4}]$$

La constante cinétique d'élimination (perte) k_2 peut également être calculée avec l'équation suivante :

$$C_{H,\text{élimination}}(t) = C_{H,\text{fin absorption}} \times e^{-k_2 t} \quad [\text{Équation A5.5}]$$

Où

$C_{H,\text{élimination}}$

est la concentration de *Hyalella* à un instant t de la phase d'élimination, et

$C_{H,\text{fin absorption}}$

est la concentration moyenne dans les *Hyalella* à la fin de la phase d'absorption.

Méthode séquentielle : détermination de la constante cinétique d'absorption k_1

Pour trouver une valeur pour k_1 d'après un ensemble de valeurs séquentielles de la concentration en fonction du temps pour la phase d'absorption, utiliser un programme informatique pour calculer le modèle suivant :

$$C_H(t) = C_e(t) \times \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 \times t}) \quad [\text{Équation A5.6}]$$

Où k_2 est donnée par le calcul précédent, $C_H(t)$ et $C_e(t)$ sont les concentrations dans les tissus de *H. azteca* et dans l'eau, respectivement, au temps t .

La méthode séquentielle doit être considérée comme moins fiable s'il existe un écart significatif entre la valeur de $C_{0,d}$ déterminée à partir de la phase d'élimination et la valeur de $C_H(t)$ définie comme la concentration tissulaire moyenne à la fin de la phase d'absorption. Un écart net indique que l'ajustement ne donne pas de résultats satisfaisants.

Méthode simultanée : calcul des constantes cinétiques d'absorption et d'élimination

Méthode simultanée de calcul des constantes cinétiques d'absorption et d'élimination (perte). Il est possible d'utiliser des programmes informatiques afin de calculer des valeurs pour k_1 et k_2 d'après un ensemble de valeurs séquentielles de la concentration en fonction du temps et avec le modèle :

$$C_H = MPT \times \frac{k_1}{k_2} * (1 - e^{-k_2*t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{Équation A5.7}]$$

$$C_H = MPT \times \frac{k_1}{k_2} * (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2*t}) \quad t > t_c \quad [\text{Équation A5.8}]$$

Où

t_c = le temps à la fin de la phase d'absorption.

Cette approche fournit directement des erreurs types pour les estimations de k_1 et k_2 . Si k_1/k_2 est substituée par le FBC (cf. équation A5.3) dans les équations A5.6 et A5.7, il est possible d'estimer également l'erreur type et l'intervalle de confiance de 95 % du FBC. Cela est particulièrement utile pour comparer des estimations différentes résultant d'une évolution des données. La variable dépendante (concentration dans les tissus de *H. azteca*) peut être ajustée avec ou sans transformation logarithmique, et l'incertitude quant au FBC obtenu peut être évaluée.

Le document-guide associé à la LD 305 de l'OCDE (3) propose un programme logiciel (en langage R) qui permet de réaliser cette estimation. Des informations relatives à l'application de ce programme en R et à l'interprétation des résultats des calculs sont disponibles sur la page web de l'OCDE (<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/section-3-environmental-fate-behaviour-software-tg-305.htm>, lien valable en juin 2023).

Calcul de la MPT (exposition en régime dynamique)

Lorsque des échantillons d'eau sont prélevés à au moins deux intervalles de durée différente, il convient de calculer les concentrations moyennes pondérées sur le temps (MPT) du produit chimique d'essai dans les solutions d'essai afin de tenir compte de la variation temporelle entre les échantillonnages (c.-à-d., pour tenir compte de l'intervalle de temps associé à chaque paire d'échantillons). Pour calculer les concentrations moyennes pondérées, on multiplie la moyenne de deux concentrations consécutives mesurées par la durée (h) qui s'est écoulée entre les deux mesures.

Ensuite, on additionne toutes les concentrations moyennes pondérées et on divise la somme par la durée totale (h) de la période d'absorption, ce qui donne la MPT de la concentration selon l'équation suivante décrite dans le document d'orientation associé à la LD 305 de l'OCDE (3) :

$$MPT = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{(C_{début,i} + C_{fin,i})}{2} w_i}{\sum_{i=1}^n w_i} \quad [\text{Équation A5.9}]$$

Où :

MPT est la moyenne pondérée sur le temps

n est le nombre de périodes d'échantillonnages

$C_{début,i}$ est la concentration de la solution d'essai fraîche de la période i

$C_{fin,i}$ est la concentration de la solution d'essai vieille de la période i

w_i est la durée $t_i - t_{i-1}$, le nombre d'heures ou de jours que dure l'intervalle entre les mesures de la concentration

Calcul de la MPT (exposition en régime semi-statique)

Dans le cas d'un régime d'exposition semi-statique, la concentration de produit chimique d'essai peut

diminuer dans l'intervalle entre deux renouvellements de milieu. Dans ce cas de figure, la MPT peut être calculée suivant la méthode fournie à l'annexe 6 de la LD 211 de l'OCDE (4). L'équation ci-dessous s'applique aux concentrations mesurées au début et à la fin d'un intervalle d'échantillonnage donné :

$$\text{Superficie} = \frac{\text{Conc}_0 - \text{Conc}_1}{\ln(\text{Conc}_0) - \ln(\text{Conc}_1)} \times \text{jours} \quad [\text{Équation A5.11}]$$

Où :

Conc₀ est la concentration mesurée au début d'un intervalle de renouvellement donné

Conc₁ est la concentration mesurée à la fin d'un intervalle de renouvellement donné

ln(Conc₀) est le logarithme népérien de Conc₀

ln(Conc₁) est le logarithme népérien de Conc₁

jours correspond au nombre de jours de l'intervalle de renouvellement

La superficie est celle comprise en dessous de la courbe exponentielle d'un intervalle de renouvellement donné.

La moyenne pondérée sur le temps (MPT) est la somme de toutes les superficies (« superficie totale ») divisée par le nombre total de jours dans l'ensemble des intervalles de renouvellement.

Bibliographie

1. OECD (2012), Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264185296-en>.
2. Kristensen, P, Nyholm, N (1987), Bioaccumulation of chemical substances in fish: the flow-through method - Ring Test Programme, 1984-1985 Final report, CEC, March 1987.
3. OECD (2017), Guidance Document on Aspects of OECD TG 305 on Fish Bioaccumulation, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing & Assessment No. 264, [ENV/JM/MONO\(2017\)16](ENV/JM/MONO(2017)16), 19-Jul-2017.
4. OECD (2012), Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264185203-en>.

ANNEXE 6 : DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN LIPIDES DES *H. AZTECA*

Afin de déterminer la teneur en lipides des organismes d'essai, on utilise la méthode d'extraction des lipides de Smedes (1) telle qu'adaptée par Schlechtriem et al. (2). Il convient de noter que plusieurs observations ont montré que plus la masse de l'échantillon est faible, plus l'écart type des mesures de lipides est grand (3). Un nombre adéquat d'amphipodes (p.ex. 20 amphipodes) ayant un poids moyen supérieur ou égal à 2.5mg (p/p) devra être regroupé afin d'atteindre une masse d'échantillon suffisante (> 50 mg/échantillon regroupé) pour assurer la détermination exacte du contenu lipidique.

Matériel nécessaire :

- petits tubes en verre (7 mL, un tube par échantillon, p. ex. tube pour scintillation liquide)
- armoire à dessiccation
- dessiccateur
- centrifugeuse
- tubes à essai en verre (au moins 10 mL)
- appareil homogénéisateur avec pilon en Teflon
- vortex
- pipettes Pasteur
- cyclohexane
- isopropanol
- N₂ pour évaporation

Conserver les petits tubes en verre une nuit à 75°C dans une armoire à dessiccation, les placer dans un dessiccateur pendant 30 min supplémentaires et les peser (à vide). Ils servent à recueillir l'extrait de lipides. Immédiatement après avoir prélevé les amphipodes, déterminer leur poids frais, puis les transférer dans les tubes à essai en verre. Ajouter 200 µL de solution 1 (tableau A6-1) à chaque tube, puis homogénéiser les amphipodes pendant environ 1 min à l'aide d'un homogénéisateur doté d'un pilon en Teflon. Rincer le pilon avec 4.3 mL de solution 1 et recueillir ce volume dans le tube. Ajouter 2.75 mL d'eau distillée, puis mélanger le tube au vortex, enfin centrifuger le tube (12 min, force centrifuge relative env. 500 x g). Transférer la phase organique dans un petit tube en verre au moyen d'une pipette Pasteur.

Ajouter 2.5 mL de solution 2 (tableau A6-1) à la phase aqueuse restante, puis de nouveau mélanger le tube au vortex avant de le centrifuger dans les mêmes conditions. Mélanger la phase organique à la première et faire évaporer à l'azote jusqu'à ce qu'il ne reste plus que la phase lipidique. Conserver l'extrait présent dans le tube en verre pendant une nuit à 75°C dans une armoire à dessiccation, le placer dans un dessiccateur pendant 30 min supplémentaires, puis peser de nouveau le tube. Mesurer le poids net sec au moyen d'une microbalance (de précision 0.01 mg), ce poids permettant d'évaluer la teneur totale en lipides.

Tableau A6-1 : Solutions de travail pour l'extraction des lipides

Composition

| | |
|------------|--|
| Solution 1 | Cyclohexane/Isopropanol 5:4 (v/v) |
| Solution 2 | Cyclohexane/Isopropanol 87:13 (v/v) |

Bibliographie

1. Smedes F (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst* 124(11):1711–1718. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=a905904k>
2. Schlechtriem C, Fliedner A, Schäfers C (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of guideline OECD 305. *Environ Sci Eur*

- 24(4):17. Available from: <https://doi.org/10.1186/2190-4715-24-13>.
3. OECD (2024). Multi-laboratory ring trial to support development of OECD Test Guideline on *Hyalella azteca* bioconcentration test (HYBIT). Series on Testing and Assessment No. 403, ENV Publications, OECD, Paris. ENV/CBC/MONO(2024)18.

ANNEXE 7 : DÉTERMINATION DU SEXE DES *H. AZTECA*

Afin de séparer les amphipodes mâles et femelles, transférer des *H. azteca* adultes (de plus de 8 semaines) dans une boîte de Petri avant de les examiner au microscope stéréoscopique (facteur d'agrandissement : 6 à 10 x). Des œufs sont visibles dans le marsupium des femelles, du côté ventral. Les mâles de *H. azteca* possèdent des caractères sexuels spécifiques appelés gnathopodes et situés vers l'avant du corps (graphique A7-1). Les mâles de *H. azteca* utilisés pour l'essai de bioconcentration doivent avoir un poids moyen de 2.5mg (p/p) .

Pendant l'accouplement, les mâles s'agrippent au dos des amphipodes femelles. Les femelles et les mâles amphipodes peuvent être séparés à l'aide de pinces brucelles en acier. En général, seuls les amphipodes sains sont choisis. Les organismes d'essai utilisés dans les études de bioconcentration doivent être âgés de plus de 8 semaines et de moins de 6 mois au moment où ils sont sélectionnés pour l'essai. Utiliser une passoire à *Artemia* à maille large (900 µm) pour séparer les amphipodes les plus grands et pour sélectionner des organismes d'essai de taille proche. Prélever les amphipodes mâles, les compter et les transférer dans des béciers en polypropylène (capacité 2 L) remplis d'un mélange de milieu de culture (50 %) et d'eau de conservation et de dilution (50 %) pour permettre une adaptation progressive des amphipodes à l'eau d'essai. Pendant l'étude, à la place de la gaze de coton utilisée dans la phase d'élevage, utiliser comme abri des grilles en acier placées dans les béciers afin de constituer un lieu refuge suffisamment grand pour le groupe dense de *H. azteca*. Cependant, afin d'éviter les comportements de compétition et cannibales, ne pas placer plus de 130-150 amphipodes dans chaque bécier. Laisser les organismes d'essai sélectionnés dans les béciers de collecte jusqu'au lancement de l'essai. Les conditions de conservation (alimentation, éclairage, température) pendant cette phase sont identiques aux conditions d'élevage décrites ci-dessus (cf. annexe 2). Effectuer la détermination du sexe 1 à 2 jours avant le début de l'essai. Si l'intervalle entre la séparation des mâles et le début de l'essai dépasse 2 jours, recompter les amphipodes mâles sélectionnés. Si nécessaire, remplacer les amphipodes perdus par d'autres mâles. Le matériel nécessaire à la détermination du sexe est énoncé au tableau A7-1.



Graphique A7-1 : Dimorphisme sexuel chez *H. azteca*. Les flèches indiquent les caractères spécifiques à chaque sexe. A : *H. azteca* femelle portant des œufs ; B : *H. azteca* mâle et ses gnathopodes.

LISTE DE MATÉRIEL - DÉTERMINATION DU SEXE

Tableau A7-1 : Liste du matériel nécessaire pour déterminer le sexe des *H. azteca*

| Article | Observations |
|---|---|
| Microscope stéréoscopique | |
| Pincettes brucelles en acier | |
| Pipettes Pasteur en plastique au bout coupé | |
| Grille d'acier inoxydable | Trois morceaux par aquarium d'essai de 20 L |
| Béchers en polypropylène de 2 L | |
| Aliments TetraMin® (flocons moulus pour poissons) | |
| Boîtes de Petri | |

ANNEXE 8 : PRÉPARATION DE LA NOURRITURE D'ESSAI (DECOTAB)

Un essai préalable a été réalisé afin de tester différents types d'alimentation et de définir le meilleur protocole d'alimentation pour les *H. azteca* lors des études de détermination du FBC (1). Dans cette étude, on a comparé la méthode utilisant un anneau d'alimentation (2) à celle utilisant de la nourriture liée à de l'agar, appelée Decotab, ces derniers étant préparés d'après le protocole de Kampfraath et al. (3). L'alimentation par Decotab est la méthode recommandée dans les essais HYBIT, car les cubes d'agar-agar enrichis en flocons pour poisson moulus garantissent un apport en nutriments optimal aux amphipodes tout en minimisant la croissance d'algues dans le système d'essai. Les Decotab sont bien acceptés par les *H. azteca*.

La préparation des Decotab s'effectue comme expliqué ci-dessous.

Matériel :

- une plaque de silicone comprenant des puits d'un volume d'environ 1 mL (ici, de forme cubique),
- une solution d'agar à 2 % (1 mL par cube),
- 75 mg (par cube) de nourriture pour poisson finement moulue.

Sur une plaque chauffante, faire bouillir un volume adapté de solution d'agar-agar à 2 % dans de l'eau ultrapure, en remuant, jusqu'à dissolution complète de l'agar-agar. Après un court temps de refroidissement, ajouter les flocons pour poisson moulus à la solution à hauteur de 75 mg de flocons moulus par mL de solution. Mélanger la suspension et la verser dans les puits de la plaque en silicone. Les cubes d'agar-agar se solidifient rapidement. Sceller la plaque en silicone avec un couvercle en plastique pour éviter l'évaporation et stocker la plaque à 4°C. Les cubes commencent à se détériorer au bout de 8-10 jours et doivent donc être utilisés dans les 7 jours suivant leur fabrication. Il est aussi possible de stocker les cubes à -20 °C sur une durée plus longue (environ 2-4 semaines, à évaluer dans chaque laboratoire). Avant de nourrir les animaux, décongeler complètement les cubes.

Bibliographie

1. Kosfeld V, Fu Q, Ebersbach I, Esser D, Schauerte A, Bischof I, Hollender J, Schlechtriem C (2020), Comparison of alternative methods for bioaccumulation assessment: Scope and limitations of in vitro depletion assays with rainbow trout and bioconcentration tests in the freshwater amphipod *Hyaella azteca*. Environ Toxicol Chem 39(9):1813–1825. DOI: 10.1002/etc.4791.
2. Schlechtriem C, Kampe S, Bruckert HJ, Bischof I, Ebersbach I, Kosfeld V, Kotthoff M, Schäfers C, L'Haridon J (2019), Bioconcentration studies with the freshwater amphipod *Hyaella azteca*: are the results predictive of bioconcentration in fish? Environ Sci Pollut Res 26:1628–1641. doi.org/10.1007/s11356-018-3677-4.
3. Kampfraath AA, Hunting ER, Mulder C, Breure AM, Gessner MO, Kraak MHS, Admiraal W (2012), DECOTAB: a multipurpose standard substrate to assess effects of litter quality on microbial decomposition and invertebrate consumption. Freshw Sci 31(4):1156–1162. <http://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1899/12-075.1>.

ANNEXE 9 : DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ AIGÛE CHEZ *h. AZTECA* PRÉALABLE À L'ESSAI HYBIT

On n'évalue pas d'effet toxique et on souhaite donc les éviter dans les études de bioconcentration (1). Il est donc important de choisir une concentration d'exposition qui ne provoque aucun effet néfaste chez l'espèce utilisée dans l'essai.

Il n'est pas toujours possible d'accéder à des informations suffisantes concernant la toxicité d'un produit chimique d'essai pour les invertébrés aquatiques et/ou pour les *H. azteca*. Des données relatives à la toxicité aigüe et/ou chronique peuvent être disponibles chez les espèces de *Daphnia* fréquemment testées, mais ces données peuvent être différentes chez les *Hyalella*.

Il faut donc déterminer une bonne concentration d'exposition avant de mener un essai de bioconcentration chez cette espèce. Les paragraphes qui suivent décrivent une proposition visant à réaliser cette évaluation sous la forme d'un essai de toxicité aigüe dont l'effet mesuré est la mortalité.

Un régime semi-statique est proposé. Cependant, si les caractéristiques du produit chimique ne permettent pas une exposition en régime semi-statique, la configuration de l'essai peut être modifiée pour passer à un régime en dynamique. Une description détaillée de l'étude préalable doit être consignée dans le rapport d'étude final afin de justifier le choix et la pertinence du niveau d'exposition finalement utilisé dans l'essai de bioconcentration.

Matériel :

- Aquarium en verre (sert de bain-marie)
- Bécher (250 mL)
- Instrument pour chauffer l'eau/chambre climatique
- Abris : grilles d'acier inoxydable coupées
- Decotab
- Épuisettes à *Artemia*
- *H. azteca* adultes (> 8 semaines; mâles (préférés) *H. azteca* femelles ou mélangés peuvent être utilisés pour une utilisation optimale des amphipodes. Cependant une différence de sensibilité ne peut pas être exclue, même si cela n'a pas été observé lors du test circulaire.
- Les amphipodes ne doivent pas dépasser l'âge de 6 mois au début de l'essai.

Configuration de l'essai :

- 1 témoin
- 5 concentrations (traitements)
- 3 - 6 réplicats par témoin/traitement
- 20 *H. azteca* par réplicat
- Durée d'exposition : à peu près la durée prévue pour la phase d'absorption de l'essai de bioconcentration (ici : 4 j/96 h)
- Méthode d'exposition : semi-statique (passer en dynamique si nécessaire ou préférable)
- Température recommandée de l'eau : 23 °C (± 2 °C)
- Renouvellement quotidien du milieu
- Détermination quotidienne de la température, de la saturation en O₂ et du pH
- Emplacement aléatoire des bécchers dans le bain-marie
- Alimentation quotidienne avec les Decotab, ¼ de cube par jour par béccher
- Détermination quotidienne de la concentration dans l'eau (milieu frais et vieux)
- Décompte quotidien des *H. azteca* vivants et morts, dans chaque béccher ; les morts sont enlevés.

Tableau A9-1 : Concentrations types d'un essai de détermination de la plage de toxicité du prochloraz chez *H. azteca*.

| Scénario | Prochloraz dans le milieu (mg/L) |
|-----------------|----------------------------------|
| Concentration 1 | 2.143 |
| Concentration 2 | 0.612 |
| Concentration 3 | 0.175 |
| Concentration 4 | 0.050 |
| Concentration 5 | 0.014 |
| Témoin | 0.000 |

Le choix des concentrations s'appuie sur la CL₅₀ (96 h) chez *G. pulex* à une concentration de 2.2 mg/L (2) et sur la concentration d'exposition de 50 µg/L utilisée dans un essai de bioconcentrations effectué par le passé chez *H. azteca* (2). Un facteur d'environ 3.5 est utilisé entre toutes les concentrations (voir (2) pour de plus amples informations sur l'étude préalable du Prochloraz).

Possibilité de regroupement :

Étant donné qu'il y a 36 béchers dans l'essai, que le milieu est renouvelé chaque jour et que les concentrations de produit chimique d'essai sont déterminées quotidiennement dans le milieu frais et vieux, un grand nombre d'échantillons est produit. Regrouper les échantillons peut permettre de réduire le nombre d'échantillons à analyser. Prélever des aliquotes (5 mL) dans chaque bécher (total 30 mL) devrait suffire à déterminer les paramètres moyens de chaque traitement. Cette possibilité ne doit être pratiquée que s'il n'existe aucune indication que les traitements s'écartent significativement les uns des autres.

Critères de validité :

On peut retenir les critères de validité suivants pour l'essai préalable de toxicité aiguë chez *H. azteca* :

- Mortalité ≤ 10 % dans le témoin (mortalité moyenne parmi les réplicats).
- La température de l'eau est d'environ 23 ± 2 °C. Cependant la variation de température n'est pas supérieure à ± 1°C sur une période de 24 h.

Recherche d'erreurs :

- Les épuisettes à *Artemia* ne doivent comporter aucun trou ni renforcement dans lequel les amphipodes pourraient se cacher. Dans le cas contraire, les pertes de *H. azteca* n'étant pas dues à la mortalité biaisent les résultats.

Bibliographie

1. Beketov MA, Liess M (2008), Potential of 11 pesticides to initiate downstream drift of stream macroinvertebrates. *Arch Environ Contam Toxicol* 55(2):247–253.
2. Kosfeld V, Fu Q, Ebersbach I, Esser D, Schauerte A, Bischof I, Hollender J, Schlechtriem C (2020), Comparison of alternative methods for bioaccumulation assessment: Scope and limitations of in vitro depletion assays with rainbow trout and bioconcentration tests in the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. *Environ Toxicol Chem* 39(9):1813–1825. DOI: 10.1002/etc.4791.