



Section 2
Effets sur les systèmes biologiques

Ligne Directrice n° 211
Daphnia magna, essai de reproduction

2 octobre 2012

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



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

Daphnia magna, essai de reproduction

INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement mises à jour pour intégrer les progrès de la science. S'agissant de la Ligne directrice 202 - Partie II : « *Daphnia* sp., essai de reproduction » (adoptée en avril 1984), on admet généralement que les résultats obtenus au cours des essais pratiqués selon cette Ligne directrice (LD) peuvent être variables. Si bien que des efforts considérables ont été déployés pour découvrir les raisons de cette variabilité, en vue de mettre au point une meilleure méthode d'essai. La présente LD a été mise à jour en fonction des résultats de ces recherches ainsi que des études de validation réalisés en 1992 (1), 1994 (2) et 2008 (3).

2. Les principales différences entre la version initiale (1984), la deuxième version (1998) de la LD sont les suivantes :

- (a) l'espèce recommandée est *Daphnia magna* ;
- (b) la durée de l'essai est de 21 jours ;
- (c) pour les essais semi-statiques, le nombre d'animaux à utiliser pour chaque concentration d'essai a été réduit : il est passé d'au moins 40, répartis de préférence en quatre groupes de 10 animaux, à au moins 10 animaux traités individuellement (mais différents modes opératoires peuvent être appliqués pour les essais en écoulement continu) ;
- (d) des recommandations plus spécifiques ont été formulées quant au milieu d'essai et aux conditions d'alimentation.

Les principales différences entre la deuxième version (1998) et la présente sont les suivantes :

- (e) En 2008, l'annexe 7 a été ajoutée pour décrire les procédures permettant l'identification du sexe des descendants si cela est requis. Conformément aux versions précédentes de cette LD, l'identification du sexe des descendants est une observation optionnelle.
- (f) En 2012, la variable de réponse exprimée par le nombre de descendants vivants par animal parent survivant a été complétée par une variable de réponse supplémentaire sur la reproduction de *Daphnia*, à savoir le nombre total de descendants vivants produits à la fin de l'essai par organisme parent présent au début de l'essai, en excluant de l'analyse la mortalité parentale aléatoire (accidentelle et/ou fortuite). Cette variable de réponse est ajoutée à des fins d'harmonisation de ce paramètre avec les autres lignes directrices de l'OCDE sur la reproduction des invertébrés. En outre, la présente LD permet d'éliminer une source d'erreur sur cette variable, à savoir l'effet de la mortalité parentale fortuite et/ou accidentelle éventuellement observée pendant la période d'exposition.

© OCDE, (2012).

L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu pour usage personnel, dans un but non commercial sans autorisation préalable, sous réserve de mention de la source. Toute utilisation à but commercial doit faire l'objet d'une autorisation écrite préalable de l'OCDE.

(g) D'autres indications statistiques portant sur la conception de l'essai et le traitement des résultats ont été ajoutées, tant pour la CE_x (p. ex. CE_{10} ou CE_{50}) que pour l'approche fondée sur la CSEO/CMEO.

(h) Un essai limite a été introduit.

3. Les définitions utilisées sont données à l'annexe 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. Le principal objectif de l'essai consiste à évaluer l'effet de produits chimiques sur le taux de reproduction de *Daphnia magna*. Pour ce faire, de jeunes femelles de *Daphnia* (les animaux parents), âgées de moins de 24 heures au début de l'essai, sont exposées à la substance d'essai ajoutée à l'eau à différentes concentrations. L'essai dure 21 jours. À la fin de l'essai, le nombre total de descendants vivants produits est évalué. Le taux de reproduction des animaux parents peut s'exprimer autrement (p. ex. par le nombre de descendants vivants engendrés par animal et par jour, à partir du premier jour où des descendants ont été observés), mais ces résultats sont fournis en plus du nombre total de descendants vivants produits à la fin de l'essai. Du fait du mode opératoire particulier des essais semi-statiques par rapport aux autres Lignes directrices de l'OCDE sur la reproduction des invertébrés, il est également possible de compter le nombre de descendants vivants produits individuellement par chaque animal parent. Ainsi, contrairement aux autres essais de l'OCDE sur la reproduction des invertébrés, on peut exclure de l'analyse les données correspondant aux descendants d'un animal parent décédé de manière accidentelle et/ou fortuite pendant l'exposition. En l'occurrence, si une mortalité parentale se produit dans les répliquats exposés à la substance d'essai, il convient d'analyser si cette mortalité suit une courbe concentration-réponse, par exemple s'il existe une régression significative de la réponse par rapport à la concentration testée de la substance d'essai, avec une pente positive (un test statistique tel que le test de tendance de Cochran-Armitage peut être utilisé à cet effet). Si la mortalité parentale ne suit pas de courbe concentration-réponse, alors les répliquats montrant une mortalité parentale sont exclus de l'analyse des résultats. Si la mortalité parentale suit une courbe de concentration-réponse, cette mortalité est assimilée à un effet de la substance d'essai testée et les répliquats ne sont pas exclus de l'analyse des résultats. Si le parent meurt au cours de l'essai de manière accidentelle ou fortuite non liée à la substance testée, ou se révèle être un parent de sexe masculin, alors le répliquat est exclu de l'analyse des résultats (voir paragraphe 51). L'effet toxique de la substance d'essai sur le taux de reproduction est mesuré par la CE_x , les données étant ajustées à un modèle approprié au moyen d'une régression non linéaire en vue d'estimer la concentration qui entraînerait x % de réduction du taux de reproduction, respectivement, ou encore par celle de la CSEO/CMEO (4). Il est préférable que les concentrations d'essai encadrent la concentration efficace minimale (p. ex. CE_{10}), de sorte que cette valeur soit déterminée par interpolation et non par extrapolation.

5. Il convient aussi d'indiquer le taux de survie des animaux parents et le moment de la première portée. D'autres effets liés à la substance sur des paramètres tels que la croissance (p. ex. la longueur) et éventuellement le taux intrinsèque d'accroissement de la population peuvent aussi être examinés (voir paragraphe 44).

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

6. Les résultats d'un essai de toxicité aiguë (voir LD 202 : *Daphnia* sp., essai d'immobilisation immédiate) réalisé sur *Daphnia magna* peuvent être utiles pour sélectionner une gamme de concentrations

d'essai adaptée aux essais de reproduction. Il convient que la solubilité dans l'eau et la pression de vapeur de la substance d'essai soient connues. De même, il convient de disposer d'une méthode d'analyse fiable pour doser la substance dans les solutions d'essai dont le rendement de récupération et la limite de détermination sont connus.

7. Des informations sur la substance d'essai qui peuvent être utiles pour établir les conditions de l'essai comprennent la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pKa, le coefficient de partage P_{oe} et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir Lignes directrices 301 et 310).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

8. Pour que l'essai soit valide, il convient que les témoins remplissent les critères de performance suivants :

- la mortalité des animaux parents (*Daphnia* femelles) ne dépasse pas 20 % à la fin de l'essai ;
- le nombre moyen de descendants vivants par animal parent survivant à la fin de l'essai est ≥ 60 .

Note : Le même critère de validité (20 %) peut s'appliquer pour la mortalité parentale aléatoire ou accidentelle chez les témoins ainsi que pour chacune des concentrations d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

9. Les récipients et autres équipements qui sont amenés à entrer en contact avec les solutions d'essai sont intégralement en verre, ou en un autre matériau chimiquement inerte. On utilisera en principe des béchers en verre.

10. En outre, il sera nécessaire d'employer une partie ou la totalité du matériel suivant :

- appareil pour mesurer la concentration de l'oxygène (à l'aide d'une microélectrode ou d'un autre dispositif destiné à mesurer l'oxygène dissous dans des échantillons de faible volume) ;
- appareillage adéquat pour maintenir la température constante ;
- pH-mètre ;
- appareil pour mesurer la dureté de l'eau ;
- appareil pour déterminer la concentration de carbone organique total (COT) dans l'eau ou la demande chimique en oxygène (DCO) ;
- dispositif approprié pour régler le régime d'éclairage et mesurer l'intensité lumineuse.

Organisme d'essai

11. L'espèce à utiliser dans cet essai est *Daphnia magna* Straus¹.

(1) On peut faire appel à d'autres espèces de *Daphnia* à condition qu'elles respectent les critères de validité pertinents (le critère relatif au taux de reproduction des témoins s'applique aux espèces de *Daphnia*). Si

12. Le clone devrait de préférence avoir été identifié d'après son génotype. La recherche (1) a montré que la capacité reproductrice du clone A (originaire de l'IRCHA, en France) (5) répond de façon stable au critère de validité qui stipule une moyenne ≥ 60 descendants vivants par animal parent survivant lorsqu'il est élevé dans les conditions que décrit la présente LD. D'autres clones sont toutefois acceptables à condition de prouver que la culture de *Daphnia* remplit les critères de validité pour l'essai.

13. Au début de l'essai, les animaux sont âgés de moins de 24 heures et ne peuvent pas provenir d'une première génération de descendants. Ils sont issus d'un lot sain (c'est-à-dire qui ne présente pas de signes de stress, tels qu'une mortalité élevée, la présence de mâles et d'éphippies, un retard dans la production des premiers descendants, des animaux décolorés, etc.). Le lot d'animaux est maintenu dans des conditions de culture (lumière, température, milieu, alimentation et nombre d'animaux par unité de volume) semblables à celles qui seront appliquées au cours de l'essai. Si le milieu utilisé dans l'essai est différent de celui où sont normalement élevées les *Daphnia*, il convient de laisser aux *Daphnia* une période d'acclimatation, avant l'essai, qui dure habituellement trois semaines environ (c'est-à-dire une génération), afin d'éviter de stresser les animaux parents.

Milieu d'essai

14. Il est recommandé d'utiliser un milieu entièrement défini dans cet essai. On peut ainsi éviter d'employer des additifs (p. ex. des algues, des extraits de sol), qui sont difficiles à caractériser, et améliorer les possibilités de normalisation entre les laboratoires. Les milieux Elenndt M4 (6) et M7 (voir annexe 2) se sont révélés pertinents à cette fin. D'autres milieux sont cependant acceptables [par exemple (7) et (8)], à condition que les *Daphnia* élevées dans ces milieux satisfassent aux critères de validité établis pour l'essai.

15. Si le milieu utilisé contient des additifs non définis, ceux-ci seront spécifiés clairement et le rapport d'essai devra comporter des informations sur la composition, notamment la teneur en carbone, étant donné qu'elle peut contribuer au régime alimentaire fourni. On préconise de déterminer le carbone organique total (COT) et/ou la demande chimique en oxygène (DCO) de la solution mère de l'additif organique et d'estimer leur incidence sur le COT et la DCO du milieu d'essai. En outre, il est conseillé de maintenir les niveaux de COT dans le milieu (c'est-à-dire avant l'ajout des algues) inférieurs à 2 mg/L (9).

16. Lorsque l'on teste des substances contenant des métaux, il est important de reconnaître que les propriétés du milieu d'essai (p. ex. la dureté, le pouvoir de chélation) peuvent influencer leur toxicité. C'est pourquoi il est souhaitable d'opérer dans un milieu entièrement défini. Néanmoins, dans l'état actuel des connaissances, les seuls milieux entièrement définis qui conviennent aux cultures à long terme de *Daphnia magna* sont Elenndt M4 et M7. Ces deux milieux contiennent l'agent chélatant EDTA. Des travaux ont montré (2) que la « toxicité apparente » du cadmium est généralement moindre lorsque l'essai de reproduction est effectué dans les milieux M4 et M7, que dans des milieux ne contenant pas d'EDTA. M4 et M7 ne sont donc pas recommandés pour tester des substances contenant des métaux, de même que d'autres milieux contenant des agents chélatants connus. Il est souhaitable d'utiliser un autre milieu pour les substances renfermant des métaux, par exemple l'eau douce calcaire reconstituée d'ASTM (9), qui ne contient pas d'EDTA. La combinaison de l'eau douce calcaire reconstituée d'ASTM et de l'extrait d'algues (10) convient également aux cultures à long terme de *Daphnia magna* (2).

d'autres espèces de *Daphnia* sont employées, il y a lieu de les identifier clairement et de justifier leur utilisation.

17. La concentration de l'oxygène dissous est supérieure à 3 mg/L au début de l'essai et durant celui-ci. Le pH est compris entre 6 et 9 et normalement ne pas varier de plus de 1.5 unité au cours d'un même essai. Une dureté supérieure à 140 mg/L (en CaCO₃) est recommandée. La capacité reproductrice des animaux dans les essais pratiqués à un niveau au moins égal à ce seuil s'est révélée conforme aux critères de validité (11) (12).

Solutions d'essai

18. Les solutions d'essai sont généralement amenées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. Idéalement, les solutions mères sont préparées sans solvants ni dispersants, dans la mesure du possible, en mélangeant ou en agitant la substance d'essai dans le milieu d'essai par des moyens mécaniques comme l'agitation ou le traitement aux ultrasons, ou d'autres méthodes appropriées. Il est préférable d'exposer les systèmes d'essai aux concentrations de la substance d'essai qui seront employées dans l'étude, aussi longtemps que nécessaire pour démontrer que l'on peut maintenir des concentrations d'exposition stables avant d'introduire les organismes d'essai. Si la substance d'essai est difficile à dissoudre dans l'eau, il convient de suivre les procédures décrites dans le document d'orientation de l'OCDE relatif à l'essai de substances difficiles (13). Le recours à des solvants ou à des dispersants devrait être évité, mais peut se révéler nécessaire dans certains cas pour obtenir une solution mère de concentration appropriée pour l'exposition.

19. Outre les concentrations à tester, l'essai comprendra un témoin de l'eau de dilution et, si cela est impératif, un solvant témoin, avec le nombre de réplicats respectifs adéquat. Seuls les solvants ou les dispersants dont les effets sur la variable de réponse se sont avérés non significatifs ou minimes seront utilisés dans l'essai. Des exemples de solvants (p. ex. acétone, éthanol, méthanol, diméthylformamide et triéthylène glycol) et de dispersants (p. ex. Cremophor RH40, méthylcellulose 0.01 % et HCO-40) adéquats sont fournis dans le document (13). En cas d'utilisation d'un solvant ou d'un dispersant, sa concentration finale ne dépasse pas 0.1 mL/L (13) et il est identique dans tous les récipients d'essai, sauf pour le témoin de l'eau de dilution. Cependant, on mettra tout en œuvre pour limiter la teneur en solvant autant que faire se peut.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition

Durée

20. La durée de l'essai est de 21 jours.

Charge

21. Les animaux parents sont répartis individuellement dans des récipients d'essai contenant en général 50 à 100 mL de milieu chacun (avec *Daphnia magna*, on peut abaisser ce volume, notamment pour les daphnies de plus petite taille comme *Ceriodaphnia dubia*), à moins qu'un essai dynamique ne soit requis.

22. Il est parfois nécessaire d'avoir recours à des volumes plus grands, afin de pouvoir appliquer la méthode d'analyse utilisée pour déterminer la concentration de la substance d'essai, bien qu'il soit aussi possible de regrouper les réplicats aux fins de l'analyse chimique. Si des volumes supérieurs à 100 mL

sont employés, il faudra peut-être augmenter la ration distribuée aux *Daphnia*, afin que la nourriture disponible soit suffisante et que les critères de validité soient satisfaits.

Animaux d'essai

23. Pour les essais semi-statiques, on utilisera au moins 10 animaux répartis individuellement à chaque concentration d'essai et au moins 10 animaux répartis individuellement dans la série des témoins.

24. Pour les essais dynamiques, il s'avère approprié d'utiliser 40 animaux répartis en quatre groupes de 10 à chaque concentration d'essai (1). Un plus petit nombre d'organismes d'essai peut être utilisé, mais on recommande d'employer au moins 20 animaux par concentration, répartis dans au moins deux récipients contenant le même nombre d'animaux (p. ex. quatre réplicats contenant cinq daphnies chacun). On notera qu'en ce qui concerne les essais où les animaux sont maintenus en groupes, il sera impossible d'exclure un descendant de l'analyse statistique en cas de mort fortuite/accidentelle d'un parent à partir du moment où la reproduction a commencé. Le cas échéant, il faudra donc exprimer le taux de reproduction par le nombre total de descendants vivants par parent présent au début de l'essai.

25. Les traitements sont répartis de façon aléatoire entre les récipients d'essai, et toutes les manipulations ultérieures de ceux-ci se font de même. Faute de quoi, les résultats pourraient présenter un biais qui risquerait d'être interprété comme un effet de la concentration. Notamment, si les unités expérimentales sont manipulées par ordre de traitement ou de concentration, certains effets liés au temps, comme la fatigue du manipulateur ou d'autres erreurs, pourraient avoir un impact plus prononcé aux concentrations supérieures. En outre, si les résultats de l'essai sont susceptibles d'être affectés par une condition initiale ou liée à l'environnement, comme la situation dans le laboratoire, il faut envisager d'arrêter l'essai.

Alimentation

26. Dans les essais semi-statiques, on préconise d'administrer une ration quotidienne, ou au moins trihebdomadaire (ce qui correspond au renouvellement du milieu). Une dilution éventuelle des concentrations d'exposition due à l'administration de nourriture sera prise en compte et évitée autant que faire se peut, à l'aide de suspensions d'algues de concentration adéquate (voir paragraphe 29). Les écarts à ce régime (p. ex. dans les essais dynamiques) sont signalés.

27. Au cours de l'essai, le régime alimentaire des animaux parents sera de préférence composé d'algues unicellulaires vivantes appartenant à une ou plusieurs espèces parmi les suivantes : *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (anciennement *Selenastrum capricornutum*) et *Desmodesmus subspicatus* (anciennement *Scenedesmus subspicatus*). La nourriture est dispensée en fonction de la teneur en carbone organique (C) fournie à chaque animal parent. La recherche (14) a montré que pour *Daphnia magna*, des teneurs comprises entre 0.1 et 0.2 mg de C/*Daphnia*/jour dans la ration alimentaire suffisent pour produire le nombre de descendants vivants requis selon les critères de validité. On peut fournir des rations à teneur constante tout au long de l'essai ou utiliser des teneurs plus faibles au début, que l'on augmentera afin de tenir compte de la croissance des animaux parents. Dans ce cas, la ration devra toujours contenir entre 0.1 et 0.2 mg de C/*Daphnia*/jour, qui est la teneur recommandée.

28. Si des paramètres de remplacement, comme le nombre de cellules d'algues ou l'absorbance de la lumière, sont utilisés pour doser la teneur en carbone requise dans la ration alimentaire (notamment pour des raisons pratiques, si la mesure de la teneur en carbone est trop longue), chaque laboratoire est tenu de produire son propre nomogramme reliant le paramètre de remplacement à la teneur en carbone de la

culture d'algues (des conseils concernant l'établissement d'un nomogramme sont donnés à l'annexe 3). Les nomogrammes devraient être vérifiés au moins une fois par an, et plus souvent si les conditions de culture des algues ont changé. Il a été démontré que l'absorbance de la lumière donne une meilleure indication de la teneur en carbone que le nombre de cellules (15).

29. Il convient d'administrer une suspension d'algues concentrée aux *Daphnia* afin de réduire au minimum le volume du milieu de culture des algues transféré dans les récipients d'essai. On peut concentrer les algues par centrifugation, puis remise en suspension dans le milieu de culture des *Daphnia*.

Lumière

30. Seize heures de lumière à une intensité ne dépassant pas 15 à 20 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ mesurée au niveau de la surface de l'eau du récipient. En ce qui concerne les instruments de mesure de la lumière étalonnés en lux, la gamme de 1 000 – 1 500 lux pour la lumière blanche froide correspond étroitement à l'intensité lumineuse recommandée de 15 – 20 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Température

31. La température du milieu d'essai sera comprise entre 18 °C et 22 °C. Toutefois, dans un même essai, la température ne varie pas, si possible, quotidiennement de plus de 2 °C au sein de cet intervalle (p. ex. 18 – 20 °C, 19 – 21 °C ou 20 – 22 °C). Il peut être utile d'utiliser un récipient d'essai supplémentaire pour surveiller la température.

Aération

32. Les récipients d'essai ne sont pas aérés durant l'essai.

Modèle de l'essai

Essai préliminaire de détermination des concentrations

33. Si nécessaire, un essai de détermination de l'ordre de grandeur sera mené avec, par exemple, cinq concentrations de la substance d'essai. On utilisera deux réplicats par concentration d'essai et par témoin. Des informations supplémentaires, provenant d'essais avec des composés similaires ou tirées d'études déjà publiées et portant sur la toxicité aiguë pour *Daphnia* et/ou d'autres organismes aquatiques peuvent également être utiles pour décider de la gamme de concentrations à utiliser dans l'essai de détermination de l'ordre de grandeur.

34. L'essai de détermination de l'ordre de grandeur dure 21 jours ou suffisamment longtemps pour prévoir l'ampleur des effets de manière fiable. À l'issue de cet essai, on étudie la reproduction de *Daphnia*. Le nombre de parents et la production de descendants sont consignés.

Essai final

35. Normalement, on teste au moins cinq concentrations d'essai qui encadrent la concentration efficace (p. ex. CE_x), et forment une série géométrique avec des concentrations successives séparées, de préférence, par un facteur inférieur ou égal à 3.2. Il convient d'utiliser un nombre approprié de réplicats pour chaque concentration d'essai (voir paragraphes 24-25). L'étude de moins de cinq concentrations fait l'objet de justification. Il convient de ne pas tester les substances au-dessus de leur limite de solubilité

dans le milieu d'essai. Avant de réaliser l'expérience, il est souhaitable d'examiner l'efficacité statistique du mode opératoire et de faire appel à des méthodes statistiques appropriées (4). Lors de l'établissement de la gamme de concentrations, il convient de tenir compte des points suivants :

- (i) Si l'on veut estimer une CE_x relative aux effets sur la reproduction, il est conseillé d'utiliser suffisamment de concentrations pour définir la CE_x avec un niveau de confiance satisfaisant. Dans l'idéal, les concentrations d'essai encadrent la CE_x estimée de manière à ce que cette dernière puisse être déterminée par interpolation plutôt que par extrapolation. L'analyse statistique qui suit est favorisée si davantage de concentrations d'essai sont utilisées (p. ex. 10) avec moins de réplicats pour chaque concentration (p. ex. 5, ce qui maintient constant le nombre total de récipients) et 10 témoins.
- (ii) Si l'on cherche à déterminer la CMEO et/ou la CSEO, la plus faible concentration testée est suffisamment basse pour que le taux de reproduction à cette concentration ne soit pas significativement inférieur à celui du groupe témoin. Dans le cas contraire, il convient de recommencer l'essai en abaissant la concentration la plus faible.
- (iii) Si l'on cherche à déterminer la CMEO et/ou la CSEO, la plus forte concentration testée est suffisamment élevée pour que le taux de reproduction à cette concentration soit significativement inférieur à celui du groupe témoin. Dans le cas contraire, il convient de recommencer l'essai en augmentant la concentration la plus forte, à moins que celle-ci corresponde déjà à la concentration maximale requise pour tester les effets chroniques (soit 10 mg/L).

36. Si aucun effet n'est observé à la plus forte concentration utilisée lors de la détermination de l'ordre de grandeur (p. ex. 10 mg/L), ou s'il est très probable que la substance d'essai présentera une toxicité faible voire nulle du fait de son innocuité pour d'autres organismes et/ou parce que ces derniers l'absorbent peu ou pas du tout, il est possible de mener l'essai de reproduction comme un essai limite, en testant un témoin et une concentration de la substance d'essai de 10 mg/L, par exemple. Il convient alors d'utiliser dix réplicats pour les groupes exposés et pour les témoins. Si l'essai limite requiert un système dynamique, moins de réplicats pourront convenir. Un essai limite permettra de démontrer l'absence d'effet statistiquement significatif à la concentration limite. Néanmoins, si des effets apparaissent à cette occasion, un essai complet sera normalement nécessaire.

Témoins

37. Il convient de tester une série de témoins du milieu d'essai et, le cas échéant, une série de témoins contenant le solvant ou le dispersant, parallèlement aux séries traitées avec la substance d'essai. En cas de recours à un solvant ou à un dispersant, leur concentration est la même que dans les récipients qui contiennent la substance d'essai. Il convient d'utiliser un nombre approprié de réplicats (voir paragraphes 23-24).

38. Généralement, dans un essai correctement mené, le coefficient de variation autour du nombre moyen de descendants vivants par animal parent dans le ou les groupes témoins est $\leq 25\%$, et cette information est communiquée pour les essais où les animaux sont maintenus dans des récipients individuels.

Renouvellement du milieu d'essai

39. La fréquence de renouvellement du milieu dépendra de la stabilité de la substance d'essai, mais devrait être au moins trihebdomadaire. Si les essais préliminaires de stabilité (voir paragraphe 7) montrent que la concentration de la substance d'essai n'est pas stable (c'est-à-dire qu'elle sort de la gamme de 80 – 120 % de la concentration nominale ou tombe en dessous de 80 % de la concentration initiale mesurée) durant la période de renouvellement la plus longue (3 jours), il faut envisager de renouveler le milieu plus fréquemment ou de pratiquer un essai dynamique.

40. Lors du renouvellement du milieu dans les essais semi-statiques, on prépare une deuxième série de récipients d'essai en vue d'y transférer les animaux parents avec, par exemple, une pipette en verre d'un diamètre approprié. Il convient que le volume de milieu transféré avec les *Daphnia* soit le plus petit possible.

Observations

41. Les résultats des observations effectuées durant l'essai sont consignés dans des fiches de données (voir exemples aux annexes 4 et 5). Si d'autres mesures s'imposent (voir paragraphe 44), des observations supplémentaires pourront être requises.

Descendance

42. Les descendants engendrés par chaque animal parent seront de préférence retirés et comptés quotidiennement, dès la première portée, pour qu'ils ne consomment pas la nourriture destinée aux parents. Aux fins de la présente LD, on ne compte que les descendants vivants, mais la présence d'œufs avortés ou de descendants morts est signalée.

Mortalité

43. La mortalité des animaux parents est notée, de préférence quotidiennement, et au moins à chaque comptage des descendants.

Autres paramètres

44. Bien que la présente LD soit avant tout destinée à évaluer les effets sur le taux de reproduction, il se peut que d'autres effets soient suffisamment chiffrés pour se prêter à une analyse statistique. On pourra ainsi rapporter le taux de reproduction par animal parent survivant, c'est-à-dire le nombre de descendants vivants produits pendant l'essai par parent survivant. Cette donnée pourra être comparée à la principale variable de réponse (taux de reproduction par animal parent présent au début de l'essai et qui n'est pas mort de manière fortuite ou accidentelle pendant l'expérience). Si une mortalité parentale se produit dans les répliquats exposés à la substance d'essai, il convient d'analyser si cette mortalité suit une courbe concentration-réponse, par exemple s'il existe une régression significative de la réponse par rapport à la concentration testée de la substance d'essai, avec une pente positive (un test statistique tel que le test de tendance de Cochran-Armitage peut être utilisé à cet effet). Si la mortalité parentale ne suit pas de courbe concentration-réponse, alors les répliquats montrant une mortalité parentale sont exclus de l'analyse des résultats. Si la mortalité parentale suit une courbe de concentration-réponse, cette mortalité est assimilée à un effet de la substance d'essai testée et les répliquats ne sont pas exclus de l'analyse des résultats. Voir détails au paragraphe 51. La mesure de la croissance est très intéressante, puisqu'elle fournit des indications sur les éventuels effets sublétaux, ce qui peut se révéler utile pour compléter les résultats sur la

reproduction. On préconise de mesurer la longueur des animaux parents (la longueur du corps sans l'épine anale) à la fin de l'essai. D'autres paramètres peuvent être mesurés ou calculés : le moment de la première portée (et des portées suivantes), le nombre et la taille des portées par animal, le nombre de portées avortées, la présence de mâles parmi les néonates (OCDE, 2008) ou d'éphippies et, éventuellement, le taux intrinsèque d'accroissement de la population (voir définition à l'annexe 1 et procédures d'identification du sexe des néonates à l'annexe 7).

Fréquence des dosages analytiques et des mesures

45. La concentration de l'oxygène, la température, la dureté et le pH sont mesurés au moins une fois par semaine, avant et après le renouvellement des milieux, chez les témoins et dans les récipients qui renferment la concentration la plus élevée de la substance d'essai.

46. Au cours de l'essai, les concentrations de la substance à tester sont déterminées à intervalles réguliers.

47. Dans les essais semi-statiques, où l'on suppose que la concentration de la substance d'essai ne s'écartera pas de plus de 20 % de la concentration nominale (c'est-à-dire qu'elle restera comprise dans un intervalle de 80 à 120 %, voir paragraphes 6, 7 et 39), on recommande, au minimum, d'analyser les concentrations d'essai la plus élevée et la plus basse, dès leur préparation et au moment du renouvellement, dans les milieux qui viennent d'être renouvelés et dans ceux qui sont sur le point de l'être, une fois au cours de la première semaine de l'essai (les analyses seront pratiquées sur des échantillons prélevés dans la même solution, juste après la préparation de la solution et au moment du renouvellement). Ces déterminations sont ensuite répétées selon une fréquence au moins hebdomadaire.

48. S'agissant des essais où la concentration n'est pas supposée demeurer dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale, il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations d'essai, juste après leur préparation et au moment du renouvellement. Cependant, pour les essais où la concentration initiale mesurée de la substance d'essai sort de l'intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale, mais pour lesquels on peut montrer de façon suffisamment convaincante que les concentrations initiales sont répétables et stables (c'est-à-dire comprises dans un intervalle de 80 à 120 % des concentrations initiales), les déterminations chimiques peuvent se limiter durant les deuxième et troisième semaines aux concentrations d'essai la plus élevée et la plus basse. En tout état de cause, la détermination de la concentration de la substance d'essai avant le renouvellement n'est nécessaire que sur un seul réplicat de chaque concentration d'essai.

49. Si on pratique un essai dynamique, il convient de recourir à un régime de prélèvements identique à celui décrit pour les essais semi-statiques (mais l'analyse des solutions « anciennes » ne s'applique pas ici). Toutefois, il peut être souhaitable d'augmenter le nombre de prélèvements durant la première semaine (p. ex. trois séries de mesures) afin de vérifier la stabilité des concentrations d'essai. Dans ces types d'essai, le débit du diluant et de la substance d'essai sont contrôlés chaque jour.

50. S'il s'avère que la concentration de la substance d'essai a pu être correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration initiale mesurée ou nominale, les résultats peuvent être déduits des valeurs initiales mesurées ou nominales. Si l'écart par rapport à la concentration initiale mesurée ou nominale est supérieur à $\pm 20\%$, les résultats sont exprimés par rapport à la moyenne pondérée en fonction du temps (voir les conseils de calcul à l'annexe 6).

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Traitement des résultats

51. Le présent essai a pour objet d'établir l'effet de la substance d'essai sur le taux de reproduction. Le nombre total de descendants vivants par animal parent est calculé pour chaque récipient d'essai (c'est-à-dire pour chaque réplicat). En outre, la reproduction peut être évaluée en s'appuyant sur la production de descendants vivants par les organismes parents survivants. Cependant, la variable de réponse la plus pertinente du point de vue écologique est le nombre total de descendants vivants par animal parent qui n'est pas mort de manière accidentelle² ou fortuite³ au cours de l'essai. Si un animal parent meurt, soit accidentellement, soit de manière fortuite, ou s'il se révèle être un mâle, le réplicat est exclu de l'analyse. L'analyse reposera alors sur un nombre réduit de réplicats. Si un animal parent meurt dans un récipient recevant la substance d'essai, il convient d'examiner si la mortalité suit une fonction concentration-réponse, notamment s'il existe une régression importante de la réponse en fonction de la concentration de substance d'essai avec une pente positive (on pourra appliquer un test statistique comme le test de tendance de Cochran - Armitage à cette fin). Si la mortalité ne correspond pas à une fonction concentration-réponse, les réplicats présentant une mortalité parentale sont exclus de l'analyse des résultats de l'essai. Si la mortalité suit une fonction concentration-réponse, la mortalité parentale est considérée comme un effet de la substance d'essai et les réplicats concernés ne sont pas exclus de l'analyse des résultats de l'essai.

52. En résumé, si les effets sont exprimés par la CMEO et la CSEO ou par la CE_x , il est recommandé de calculer les effets sur la reproduction selon les deux variables de réponse mentionnées précédemment, à savoir :

- le nombre total de descendants vivants par animal parent non décédé de manière accidentelle ou fortuite pendant l'essai ;
- le nombre de descendants vivants par animal parent survivant ;

puis de choisir comme résultat final la valeur la plus faible des CSEO et CMEO ou CE_x déterminées avec ces deux différentes variables.

53. Avant de lancer l'analyse statistique, par exemple de type ANOVA ou la comparaison des groupes de traitement et des groupes témoins avec les tests de Student (test t), de Dunnett, de Williams, ou de Jonckheere - Terpstra (méthode descendante), il est conseillé de vérifier s'il est nécessaire de transformer les données pour satisfaire les exigences d'un test statistique particulier. Des méthodes non paramétriques peuvent être envisagées, comme les tests de Dunn ou de Mann - Whitney. Les intervalles de confiance à 95 % sont calculés pour les moyennes établies aux différentes concentrations.

54. Le nombre de parents survivants dans les témoins non traités constitue un critère de validité crucial, et il convient qu'il soit consigné et signalé. Par ailleurs, on versera au rapport tout autre signe indiquant un effet nocif, par exemple un comportement anormal, ainsi que les résultats toxicologiques importants.

CE_x

² Mortalité accidentelle : mortalité sans lien avec la substance d'essai et due à un événement accidentel (dont la cause est donc connue)

³ Mortalité fortuite : mortalité sans lien avec la substance d'essai, de cause inconnue

55. On calcule les CE_x et leurs limites de confiance supérieures et inférieures en utilisant des méthodes statistiques adéquates (p. ex. fonction logistique ou de Weibull, méthode simplifiée de Spearman - Karber, ou simple interpolation). Pour calculer la CE_{10} , la CE_{50} ou toute autre CE_x , on soumet la série complète de données à une analyse de régression.

CSEO/CMEO

56. Dans le cas d'une analyse statistique visant à déterminer la CSEO ou la CMEO, il convient d'utiliser des méthodes statistiques adéquates (conformément au Document 54 de l'OCDE intitulé *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*) (4). En général, les effets indésirables de la substance d'essai par rapport au témoin sont étudiés en procédant à une vérification de l'hypothèse unilatérale pour $p \leq 0.05$.

57. La distribution normale et l'homogénéité de la variance peuvent être vérifiées à l'aide d'un test statistique approprié, tel que le test de Shapiro - Wilk et le test de Levene, respectivement ($p \leq 0.05$). Une analyse de la variance à un facteur (ANOVA), puis des tests multi-comparaisons peuvent être effectués. Des tests de comparaisons multiples (test de Dunnett, par exemple) ou des tests d'analyse de tendance descendante (tel que le test de William ou celui de Jonckheere - Terpstra, méthode descendante) peuvent permettre de calculer d'éventuelles différences significatives ($p \leq 0.05$) entre les témoins et les diverses concentrations de substance d'essai [on choisira le test recommandé conformément au Document d'orientation de l'OCDE 54 (4)]. On peut toutefois utiliser des méthodes non paramétriques (tels que le test U de Bonferroni conformément à Holm ou le test de tendance de Jonckheere - Terpstra) pour déterminer la CSEO et la CMEO.

Essai limite

58. Si un essai limite a été mis en œuvre (comparaison du témoin et d'un seul traitement) et que les conditions requises pour les procédures de tests paramétriques (normalité, homogénéité) sont remplies, on peut évaluer les réponses métriques par le test de Student (test t). Un test t de variance inégale (comme le test de Welch) ou bien un test non paramétrique tel que le test U de Mann - Whitney peuvent être employés lorsque ces conditions ne sont pas satisfaites.

59. La détermination des différences significatives entre les témoins (témoin et solvant ou dispersant témoin), peut faire appel à l'analyse de plusieurs réplicats pour chaque témoin comme il est décrit pour l'essai limite. Lorsque les essais ne détectent aucune différence significative, il est possible de rassembler tous les réplicats des témoins et du solvant témoin. Dans le cas contraire, on compare tous les traitements avec le solvant témoin.

Rapport d'essai

60. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes :

Substance d'essai :

- état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes ;
- données permettant l'identification chimique, y compris la pureté.

Espèce d'essai :

- clone (préciser si son génotype a été déterminé), fournisseur ou source (quand elle est connue) et conditions de culture appliquées. Si on utilise une espèce autre que *Daphnia magna* il convient de le signaler et de le justifier.

Conditions d'essai :

- mode opératoire utilisé (par exemple, semi-statique ou dynamique, volume, charge en nombre de *Daphnia* par litre) ;
- photopériode et intensité lumineuse ;
- plan de l'essai (par exemple, nombre de réplicats, nombre de parents par récipient) ;
- détails du milieu de culture employé ;
- le cas échéant, ajout de matière organique (préciser la composition, la source, la méthode de préparation, le COT et la DCO des solutions mères, une estimation du COT et de la DCO résultants dans le milieu d'essai) ;
- informations détaillées concernant l'alimentation, dont la quantité (en mg de C/*Daphnia*/jour) et l'horaire (p. ex. le type d'aliment(s), y compris, pour les algues, le nom de l'espèce et, si elles sont connues, la variété et les conditions de culture) ;
- méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (la nature et la concentration du solvant ou du dispersant sont indiquées, le cas échéant).

Résultats :

- résultats des éventuelles études préliminaires sur la stabilité de la substance d'essai ;
- concentrations d'essai nominales et résultats de toutes les analyses permettant de déterminer la concentration de la substance d'essai dans les récipients d'essai (l'annexe 5 fournit des exemples de fiches de données) ; le rendement de récupération de la méthode et la limite de détermination sont aussi mentionnés ;
- qualité de l'eau dans les récipients d'essai (pH, température, concentration de l'oxygène dissous, COT et/ou DCO et dureté, le cas échéant) (l'annexe 4 donne un exemple de fiche de données) ;
- dénombrement complet des descendants vivants de chaque animal parent produits pendant l'essai (voir exemple de fiche de données à l'annexe 4) ;
- nombre et dates des décès chez les animaux parents (voir exemple de fiche de données à l'annexe 4) ;
- coefficient de variation du taux de reproduction chez les témoins (en fonction du nombre total de descendants vivants par animal parent survivant à la fin de l'essai) ;
- graphique représentant le nombre total de descendants vivants par animal parent pour chaque réplicat, à l'exception des animaux parents morts de manière accidentelle ou fortuite, en fonction de la concentration de la substance d'essai ;
- s'il y a lieu, graphique représentant le nombre total de descendants vivants par animal parent survivant dans chaque réplicat en fonction de la concentration de la substance d'essai ;
- le cas échéant, concentration minimale avec effet observé (CMEO) sur la reproduction, y compris une description des méthodes statistiques utilisées et une indication de l'ampleur de l'effet à prévoir (il est possible d'effectuer une analyse de l'efficacité avant de commencer l'essai pour fournir ces informations), et concentration sans effet observé (CSEO) sur la reproduction ; s'il y a lieu, mentionner également la variable de réponse employée pour établir la CMEO et la CSEO (soit le nombre total de descendants vivants par organisme maternel non décédé de manière accidentelle ou fortuite pendant l'essai, soit le nombre total

de descendants vivants par organisme maternel survivant) ainsi que la CMEO et la CSEO sur la mortalité des animaux parents ;

- S'il y a lieu, CE_x pour la reproduction et intervalles de confiance (par exemple à 90% ou 95%), ainsi qu'un graphique du modèle ajusté employé pour ces calculs, la pente de la courbe concentration-réponse et son écart-type ;
- autres effets biologiques observés ou mesurés : indiquer tout autre effet biologique observé ou mesuré (p. ex. croissance des animaux parents) avec justification appropriée, le cas échéant ;
- explication de tout écart par rapport à la LD.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.
- (2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.
- (3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.
- (4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.
- (5) Baird, D.J., *et autres* (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotox. and Environ. Safety*, 21, 257-265.
- (6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.
- (7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods
- (8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 775-782.
- (9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA
- (10) Baird, D.J., *et autres* (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
- (11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. et G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26: 1-8.
- (12) Cowgill, U.M. et Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.*, 120(2): 185-196.
- (13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.

- (14) Sims, I.R., S. Watson. et D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 12, 2053-2058.
- (15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *Arch. Hydrobiol.*, 128, 459-466.

ANNEXE 1**DEFINITIONS**

Les définitions suivantes sont utilisées dans le cadre de la présente LD:

Taux de reproduction : nombre de descendants vivants issus d'animaux parents pendant la période d'essai

Animaux parents : *Daphnia* femelles présentes au début de l'essai et dont la capacité reproductrice représente l'objet de cette étude.

Descendants : jeunes *Daphnia* engendrées par les animaux parents au cours de l'essai.

Mortalité accidentelle : mortalité non liée à la substance d'essai testée, et causée par un incident (c'est-à-dire par une cause connue)

Mortalité fortuite : mortalité non liée à la substance d'essai testée, et de cause inconnue

Concentration minimale avec effet observé (CMEO) : concentration d'essai la plus basse à laquelle on a observé un effet statistiquement significatif de la substance sur la reproduction et la mortalité des animaux parents (à $p < 0,05$) par rapport au témoin, durant une période d'exposition définie. Cependant, il convient que toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO produisent un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Si ces deux conditions ne peuvent être remplies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la CMEO (et donc de la CSEO).

Concentration (maximale) sans effet observé (CSEO) : concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO qui, comparée au témoin, n'a pas d'effet statistiquement significatif (à $p < 0,05$), durant une période d'exposition définie.

CE_x : concentration de la substance d'essai dissoute dans l'eau qui entraîne une diminution de x pour cent de la reproduction chez *Daphnia*, durant une période d'exposition définie.

Taux intrinsèque d'accroissement de population : mesure de l'accroissement de la population qui intègre la capacité reproductrice et la mortalité par tranche d'âge (1) (2) (3). Elle est nulle dans les populations à l'état stationnaire, positive dans les populations en croissance et négative dans les populations qui régressent. Cette dernière catégorie de population n'est évidemment pas durable et est vouée en fin de compte à l'extinction.

Limite de détection : la plus basse concentration susceptible d'être détectée, mais non chiffrée.

Limite de détermination : la plus basse concentration susceptible d'être mesurée quantitativement.

Mortalité : un animal est noté comme mort lorsqu'il est immobile, autrement dit lorsqu'il n'est pas capable de nager ou si aucun mouvement des appendices ou du postabdomen n'est observé dans les 15 secondes qui suivent l'agitation douce du récipient d'essai. (Si on utilise une autre définition, il convient que celle-ci soit stipulée avec sa référence).

- (1) Wilson, E.O. et Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

- (2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- (3) Meyer, J.S., Ingersoll, C.G., McDonald, L.L. et Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

ANNEXE 2PREPARATION DE MILIEUX ELENDT M7 ET M4 ENTIEREMENT DEFINISAcclimatation aux milieux Elendt M7 et M4

Certains laboratoires ont éprouvé des difficultés à transférer directement les *Daphnia* dans les milieux M4 (1) et M7. Ils sont toutefois parvenus à un certain résultat en les acclimatant progressivement, c'est-à-dire en les transférant de leur milieu vers un milieu à 30 pour cent d'Elendt, puis à 60 pour cent d'Elendt et enfin à 100 pour cent d'Elendt. La période d'acclimatation peut prendre jusqu'à un mois.

PréparationElements en traces

Différentes solutions mères (I), contenant chacune une seule substance en traces, sont tout d'abord préparées avec une eau d'une pureté adéquate, par exemple de l'eau désionisée, distillée ou obtenue par osmose inverse. A partir de ces différentes solutions mères (I), on prépare une deuxième solution mère unique (II) renfermant toutes les substances en traces (solution combinée), à savoir :

Solution(s) mère(s) I (substance unique)	Quantité ajoutée à l'eau mg/l	Concentration (par rapport au milieu M4)	Pour préparer la solution mère combinée II, ajouter la quantité suivante de solution mère I à l'eau mL/L	
			M4	M7
H ₃ BO ₃	57190	20 000 fois	1,0	0,25
MnCl ₂ •4 H ₂ O	7210	20 000 fois	1,0	0,25
LiCl	6120	20 000 fois	1,0	0,25
RbCl	1420	20 000 fois	1,0	0,25
SrCl ₂ •6 H ₂ O	3040	20 000 fois	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 fois	1,0	0,25
Mo Na ₂ O ₄ •2H ₂ O	1260	20 000 fois	1,0	0,25
Mo Na ₂ O ₄ •2H ₂ O	335	20 000 fois	1,0	0,25
CuCl ₂ •2 H ₂ O	260	20 000 fois	1,0	1,0
ZnCl ₂	200	20 000 fois	1,0	1,0
CoCl ₂ •6 H ₂ O	65	20 000 fois	1,0	1,0
KI	43,8	20 000 fois	1,0	1,0
KI	11,5	20 000 fois	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	5000	2 000 fois	-	-
NH ₄ VO ₃	1991	2 000 fois	-	-
Na ₂ EDTA•2 H ₂ O				
FeSO ₄ •7 H ₂ O				
Les solutions de Na ₂ EDTA et de FeSO ₄ sont préparées séparément, puis mélangées et immédiatement autoclavées. Cela donne :				
Solution 21 Fe-EDTA		1000 fois	20,0	5,0

Milieux M4 et M7

Les milieux M4 et M7 sont préparés à partir de la solution mère II, des macronutriments et des vitamines, de la façon suivante :

	Quantité ajoutée à l'eau mg/l	Concentration (par rapport au milieu M4)	Quantité de solution mère ajoutée pour préparer le milieu mL/L	
			M4	M7
Solution mère II (combinaison de substances en traces)		20 fois	50	50
Solutions mères contenant les macronutriments (une substance par solution)				
CaCl ₂ •2 H ₂ O	293 800	1 000 fois	1,0	1,0
MgSO ₄ •7 H ₂ O	246 600	2 000 fois	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 fois	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000 fois	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ •9 H ₂ O	50 000	5 000 fois	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000 fois	0,1	0,1
NaNO ₃	1 430	10 000 fois	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 840	10 000 fois	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄				
Solution mère de vitamines combinées	-	10 000 fois	0,1	0,1
La solution mère de vitamines combinées est préparée en additionnant 3 vitamines à 1 litre d'eau, comme indiqué ci-dessous :				
	mg/l			
Chlorhydrate de thiamine	750	10 000 fois		
Cyanocobalamine (B12)	10	10 000 fois		
Biotine	7,5	10 000 fois		

La solution mère de vitamines combinées est congelée par petites parties aliquotes. Les vitamines sont ajoutées au milieu peu avant son utilisation.

N.B.: Afin d'éviter que les sels ne précipitent lorsqu'on prépare le milieu complet, on ajoute les parties aliquotes de solution mère à quelque 500 à 800 mL d'eau désionisée et on amène le volume à un litre.

N.N.B: La première publication relative au milieu M4 se trouve dans Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

ANNEXE 3

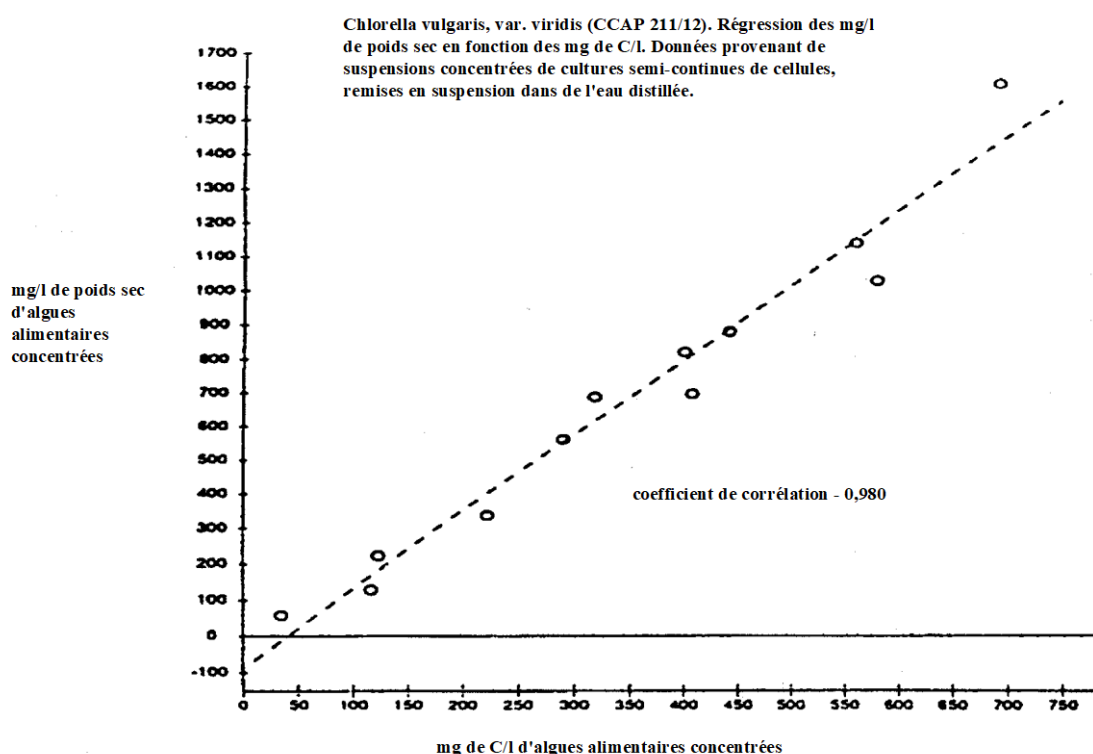
**ANALYSE DE LA TENEUR EN CARBONE ORGANIQUE TOTAL (COT) ET
ETABLISSEMENT D'UN NOMOGRAMME POUR LA TENEUR EN COT DANS LES
ALIMENTS A BASE D'ALGUES**

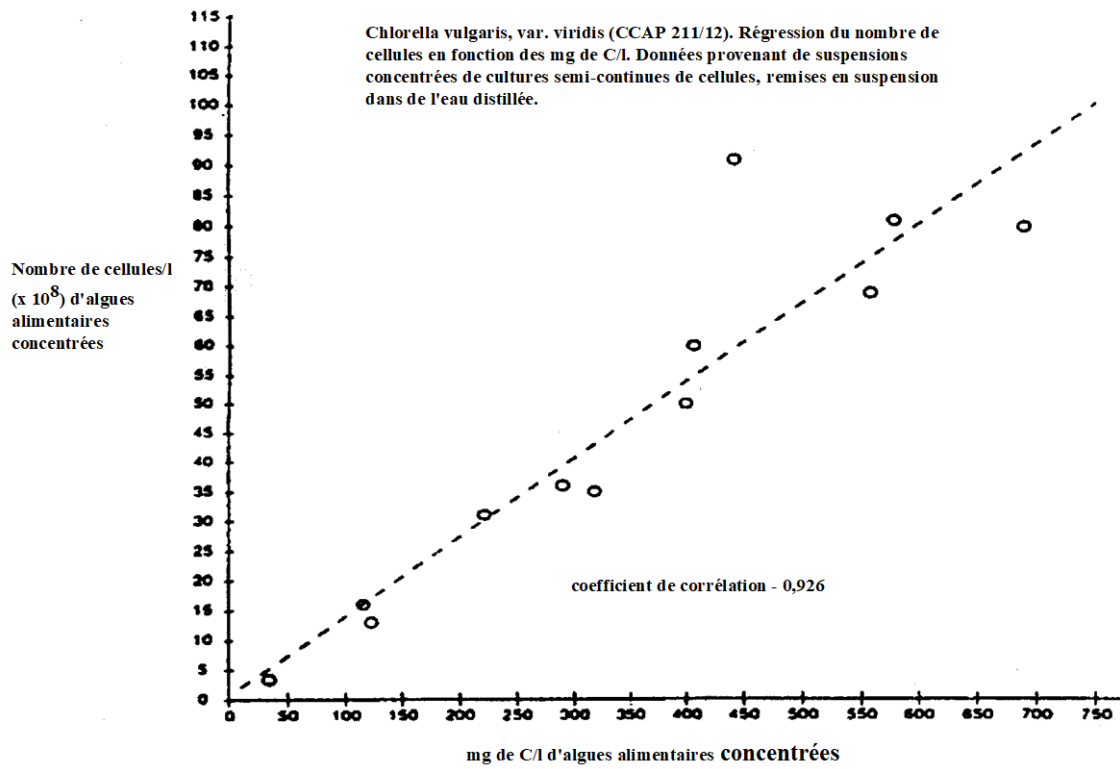
Il est admis que la teneur en carbone des algues alimentaires n'est généralement pas mesurée directement, mais déduite de corrélations (par nomogramme) avec des paramètres de remplacement, comme le nombre de cellules d'algues ou l'absorbance de la lumière.

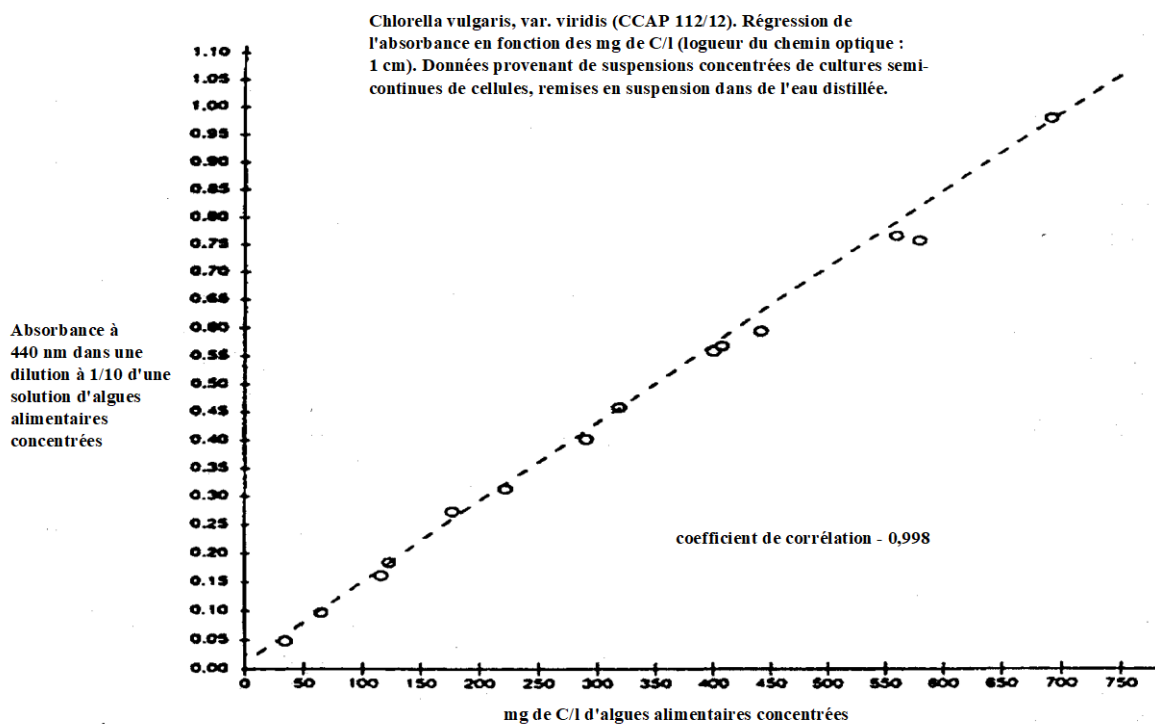
Il faudrait mesurer le COT par oxydation à haute température plutôt que par les méthodes aux UV ou au persulfate. (Pour s'orienter voir : The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Pour établir le nomogramme, il y a lieu d'isoler les algues du milieu de croissance par une centrifugation suivie d'une remise en suspension dans de l'eau distillée. On mesure le paramètre de remplacement et la teneur en COT dans chaque échantillon, produit en triple exemplaire. Les témoins contenant uniquement de l'eau distillée devraient être analysés et la teneur en COT déduite de celle de l'échantillon contenant les algues.

Les nomogrammes devraient être linéaires sur la gamme de teneurs en carbone utilisée. Des exemples sont montrés ci-dessous.







ANNEXE 4 : EXEMPLE DE FICHE POUR CONSIGNER LE RENOUELEMENT DU MILIEU, LES DONNEES DE SURVEILLANCE PHYSICO-CHIMIQUE, L'ALIMENTATION, LA REPRODUCTION DES DAPHNIES ET LA MORTALITE DES PARENTS

Expérience n°: Date de départ: Clone: Milieu: Type d'alimentation: Substance d'essai:
 Concentration nominale:

Jour	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Renouvellement du milieu (cocher)																								
pH*																							nouveau	
																							ancien	
O ₂ (mg/l)*																							nouveau	
																							ancien	
Temp. (°C)*																							nouveau	
																							ancien	
Alimentation fournie (cocher)																								
Nbre descendants vivants**																								Total
1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																								Total
Mortalité cumulée des parents***																								

* Indiquer quel récipient a été utilisé pour l'essai ** Indiquer les portées avortées par les lettres "AB" dans la case appropriée

*** Indiquer la mortalité d'un quelconque animal parent par la lettre "M" dans la case appropriée

ANNEXE 5

EXEMPLE DE FICHE DE DONNEES POUR CONSIGNER LES RESULTATS DE L'ANALYSE CHIMIQUE

(a) Concentrations mesurées

Concentration nominale	échantillon prélevé durant la première semaine		échantillon prélevé durant la deuxième semaine		échantillon prélevé durant la troisième semaine	
	après renouvellement	avant renouvellement	après renouvellement	avant renouvellement	après renouvellement	avant renouvellement

(b) Concentrations mesurées en pourcentage de la concentration nominale

Concentration nominale	échantillon prélevé durant la première semaine		échantillon prélevé durant la deuxième semaine		échantillon prélevé durant la troisième semaine	
	après renouvellement	avant renouvellement	après renouvellement	avant renouvellement	après renouvellement	avant renouvellement

ANNEXE 6CALCUL D'UNE MOYENNE PONDEREE SUR LE TEMPS**Moyenne pondérée sur le [en fonction du] temps**

Etant donné que la concentration d'une substance d'essai peut diminuer au cours de la période comprise entre les renouvellements du milieu, il est nécessaire de rechercher la concentration qui devrait être considérée comme représentative de la gamme de concentrations que subissent les *Daphnia* parents. Le choix devrait s'appuyer sur des considérations biologiques aussi bien que statistiques. Si on estime, par exemple, que la reproduction est surtout affectée par la concentration maximale, il convient d'utiliser la concentration maximale. Si, par contre, on juge que c'est l'effet cumulé ou à long terme de la substance toxique qui est prépondérant, il est plus pertinent de prendre une concentration moyenne. Dans ce cas, la concentration moyenne pondérée sur le temps convient, puisqu'elle tient compte de la variation de la concentration instantanée en fonction du temps.

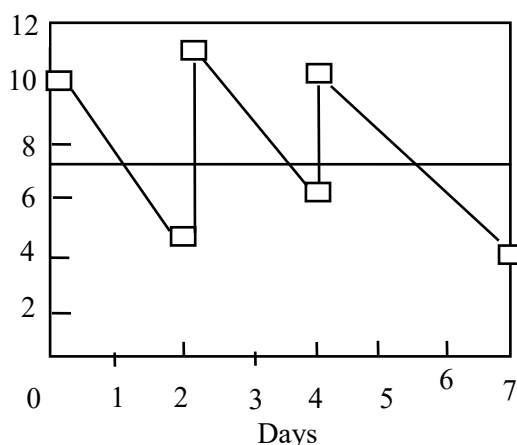


Figure 1 : Exemple de moyenne pondérée sur le [en fonction] du temps

La figure 1 illustre un essai (simplifié) qui dure sept jours et dans lequel le milieu est renouvelé aux jours 0, 2 et 4.

* La ligne fine en zigzag représente la concentration en fonction du temps. La chute de concentration est supposée suivre une évolution exponentielle.

* Les six points portés sur le graphique représentent les concentrations observées mesurées au début et à la fin de chaque période de renouvellement.

* La ligne épaisse indique la position de la moyenne pondérée sur le temps.

La moyenne pondérée sur le temps est calculée de façon que la superficie comprise en dessous de la moyenne pondérée en fonction du temps soit égale à la superficie située en dessous de la courbe de concentration. Le calcul correspondant à l'exemple figurant ci-dessus est illustré au tableau 1.

Tableau 1 : Calcul de la moyenne pondérée en fonction du temps

Renouvellement n°	Jours	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Superficie	
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767	
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544	
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781	
Nombre total de jours :					7	Superficie totale :	50,092
						Moyenne PT :	7,156

Jours correspond au nombre de jours de la période de renouvellement

Conc 0 est la concentration mesurée au début de chaque période de renouvellement

Conc 1 est la concentration mesurée à la fin de chaque période de renouvellement

$\ln(\text{Conc } 0)$ est le logarithme népérien de Conc 0

$\ln(\text{Conc } 1)$ est le logarithme népérien de Conc 1

La *superficie* est celle comprise en dessous de la courbe exponentielle de chaque période de renouvellement. Elle se calcule par la formule suivante :

$$\text{Superficie} = \frac{\text{Conc } 0 - \text{Conc } 1}{\ln(\text{Conc } 0) - \ln(\text{Conc } 1)} \times \text{Jours}$$

La moyenne pondérée sur le temps (*moyenne PT*) est la *superficie* totale divisée par le *nombre total de jours*.

Bien entendu, dans le cas de l'essai de reproduction chez *Daphnia*, le tableau devrait être étendu à 21 jours.

Il est clair que lorsque les observations ne sont faites qu'au début et à la fin de chaque période de renouvellement, il n'est pas possible d'affirmer avec certitude que la chute de concentration est effectivement exponentielle. Une courbe différente donnerait lieu à un calcul différent de la *superficie*. Cependant, une chute de concentration exponentielle est plausible et constitue probablement la meilleure courbe à utiliser en l'absence d'autres informations.

Il convient toutefois d'être prudent si l'analyse chimique ne détecte aucune substance à la fin de la période de renouvellement. Tant qu'il n'est pas possible d'estimer la vitesse de disparition de la substance dans la solution, il est impossible d'obtenir une superficie réaliste sous la courbe et, partant, une moyenne pondérée sur le temps qui soit raisonnable.

ANNEXE 7GUIDE POUR L'IDENTIFICATION DU SEXE DES NEONATES

La production de mâles parmi les descendants peut avoir lieu sous certaines conditions environnementales changeantes, telles que un raccourcissement de la photopériode, des variations de températures, une diminution de la concentration en nourriture, et une densité de population accrue (Hobaek and Larson, 1990 ; Kleiven et al, 1992). La production de mâles est aussi connue comme une réponse à certains régulateurs de croissance d'insectes (Oda et al, 2005). Dans des conditions où les facteurs de stress chimiques induisent une diminution des descendants issus de femelles parthénogéniques, un nombre accru de mâles serait attendu (OECD, 2008). Sur la base des informations disponibles, il n'est pas possible de prédire, entre le sexe des descendants ou l'effet sur la reproduction, laquelle de ces mesures sera la plus sensible ; cependant il existe des indications (OECD, 2008) tendant à montrer que l'induction de mâles dans la descendance pourrait être moins sensible que le nombre de descendants. Puisque l'objectif principal de la LD est d'évaluer le nombre de descendants produits, l'apparition de mâle dans cette descendance est une observation optionnelle. Si cette mesure optionnelle est évaluée dans une étude, alors il convient d'appliquer un critère de validité supplémentaire aux témoins : les témoins ne contiennent pas plus de 5% de descendants mâles.

La manière la plus pratique et la plus aisée de différencier le sex des daphnies est d'utiliser leurs caractéristiques phénotypiques, puisque les mâles et les femelles sont génétiquement identiques et leur sexe est déterminé par les conditions environnementales. Les mâles et les femelles diffèrent par leur longueur et par la morphologie de leurs premières antennes qui sont plus longues chez les mâles que chez les femelles (figure 1). Cette différence est reconnaissable dès la naissance, bien que d'autres caractéristiques sexuelles secondaires se développent à mesure que les animaux grandissent (voir figure 2 dans Olmstead et Leblanc, 2000).

Afin d'observer le sexe morphologique, les descendants produits par chaque parent sont transférés au moyen d'une pipette et placés dans une boîte de pétri content le milieu d'essai. Le milieu d'essai est maintenu au minimum pour minimiser les mouvements des animaux. L'observation de la première antenne peut être effectuée sous un stéréomicroscope (x10-60).

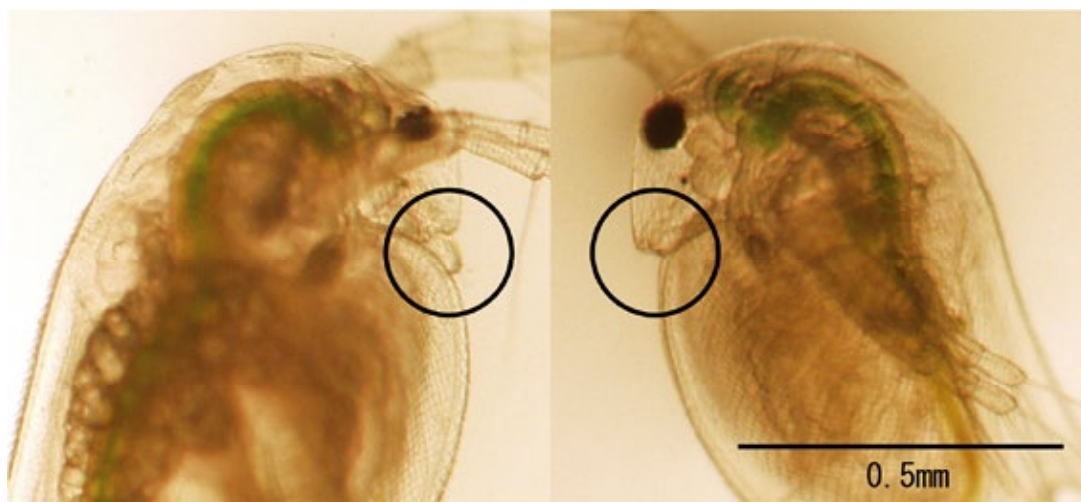


Figure. 1 mâle (à gauche) et femelle (à droite) de *D. magna* âgés de 24 heures. Les mâles peuvent se distinguer des femelles par la longueur et la morphologie de leur première paire d'antennes, comme indiqué dans le cercle (Tatarazako et al., 2004).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. *Ecology* 71: 2255-2268.
- (2) Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. *Oikos* 65, 197-206.
- (3) OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (4) Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. *Chemosphere* 61:1168-1174.
- (5) Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19:2107-2113.
- (6) Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). *Environmental Science* 17, 439-449.