

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

Poisson, essai de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin

INTRODUCTION

1. Cet essai de toxicité à court terme chez le poisson aux stades de l'embryon et de l'alevin consiste à exposer les stades compris entre l'oeuf qui vient d'être fécondé et la fin du stade de l'alevin. Aucune alimentation n'est fournie durant l'essai sur les embryons et les alevins, et l'essai devrait donc prendre fin alors que les alevins se nourrissent encore aux dépens de leur sac vitellin. Il s'appuie sur une proposition du Danemark qui a été examinée au cours d'une réunion OCDE d'experts organisée à Medmenham, au Royaume-Uni, en décembre 1991.
2. La présente Ligne directrice vise à déterminer les effets létaux et, dans une moindre mesure, sublétaux de produits chimiques à des stades définis de la vie des espèces testées.
3. La présente Ligne directrice ne remplace pas la Ligne directrice 210, mais devrait fournir des informations utiles en ce sens qu'elle pourrait (a) faire le lien entre les essais létaux et sublétaux, (b) servir d'essai de sélection pour un essai (complet) de toxicité aux premiers stades de la vie (Ligne directrice 210) ou un essai de toxicité chronique et (c) être utilisée pour tester des espèces pour lesquelles les techniques d'élevage ne sont pas suffisamment au point pour couvrir la période du passage de l'alimentation endogène à l'alimentation exogène.
4. Il convient d'être attentif au fait que seuls les essais couvrant tous les stades de la vie du poisson sont généralement susceptibles de donner une estimation précise de la toxicité chronique de produits chimiques pour les poissons, et que toute limitation de l'exposition écartant tel ou tel stade de la vie risque de diminuer la sensibilité et donc de donner lieu à une sous-estimation de la toxicité chronique. L'essai aux stades de l'embryon et de l'alevin devrait donc être moins sensible que l'essai (complet) de toxicité aux premiers stades de la vie (Ligne directrice 210), notamment en ce qui concerne les produits chimiques fortement lipophiles ($\log P_{oc} > 4$) et les substances possédant un mode d'action toxique particulier. On s'attend toutefois à ce que la différence de sensibilité entre les deux essais soit moindre pour les produits chimiques à mode d'action narcotique non spécifique (1).
5. Avant la publication de la présente Ligne directrice, l'essentiel de l'expérience que l'on possédait de cet essai sur les embryons et les alevins portait sur le poisson d'eau douce *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (téléostéens, cyprinidés - nom commun : danio). L'annexe 1 contient donc des indications plus détaillées à propos de l'exécution de l'essai sur cette espèce. D'autres espèces au sujet desquelles on dispose déjà d'une certaine expérience peuvent aussi être utilisées (Tableau 1).

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Les poissons aux stades de l'embryon et de l'alevin sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dissoute dans l'eau. Le protocole permet de choisir entre un essai semi-statique ou dynamique. Le choix dépend de la nature de la substance d'essai. L'essai

début au moment où l'on place les oeufs fécondés dans les enceintes expérimentales et prend fin juste avant que le sac vitellin d'une quelconque larve d'une quelconque enceinte expérimentale ait été complètement absorbé ou avant que des poissons témoins ne meurent d'inanition. Les effets létaux et sublétaux sont évalués et comparés aux valeurs des témoins, en vue de déterminer la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et, de là, la concentration (maximale) sans effet observé (CSEO) (voir les définitions à l'annexe 2). D'autre part, ils peuvent également être analysés à l'aide d'un modèle de régression permettant d'estimer la concentration qui provoquerait un certain pourcentage d'effet (CL/CE_x , où x représente un pourcentage d'effet défini).

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

7. Il faudrait disposer des résultats d'un essai de toxicité aiguë (voir Ligne directrice 203), mené de préférence sur l'espèce choisie pour cet essai-ci. Les résultats peuvent servir à sélectionner la gamme de concentrations appropriée pour l'essai sur les premiers stades de la vie. La solubilité dans l'eau (y compris la solubilité dans l'eau de l'essai) et la pression de vapeur de la substance d'essai doivent être connues. Pour déterminer la concentration de la substance dans les solutions d'essai, il convient d'appliquer une méthode d'analyse fiable, dont la précision et la limite de détection sont connues et mentionnées dans le rapport.

8. Les informations concernant la substance d'essai qui sont utiles à l'établissement des conditions de l'essai incluent la formule structurale, la pureté de la substance d'essai, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pKa, le coefficient de partage n-octanol/eau (P_{oc}) et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir Ligne directrice 301).

VALIDITE DE L'ESSAI

9. La validité de l'essai repose sur les conditions suivantes :

- le taux global de survie des oeufs fécondés dans les groupes témoins et, s'il y a lieu, dans les récipients ne contenant que le solvant doit être supérieur ou égal aux limites définies dans les annexes 3 et 4 ;
- la concentration de l'oxygène dissous doit se situer entre 60 et 100 pour cent de la valeur de saturation en air tout au long de l'essai ;
- à aucun moment au cours de l'essai, la température de l'eau ne doit varier de plus de $\pm 1,5^\circ\text{C}$ entre les différentes enceintes expérimentales ou entre deux jours consécutifs, et devrait être maintenue dans la gamme spécifiée pour l'espèce testée (annexes 3 et 4).

DESCRIPTION DE LA METHODE

Enceintes d'essai

10. N'importe quel récipient en verre ou fabriqué dans un matériau chimiquement inerte peut être utilisé. Les récipients doivent être suffisamment grands pour répondre aux critères de charge (voir paragraphe 21). Il est recommandé de placer les enceintes expérimentales au hasard dans la partie du laboratoire où se déroule l'essai. Il est souhaitable de disposer les enceintes expérimentales selon un schéma randomisé par bloc, chaque traitement étant représenté dans chaque bloc, plutôt que de les placer de façon complètement aléatoire, lorsqu'il existe des effets systématiques dans le laboratoire qui peuvent être contrecarrés par la randomisation par blocs. Si celle-ci est utilisée, elle

doit être prise en compte dans l'analyse ultérieure des résultats. Les enceintes expérimentales doivent être protégées de toute perturbation indésirable.

Sélection des espèces de poissons

11. Les espèces de poissons recommandées sont énumérées dans le tableau 1a. Cela n'exclut pas l'utilisation d'autres espèces (des exemples figurent au tableau 1b), mais le mode opératoire devra éventuellement être adapté afin d'offrir les conditions adéquates. Dans ce cas, la sélection de l'espèce et la méthode expérimentale doivent être justifiées.

Soin des poissons géniteurs

12. La Ligne directrice 210 et les références (2)(3)(4)(5)(6) donnent des indications détaillées sur la façon de maintenir les poissons géniteurs dans des conditions satisfaisantes.

Manipulation des embryons et des larves

13. Les embryons et les larves peuvent être exposés, au sein de la cuve principale, dans des récipients plus petits pourvus de côtés ou d'extrémités en filet, permettant le passage de la solution d'essai. Il est possible d'induire un écoulement non turbulent dans ces petits récipients en les suspendant à un bras qui déplace le récipient verticalement, en gardant toujours les organismes submergés ; un système de siphon peut aussi être employé. Les oeufs fécondés des salmonidés peuvent être posés sur des supports ou des grilles ayant des ouvertures suffisantes pour permettre aux larves de passer au travers après l'éclosion. Les pipettes Pasteur conviennent au prélèvement des embryons et des larves dans les essais semi-statiques où le milieu est entièrement renouvelé chaque jour (voir paragraphe 17).

14. Quand on utilise des récipients, des grilles ou des filets pour maintenir les oeufs à l'intérieur de la cuve d'essai principale, ces dispositifs doivent être enlevés après l'éclosion des larves, conformément aux conseils fournis dans la Ligne directrice 210, sauf si ces filets sont destinés à empêcher les poissons de s'échapper. Si les larves doivent être transférées, il ne faut pas les exposer à l'air, ni utiliser de filets pour enlever les poissons des récipients contenant les oeufs (ces précautions sont superflues pour des espèces moins fragiles, comme la carpe). Le moment de ce transfert varie avec l'espèce et il n'est pas toujours nécessaire. Dans les essais semi-statiques, des béciers ou des récipients peu profonds peuvent être utilisés, munis, si nécessaire, d'une grille placée un peu au-dessus du fond du récipient. Si le volume de ces récipients est suffisant pour satisfaire aux critères de charge (voir paragraphe 21), il n'est pas nécessaire de transférer les embryons ou les larves. En tout état de cause, on recommande de réduire au minimum la manipulation des embryons et des larves.

Eau

15. L'eau utilisée pour l'essai doit répondre aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable (énumérées à l'annexe 5) et permettre aux témoins d'avoir un taux de survie au moins aussi bon que celui décrit dans les annexes 3 et 4. Sa qualité devrait rester constante pendant toute la durée de l'essai. Le pH devrait être maintenu dans un intervalle de $\pm 0,5$ unités. Pour s'assurer que l'eau de dilution n'influencera pas indûment les résultats de l'essai (par exemple en complexant la substance d'essai) ou ne nuira pas au comportement des poissons géniteurs, des échantillons doivent être prélevés périodiquement en vue d'être analysés. Il y a lieu de mesurer la teneur en métaux lourds (par exemple, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), en principaux anions et cations (par exemple, Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), en pesticides (par exemple, la totalité des organophosphorés et la totalité des organochlorés), en carbone organique total et en solides en suspension. Ces mesures devraient être effectuées tous les trois mois, par exemple, lorsqu'on sait que l'eau de dilution présente une qualité relativement constante. Si la qualité de l'eau s'est avérée constante sur une période d'au moins un an, les déterminations pourront être plus espacées (par exemple, tous les six mois).

Solutions d'essai

16. Par dilution d'une solution mère, on prépare des solutions d'essai aux concentrations choisies. La solution mère devrait, de préférence, être préparée par simple mélange ou agitation mécanique de la substance d'essai dans l'eau de dilution, (par exemple, au moyen d'un agitateur ou par ultrasons). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) peuvent être utilisées pour amener la solution mère à la concentration souhaitée. Le recours à des solvants ou dispersants (agents solubilisants) doit être évité dans toute la mesure du possible ; il peut toutefois être nécessaire d'utiliser ces produits pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Les solvants qui conviennent sont, par exemple, l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthylformamide et le triéthylèneglycol. Parmi les dispersants adéquats, citons le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 pour cent et le HCO-40. Il convient d'être vigilant lorsqu'on utilise des agents facilement biodégradables (par exemple, l'acétone) et/ou volatils, car ils peuvent entraîner une prolifération bactérienne dans les essais dynamiques. L'agent solubilisant, le cas échéant, ne doit pas exercer d'effet significatif sur la survie, ni nuire de façon visible aux premiers stades de la vie, d'après l'observation d'un témoin ne comportant que le solvant. Cependant, l'usage de ces substances doit être évité dans toute la mesure du possible.

17. S'agissant des essais semi-statiques, deux méthodes de renouvellement peuvent être adoptées : soit (i) les nouvelles solutions d'essai sont préparées dans des récipients propres et l'on transvase avec précaution les oeufs et larves survivants vers les nouveaux récipients, dans un petit volume de solution ancienne, en évitant de les exposer à l'air, soit (ii) les organismes testés sont laissés dans leur récipient d'essai pendant qu'on renouvelle au moins les trois-quarts de leur eau. La fréquence de renouvellement du milieu dépendra de la stabilité de la substance d'essai, mais un renouvellement quotidien de l'eau est recommandé. Si les tests préliminaires de stabilité (voir paragraphes 7-8) révèlent que la concentration de la substance n'est pas stable (sort de l'intervalle de 80 à 120 pour cent de la concentration nominale ou tombe en dessous de 80 pour cent de la concentration mesurée initialement) au cours de la période de renouvellement, il faudrait envisager de pratiquer un essai dynamique. Quoi qu'il en soit, il convient d'éviter de stresser les larves durant le renouvellement de l'eau.

18. Les essais dynamiques nécessitent un système qui délivre et dilue en continu la solution mère de la substance d'essai (par exemple, une pompe doseuse, un dilueur proportionnel, un système de saturation), pour distribuer une série de concentrations vers les enceintes d'essai. Les débits des solutions mères et de l'eau de dilution doivent être contrôlés à intervalles quotidiens de préférence, et

ne devraient pas varier de plus de 10 pour cent tout au long de l'essai. Un débit équivalent à au moins cinq volumes d'enceintes expérimentales par 24 heures s'est avéré adéquat (2).

DEROULEMENT DE L'ESSAI

19. Des informations utiles concernant la marche à suivre pour les essais de toxicité sur les embryons de poisson et les alevins se trouvent dans les publications ; la bibliographie de ce texte en donne quelques références (7)(8)(9).

Conditions d'exposition

Durée

20. L'essai devrait débuter de préférence dans les 30 minutes qui suivent la fécondation des oeufs. Les embryons sont immergés dans la solution d'essai avant, ou aussitôt que possible après, le commencement de la phase de segmentation du blastodisque, et, dans tous les cas, avant le début du stade de la gastrula. Quand les oeufs proviennent d'un fournisseur commercial, il n'est pas toujours possible de débuter l'essai juste après la fécondation. Comme la sensibilité de l'essai peut être fortement influencée par un retard dans son lancement, l'essai devrait débuter dans les 8 heures qui suivent la fécondation. Les larves n'étant pas nourries durant la période d'exposition, l'essai doit s'achever juste avant que le sac vitellin d'une quelconque larve d'une quelconque enceinte expérimentale soit complètement absorbé ou avant que les témoins ne meurent d'inanition. La durée de l'essai dépendra de l'espèce utilisée. Certaines durées sont recommandées aux annexes 3 et 4.

Charge

21. Le nombre d'oeufs fécondés au début de l'essai doit être suffisant pour répondre aux critères statistiques. Il y a lieu de les répartir au hasard entre les différents traitements et d'utiliser au moins 30 oeufs fécondés répartis en nombre égal (ou aussi proche de l'égalité que possible, car il peut être difficile d'obtenir des lots identiques avec certaines espèces) entre au moins trois enceintes d'essai identiques pour chaque concentration. Le taux de charge (biomasse par volume de solution d'essai) doit être suffisamment bas pour qu'une concentration d'oxygène dissous d'au moins 60 pour cent de la valeur de saturation en air puisse être maintenue sans aération. Dans le cas des essais dynamiques, un taux de charge n'excédant pas 0,5 g/l par 24 heures et ne dépassant pas 5 g/l de solution, à tout moment, a été recommandé (2).

Lumière et température

22. La photopériode et la température de l'eau d'essai doivent être adaptées à l'espèce testée (voir annexes 3 et 4). En vue de surveiller la température, il peut être approprié d'utiliser un récipient d'essai supplémentaire.

Concentrations d'essai

23. On doit normalement utiliser cinq concentrations de la substance d'essai espacées par un facteur constant ne dépassant pas 3,2. La courbe de la CL_{50} en fonction de la période d'exposition, obtenue au cours de l'étude de toxicité aiguë, doit être prise en considération au moment de sélectionner la gamme des concentrations d'essai. Il peut être judicieux, dans certaines circonstances, d'utiliser moins de cinq concentrations, par exemple dans des essais limites, et un intervalle de concentrations plus étroit. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Il n'est pas nécessaire de tester les concentrations supérieures à la CL_{50} après 96 heures ou de 100 mg/l, lorsque la CL_{50} est supérieure à cette concentration. Les substances ne devraient pas être testées au-delà de leur limite de solubilité dans l'eau d'essai.

24. Lorsqu'un agent solubilisant est utilisé pour faciliter la préparation des solutions d'essai (voir paragraphe 16), sa concentration finale dans les récipients d'essai ne doit pas dépasser 0,1 ml/l et doit être identique dans tous les récipients d'essai.

Témoins

25. Un témoin contenant l'eau de dilution (en autant d'exemplaires que de besoin) et, le cas échéant, un témoin contenant l'agent solubilisant (en autant d'exemplaires que de besoin) doivent être étudiés parallèlement aux séries traitées avec la substance.

Fréquence des analyses quantitatives et des mesures

26. Au cours de l'essai, les concentrations de la substance d'essai sont déterminées à intervalles réguliers (voir paragraphes 27 et 28).

27. Dans les essais semi-statiques, où l'on suppose que la concentration de la substance d'essai demeure dans un intervalle de ± 20 pour cent autour de la concentration nominale (dans une gamme de 80 à 120 pour cent, voir paragraphes 7 et 17), il est recommandé, au minimum, d'analyser la concentration la plus basse et la plus élevée, dès leur préparation et juste avant le renouvellement du milieu, à au moins trois occasions régulièrement espacées au cours de l'essai (les analyses devraient être pratiquées sur des échantillons prélevés dans la même solution, dès leur préparation et au moment du renouvellement). Pour les essais dans lesquels la concentration de la substance d'essai ne devrait pas se maintenir dans un intervalle de ± 20 pour cent autour de la concentration nominale (d'après les résultats concernant la stabilité de la substance), il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations, dès leur préparation et au moment du renouvellement, mais selon le même régime, c'est-à-dire à au moins trois occasions, régulièrement espacées au cours de l'essai. La détermination des concentrations de la substance d'essai avant le renouvellement ne doit être réalisée que sur un seul récipient par concentration. Les déterminations ne devraient pas être espacées de plus de sept jours. On préconise de baser les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si les données disponibles montrent que la concentration de la substance d'essai dans la solution s'est maintenue correctement dans un intervalle de ± 20 pour cent autour de la concentration nominale ou mesurée au départ, tout au long de l'essai, les résultats peuvent s'appuyer sur la concentration nominale ou les valeurs mesurées au départ.

28. Dans le cas des essais dynamiques, il convient d'appliquer un régime de prélèvement d'échantillons similaire à celui décrit pour les essais semi-statiques (mais le dosage des solutions juste avant leur renouvellement ne s'applique pas ici). Néanmoins, si l'essai dure plus de sept jours, il peut être souhaitable d'augmenter le nombre de prélèvements au cours de la première semaine (par exemple, trois séries de mesures), afin de s'assurer que les concentrations d'essai restent stables.

29. On peut avoir dans certains cas à filtrer (avec, par exemple, des pores de 0,45 µm) ou à centrifuger les échantillons. Toutefois, comme ni la centrifugation, ni la filtration n'apparaissent toujours à même de séparer la fraction non biodisponible de la substance d'essai de sa fraction biodisponible, il peut être inutile de soumettre les échantillons à ces traitements.

30. Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le pH et la température doivent être mesurés dans tous les récipients d'essai. La dureté totale et la salinité, le cas échéant, doivent être déterminées dans les témoins et dans un des récipients contenant la concentration la plus élevée. L'oxygène dissous et la salinité, le cas échéant, doivent être mesurés au moins trois fois : au début, au milieu et à la fin de l'essai. Dans les essais semi-statiques, il est recommandé de mesurer l'oxygène dissous plus fréquemment, de préférence avant et après chaque renouvellement d'eau ou au moins une fois par semaine. Le pH devrait être mesuré au début et à la fin de chaque période de renouvellement d'eau dans les essais semi-statiques et au moins une fois par semaine dans les essais dynamiques. Il faudrait déterminer la dureté une fois dans chaque essai. La température devrait être mesurée quotidiennement et, de préférence, surveillée en continu dans au moins un récipient d'essai.

Observations

31. Stade de développement embryonnaire : le stade embryonnaire (stade de la gastrula) au début de l'exposition à la substance d'essai doit être vérifié aussi précisément que possible. Ceci peut se faire sur un échantillon représentatif d'oeufs bien conservés et rendus translucides. Des descriptions et des illustrations des stades embryonnaires peuvent être consultées dans les publications (2)(5)(10)(11).

32. Eclosion et survie : il faut observer et dénombrer les éclosions et les survivants au moins une fois par jour. Il peut être souhaitable d'effectuer des observations plus fréquentes au début de l'essai (par exemple, toutes les 30 minutes au cours des trois premières heures), puisque dans certains cas, la durée de la survie peut être plus pertinente que le seul nombre de morts (notamment en présence d'effets toxiques aigus). Les larves et embryons morts doivent être retirés dès qu'ils ont été observés, car ils peuvent se décomposer rapidement. Il convient d'être extrêmement attentif lorsqu'on retire les individus morts à ne pas heurter ou léser physiquement les oeufs et les larves adjacents, qui sont très délicats et sensibles. Les critères de décès varient selon le stade de la vie :

- pour les oeufs : en particulier au début de leur cycle, une diminution marquée de la transparence et un changement de coloration, dus à la coagulation et/ou à la précipitation de protéines et conduisant à un aspect blanc opaque.
- pour les embryons : pas de mouvement corporel et/ou pas de battement du coeur et/ou décoloration opaque chez les espèces dont les embryons sont normalement transparents ;
- pour les larves : immobilité et/ou absence de mouvement respiratoire et/ou absence de battement du coeur et/ou coloration blanche opaque du système nerveux central et/ou absence de réaction aux stimulations mécaniques.

33. Apparence anormale : on doit noter le nombre de larves présentant une anomalie de la forme du corps et/ou de la pigmentation, ainsi que le stade de l'absorption du sac vitellin, à des intervalles choisis en fonction de la durée de l'essai et de la nature de l'anomalie décrite. Il faut savoir que des larves et embryons anormaux surviennent de façon naturelle et que leur proportion peut atteindre quelques pour cent chez le(s) témoin(s) de certaines espèces. Les animaux anormaux ne doivent être retirés des récipients d'essai qu'à leur mort.

34. Comportement anormal : des anomalies telles qu'une hyperventilation, une nage mal coordonnée et une immobilité atypique doivent être notées à des intervalles qui dépendent de la durée

de l'essai. Ces effets, bien que difficiles à chiffrer, peuvent, lorsqu'ils sont observés, contribuer à l'interprétation des résultats de mortalité, notamment en fournissant un éclairage sur le mode d'action toxique de la substance.

35. Longueur : à la fin de l'essai, il est recommandé de mesurer la longueur de chaque individu, en prenant la longueur standard, la longueur à la fourche ou la longueur totale. Cependant, si l'on constate une putréfaction de la nageoire caudale ou une usure des nageoires, on doit employer la longueur standard. Habituellement, dans un essai correctement exécuté, le coefficient de variation de la longueur entre les différents récipients des témoins doit être ≤ 20 pour cent.

36. Poids : à la fin de l'essai, chaque individu peut être pesé ; le poids sec (24 heures à 60°C) est préférable au poids frais (poissons essuyés). Généralement, dans un essai correctement exécuté, le coefficient de variation du poids entre les différents récipients des témoins doit être ≤ 20 pour cent.

37. Ces observations permettront de livrer une partie ou la totalité des données suivantes à l'analyse statistique :

- mortalité cumulée ;
- nombre de larves saines à la fin de l'essai ;
- moment du commencement de l'éclosion et de la fin de celle-ci (90 pour cent d'oeufs éclos dans chaque enceinte de concentration identique) ;
- nombre de larves écloses chaque jour ;
- longueur (et poids) des animaux survivants à la fin de l'essai ;
- nombre de larves déformées ou d'apparence anormale ;
- nombre de larves présentant un comportement anormal.

RESULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

38. Il est recommandé qu'un statisticien participe à la fois à la conception et à l'analyse de l'essai, puisque cette Ligne directrice autorise des variations considérables dans la procédure expérimentale, par exemple en ce qui concerne le nombre d'enceintes expérimentales, le nombre de concentrations d'essai, le nombre initial d'oeufs fécondés et les paramètres mesurés. Compte tenu des choix possibles dans la conception de l'essai, on ne donnera pas ici d'orientations précises sur les méthodes statistiques.

39. Si la CMEO et la CSEO doivent être estimées, il sera nécessaire d'analyser les variations au sein de chaque série d'enceintes de concentration identique à l'aide de l'analyse de la variance ou de méthodes avec tableau de contingence. La méthode de Dunnett peut être utile pour procéder à des comparaisons multiples entre les résultats obtenus à chaque concentration et ceux des témoins (12) (13). Il existe d'autres exemples pertinents (14)(15). La grandeur de l'effet détectable par l'analyse de la variance ou par d'autres méthodes (c'est-à-dire la puissance de l'essai) devrait être calculée et mentionnée dans le rapport. Il faut savoir que les observations énumérées au paragraphe 37 ne se prêtent pas toutes au traitement statistique par l'analyse de la variance. A titre d'exemple, la mortalité cumulée et le nombre de larves saines à la fin de l'essai pourraient être analysés à l'aide de méthodes des probits.

40. S'il y a lieu d'estimer la CL et la CE_x , une courbe adéquate, telle que la courbe logistique, doit être ajustée aux résultats étudiés au moyen d'une méthode statistique telle que la méthode des moindres carrés ou des moindres carrés non linéaires. La ou les courbe(s) doivent être paramétrées de

façon que la CL et la CE_x recherchées et leur écart-type puissent être estimés directement. Cela facilitera beaucoup le calcul des limites de confiance autour de la CL et de la CE_x . A moins d'avoir de bonnes raisons de préférer d'autres niveaux de confiance, des limites de confiance de 95 pour cent de part et d'autre devraient être choisies. La procédure d'ajustement devrait, de préférence, permettre d'évaluer la signification du manque d'ajustement. Des méthodes graphiques pour ajuster les courbes peuvent être utilisées. Toutes les observations énumérées au paragraphe 37 se prêtent à l'analyse de la régression.

Interprétation des résultats

41. Les résultats doivent être interprétés avec prudence, lorsque les concentrations mesurées des produits toxiques dans les solutions d'essai sont proches des limites de détection de la méthode d'analyse. L'interprétation des résultats concernant les concentrations supérieures à la solubilité de la substance dans l'eau doit aussi se faire avec prudence.

Rapport d'essai

42. Les informations suivantes doivent figurer dans le rapport d'essai :

Substance d'essai :

- état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes ;
- données relatives à l'identification chimique, notamment la pureté et la méthode d'analyse quantitative de la substance d'essai, s'il y a lieu.

Espèce testée :

- nom scientifique, variété, nombre de poissons parents (combien de femelles ont été utilisées pour fournir le nombre d'oeufs requis par l'essai), source et méthode de collecte des oeufs fécondés et manipulations ultérieures.

Conditions d'essai :

- méthode utilisée (par exemple, semi-statique ou dynamique, temps écoulé entre la fécondation et le début de l'essai, charge, etc.) ;
- photopériode(s) ;
- conception de l'essai (par exemple, nombre d'enceintes expérimentales et d'exemplaires de même concentration, nombre d'embryons par exemplaire) ;
- méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (l'agent solubilisant et sa concentration doivent être spécifiés, le cas échéant) ;
- concentrations nominales de l'essai, valeurs mesurées dans les récipients d'essai, moyennes et écarts-types de celles-ci, et méthode de détermination ; si la substance d'essai est soluble dans l'eau à des concentrations inférieures à celles qui ont été testées, il faut démontrer que les mesures se réfèrent aux concentrations de la substance d'essai dans la phase dissoute ;
- caractéristiques de l'eau de dilution : pH, dureté, température, concentration de l'oxygène dissous, teneur en chlore résiduel (si elle a été mesurée), carbone organique total, solides en suspension, salinité du milieu d'essai (si elle a été mesurée) et toute autre mesure effectuée ;
- qualité de l'eau dans les récipients d'essai, pH, dureté, température et concentration de l'oxygène dissous.

Résultats :

- résultats de toute étude préliminaire sur la stabilité de la substance d'essai ;
- données montrant que les témoins répondent à la norme générale d'acceptabilité relative à la survie de l'espèce (annexes 3 et 4) ;
- résultats concernant la mortalité et la survie aux stades de l'embryon et de la larve et taux de mortalité et de survie globaux ;
- délais d'éclosion et nombre d'oeufs éclos ;
- longueur (et poids) ;
- description et fréquence des anomalies morphologiques, le cas échéant ;
- description et fréquence des effets sur le comportement, le cas échéant ;
- analyse statistique et traitement des données ;
- pour les essais soumis à l'analyse de la variance, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) à $p = 0,05$, et la concentration sans effet observé (CSEO) pour chaque réponse évaluée, ainsi qu'une description des méthodes statistiques utilisées et une indication de la grandeur de l'effet qui peut être détecté ;
- pour les essais analysés à l'aide de techniques de régression, la CL et la CE_x et leurs intervalles de confiance, et un graphique du modèle ajusté utilisé pour les calculer ;
- justification de tout écart à la Ligne directrice.

TABLEAU 1A : ESPECES DE POISSONS RECOMMANDEES POUR L'ESSAI

EAU DOUCE
<u>Oncorhynchus mykiss</u> Truite arc-en-ciel (9)(16)
<u>Brachydanio rerio</u> Danio (7)(17)(18)
<u>Cyprinus carpio</u> Carpe commune (8)(19)
<u>Oryzias latipes</u> Medaka (20) (21)
<u>Pimephales promelas</u> Tête-de-boule (8)(22)

TABLEAU 1B : EXEMPLES D'AUTRES ESPECES QUI ONT EGALEMENT ETE UTILISEES ET SUR LESQUELLES ON POSSEDE UNE BONNE DOCUMENTATION

EAU DOUCE	EAU SALEE
<u>Carassius auratus</u> Cyprin doré (8)	<u>Menidia peninsulae</u> Capucette nord-américaine (23)(24)(25)
<u>Lepomis macrochirus</u> Crapet arlequin (8)	<u>Clupea harengus</u> Hareng (24)(25)
	<u>Gadus morhua</u> Morue (24)(25)
	<u>Cyprinodon variegatus</u> Fondule tête de mouton (23)(24)(25)

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final Report to the Commission of the European Communities, pp.60. Juin 1990.
- (2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.
- (3) Brauhn J.L. et Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W.A. et Jones B.R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, p.128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H.W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol., 10, 121-173.
- (6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting of Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). Copeia, 4, 328-330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. et Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, 61-71.
- (8) Birge J.W., Black J.A. et Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry, 4, 807-821.
- (9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. et Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Aquatic Toxicology, 9, 129-145.
- (10) Kirchen R.V. et W.R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

- (11) Kirchen R.V. et W.R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.
- (12) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482-491.
- (14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. et Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.
- (15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. et Hermens J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, 321-334.
- (16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, décembre 1992, pp.81.
- (17) Dave G. et Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, 126-134.
- (18) Meyer A., Bierman C.H. et Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology - an invitation to comparative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252, 231-236.
- (19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. et Roubaud P. (1995). Toxic effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety, 32, 19-28 (1995).
- (20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, décembre 1991, EPA, Duluth.
- (21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, décembre 1991, EPA, Duluth.
- (22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. et Marcus M.D. (1991). Variability in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem., 10, 1189-1203.
- (23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology. Blackwells, Oxford. Vol.1, chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity Tests with Early Life stages of Estuarine and Marine Fish.
- (24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives. Junk Publ., Dordrecht. 280 pp.
- (25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development. In: W.S. Hoar and D.J. Randall, Eds., Fish Physiology, vol XIA, Academic Press, pp.1-58.

ANNEXE 1**ORIENTATIONS POUR LA REALISATION D'UN ESSAI DE TOXICITE SUR LES EMBRYONS ET LES ALEVINS DU DANIO (*Brachydanio rerio*)****INTRODUCTION**

1. Le danio est originaire de la côte de Coromandel, en Inde, où il peuple les rivières à courant rapide. C'est une espèce courante en aquarium, appartenant à la famille des carpes. Des informations sur les méthodes d'élevage et les soins à lui apporter se trouvent dans des manuels de référence sur les poissons tropicaux. Sa biologie et son utilisation dans la recherche liée à la pêche ont été passées en revue par Laale (1).
2. Ce poisson dépasse rarement 45 mm de longueur. Son corps cylindrique arbore 7 à 9 rayures horizontales bleu foncé et argentées. Ces rayures se prolongent dans les nageoires caudales et anales. Son dos est vert olive. Les mâles sont plus minces que les femelles. Les femelles sont plus argentées et leur abdomen est distendu, en particulier avant le frai.
3. Les poissons adultes sont capables de supporter de grandes fluctuations de température, de pH et de dureté. Toutefois, afin de disposer de poissons sains qui produisent des oeufs de bonne qualité, il faut leur fournir des conditions optimales.
4. Pendant la parade nuptiale, le mâle poursuit la femelle et lui donne des coups de tête ; les oeufs sont fécondés dès qu'ils sont expulsés. Les oeufs, qui sont transparents et non adhérents, tombent au fond où ils peuvent être mangés par les parents. Le frai est influencé par la lumière. Si la lumière du matin est suffisante, le poisson fraie habituellement au cours des premières heures qui suivent le lever du soleil.
5. Une femelle peut produire des pontes de plusieurs centaines d'oeufs à des intervalles d'une semaine.

ETAT DES POISSONS PARENTS, REPRODUCTION ET PREMIERS STADES DE LA VIE

6. Un nombre adéquat de poissons sains est sélectionné et gardé dans une eau appropriée (voir à l'annexe 5, par exemple) pendant au moins deux semaines avant le frai prévu. Le groupe de poissons devrait s'être reproduit au moins une fois avant d'engendrer la série d'oeufs utilisés dans l'essai. La densité des poissons durant cette période ne devrait pas excéder 1 gramme de poissons par litre. La densité pourra être plus élevée si l'eau est renouvelée régulièrement ou si on a recours à des systèmes de purification. La température des aquariums devrait être maintenue à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Les poissons devraient recevoir un régime alimentaire varié, qui pourrait se composer, par exemple, d'aliments déshydratés appropriés trouvés dans le commerce, d'*Artemia* vivants récemment éclos, de chironomidés, de *Daphnia* et de vers blancs de la famille des enchytréidés.
7. Deux méthodes ayant permis d'obtenir un lot suffisant d'oeufs fécondés sains, en vue de l'essai, sont résumées ci-dessous :
 - (i) Huit femelles et seize mâles sont placés dans un aquarium contenant 50 litres d'eau de dilution, protégé de la lumière directe. On évitera le plus possible de les perturber pendant au moins 48 heures. Un support de frai est disposé au fond de l'aquarium, pendant l'après-midi du jour qui précède le début de l'essai. Le support de frai se compose d'un cadre (en plexiglas ou dans un autre matériau adapté) de 5 à 7 cm de haut,

muni d'un filet à grosses mailles (2-5 mm) à son sommet et d'un filet à mailles fines (10-30 μm) à sa base. Plusieurs "arbres à frai", consistant en une corde de nylon non torsadée, sont attachés au filet à grosses mailles du support. Après que les poissons ont été laissés dans l'obscurité pendant 12 heures, on allume une faible lumière qui va déclencher le frai. Deux à quatre heures après le frai, le support de frai est retiré et les oeufs sont récupérés. Le support de frai empêchera les poissons de manger les oeufs et facilitera en même temps la collecte des oeufs. Le groupe de poissons devra avoir frayé au moins une fois avant le frai qui donnera les oeufs destinés à l'essai.

- (ii) Cinq à dix poissons mâles et femelles sont gardés dans des aquariums individuels pendant au moins deux semaines avant le frai prévu. Après cinq à dix jours, les abdomens des femelles seront distendus et leurs papilles génitales apparaîtront visiblement. Les poissons mâles n'ont pas de papilles. Le frai se déroule dans des cuves équipées d'un faux fond en filet (voir ci-dessus). La cuve est remplie d'eau de dilution, jusqu'à ce qu'elle ait atteint une hauteur de 5 à 10 cm au-dessus du filet. Une femelle et deux mâles sont mis dans la cuve un jour avant le frai prévu. La température de l'eau est portée progressivement à un degré au-dessus de la température d'acclimatation. On éteint la lumière et on évite autant que possible toute perturbation aux poissons. Au matin, une faible lumière est allumée, qui déclenchera le frai. Après deux à quatre heures, les poissons sont enlevés et les oeufs récoltés. Si le nombre d'oeufs nécessaire dépasse la capacité de production d'une femelle, un nombre suffisant de cuves de frai peut être disposé en parallèle. En notant la capacité de reproduction de chaque femelle avant l'essai (taille de la ponte et qualité des oeufs), on peut sélectionner les femelles qui possèdent la capacité de reproduction la plus avantageuse pour l'essai.

8. Les oeufs doivent être transférés vers les récipients d'essai dans des tubes en verre (diamètre intérieur supérieur ou égal à 4 mm) dotés d'une poire aspirante souple. La quantité d'eau accompagnant les oeufs lors de leur transfert devrait être aussi réduite que possible. Les oeufs sont plus denses que l'eau et tombent hors du tube. Il faut veiller à ce que les oeufs (et les larves) n'entrent pas en contact avec l'air. On procédera à un examen microscopique d'un ou plusieurs échantillon(s) de ponte(s), pour vérifier s'il n'y a pas d'anomalies aux premiers stades de développement. La désinfection des oeufs n'est pas autorisée.

9. Le taux de mortalité des oeufs est le plus élevé dans les 24 heures qui suivent la fécondation. On observe souvent une mortalité de 5 à 40 pour cent durant cette période. Les oeufs dégénèrent parce que la fécondation a échoué ou que le développement ne se déroule pas normalement. La qualité des oeufs d'une ponte semble dépendre de la femelle, certaines femelles produisant systématiquement des oeufs de bonne qualité, tandis que d'autres n'y arrivent jamais. La vitesse de développement et d'éclosion varie aussi d'une ponte à l'autre. Les oeufs dont la fécondation s'est bien déroulée et les alevins présentent un taux de survie élevé, normalement supérieur à 90 pour cent. A 25°C, les oeufs éclosent 3 à 5 jours après la fécondation et le sac vitellin est absorbé environ 13 jours après la fécondation.

10. Le développement embryonnaire a été bien défini par Hisaoka et Battle (2). Grâce à la transparence des oeufs et des larves écloses, il est possible de suivre le développement des poissons et d'observer la présence de malformations. Environ quatre heures après le frai, les oeufs fécondés peuvent être distingués des oeufs non fécondés (3). Les oeufs et les larves sont examinés au microscope dans des récipients d'essai de petit volume.

11. Les conditions d'essai qui s'appliquent aux premiers stades de la vie sont énumérées à l'annexe 3. Les valeurs optimales pour le pH et la dureté de l'eau de dilution sont respectivement de 7,8 et de 250 mg de CaCO_3/l .

CALCULS ET STATISTIQUES

12. Une démarche en deux étapes est proposée. Tout d'abord, on procède à l'analyse statistique des données concernant la mortalité, les anomalies du développement et le moment de l'éclosion. Ensuite on évalue statistiquement la longueur corporelle des poissons pour les concentrations auxquelles aucun effet nuisible n'a été détecté sur l'ensemble de ces trois premiers paramètres. Cette démarche est souhaitable, étant donné que le produit toxique peut sélectivement tuer les plus petits poissons, retarder l'éclosion et induire des malformations évidentes et par conséquent conduire à une altération des mesures de longueur. En outre, il y aura à peu près le même nombre de poissons à mesurer par traitement, ce qui garantira la validité de l'analyse statistique de l'essai.

DETERMINATIONS DE LA CL₅₀ ET DE LA CE₅₀

13. Le pourcentage d'oeufs et de larves survivants est calculé et corrigé en fonction de la mortalité chez les témoins à l'aide de la formule d'Abbott (4) :

$$P = 100 - \left[\frac{C - P'}{C} \times 100 \right]$$

où :

- P = pourcentage de survivants corrigé
- P' = pourcentage de survivants observé dans la concentration d'essai
- C = pourcentage de survivants chez les témoins.

La CL₅₀ devra, si possible, être déterminée par une méthode appropriée à la fin de l'essai.

Si on souhaite intégrer les anomalies morphologiques dans le traitement statistique de la CE₅₀, on trouvera des indications à ce sujet dans Stephan (5).

ESTIMATION DE LA CMEO ET DE LA CSEO

14. L'essai de toxicité aux stades de l'embryon et de l'alevin vise notamment à comparer les expériences menées à des concentrations non nulles avec les témoins, afin de déterminer la CMEO. Il y a donc lieu d'appliquer des méthodes de comparaisons multiples (6)(7)(8)(9)(10).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Laale H.W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol., 10, 121-173.
- (2) Hisaoka K.K. et Battle H.I. (1958). The Normal Developmental Stages of the Zebrafish, *Branchydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). J. Morph., 102, 311.
- (3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). Journal of Applied Ichthyology, 2, 173-181.
- (4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain, pp. 1-333.

- (5) Stephan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.
- (6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.
- (7) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482-491.
- (8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, 103-117.
- (9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics, 28, 519-531.
- (10) Sokal R.R. et Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research. W.H. Freeman and Co., San Francisco.

ANNEXE 2DEFINITIONS

Concentration minimale avec effet observé (CMEO) : concentration la plus basse d'une substance d'essai à laquelle on observe un effet significatif (à $p \leq 0,05$) par rapport au témoin. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO doivent avoir un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CMEO.

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

ANNEXE 3 :
CONDITIONS ET DUREE DE L'ESSAI ET CRITERES DE SURVIE POUR LES ESPECES RECOMMANDEES

ESPECE	TEMPERATURE (°C)	SALINITE (o/oo)	PHOTO- PERIODE (h)	DUREE DES STADES (jours)		DUREE HABITUELLE DE L'ESSAI	SURVIE DES TEMOINS (% MINIMUM)	
				Embryon	Alevin		Taux de réussite de l'éclosion	Après éclosion
EAU DOUCE :								
<i>Brachydanio rerio</i> Danio	25 ± 1	-	12 - 16	3 - 5	8 - 10	dès que possible après la fécondation (début du stade de la gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (8-10 jours)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Truite arc-en-ciel	10 ± 1 ⁽¹⁾ 12 ± 1 ⁽²⁾	-	0 ^(a)	30 - 35	25 - 30	dès que possible après la fécondation (début du stade de la gastrula) jusqu'à 20 jours après l'éclosion (50-55 jours)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Carpe commune	21 - 25	-	12 - 16	5	> 4	dès que possible après la fécondation (début du stade de la gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (8-9 jours)	80	75
<i>Oryzias latipes</i> Medaka	24 ± 1 ⁽¹⁾ 23 ± 2 ⁽²⁾	-	12 - 16	8 - 11	4 - 8	dès que possible après la fécondation (début du stade de la gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (13-16 jours)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> Tête-de-boule	25 ± 2	-	16	4 - 5	5	dès que possible après la fécondation (début du stade de la gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (8-9 jours)	60	70

(1) Pour les embryons

(2) Pour les larves

(a) Obscurité pour les embryons et les larves jusqu'à une semaine après l'éclosion, sauf pendant qu'on les examine.

Une lumière tamisée est ensuite appliquée jusqu'à la fin de l'essai.

ANNEXE 4**CONDITIONS DE L'ESSAI, DUREE ET CRITERES DE SURVIE POUR D'AUTRES ESPECES SUR LESQUELLES ON POSSEDE UNE BONNE DOCUMENTATION**

ESPECE	TEMP. (°C)	SALINITE (o/oo)	PHOTO- PERIODE (h)	DUREE DES STADES (jours)		DUREE HABITUELLE DE L'ESSAI SUR L'EMBRYON ET L'ALEVIN	SURVIE DES TEMOINS (MINIMUM %)	
				Embryon	Alevin		Taux de réussite de l'éclosion	Après éclosion
EAU DOUCE :								
<i>Carassius auratus</i> Cyprin doré	24 ± 1	-	-	3 - 4	> 4	dès que possible après la fécondation (début du stade de la gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (7 jours)	-	80
<i>Leopomis macrochirus</i> Crapet arlequin	21 ± 1	-	16	3	> 4	dès que possible après la fécondation (début du stade de la gastrula) jusqu'à 4 jours après l'éclosion (7 jours)	-	75
EAU SALEE :								
<i>Menidia peninsulae</i> Capucette nord- américaine	22 - 25	15 - 22	12	1.5	10	dès que possible après la fécondation (début du stade de la gastrula) jusqu'à 5 jours après l'éclosion (6-7 jours)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Hareng	10 ± 1	8 - 15	12	20 - 25	3 - 5	dès que possible après la fécondation (début du stade de la gastrula) jusqu'à 3 jours après l'éclosion (23-27 jours)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Morue	5 ± 1	5 - 30	12	14 - 16	3 - 5	dès que possible après la fécondation (début du stade de la gastrula) jusqu'à 3 jours après l'éclosion (18 jours)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i> Fondule tête de mouton	25 ± 2	15 - 30	12	-	-	dès que possible après la fécondation (début du stade de la gastrula) jusqu'à 4/7 jours après l'éclosion (28 jours)	>75	80

ANNEXE 5QUELQUES CARACTERISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION
ACCEPTABLE

SUBSTANCE	CONCENTRATIONS
matières particulaires	< 20 mg/l
carbone organique total	< 2 mg/l
ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
chlore résiduel	< 10 µg/l
pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	< 50 ng/l
chlore organique total	< 25 ng/l