

## LIGNES DIRECTRICES DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

### *Lemna* sp. Essais d'inhibition de la croissance

#### INTRODUCTION

1. Cette Ligne directrice est destinée à évaluer la toxicité de substances sur des plantes dulcicoles du genre *Lemna* (lentille d'eau). Conçue à partir de lignes directrices existantes (1)(2)(3)(4)(5)(6), elle comporte des modifications reflétant les dernières avancées en recherche et des consultations d'experts sur un certain nombre de points essentiels. La méthode proposée ici a été validée par un essai tournant international (7).
2. La présente Ligne directrice décrit des essais de toxicité sur *Lemna gibba* et *Lemna minor*, deux espèces abondamment étudiées et visées par les références susmentionnées. La taxonomie des espèces du genre *Lemna* est complexe, notamment à cause de l'existence des nombreux phénotypes. Bien qu'il puisse y avoir une variation génétique pour la réaction des espèces de *Lemna* aux toxiques, nous ne sommes pas encore en mesure de recommander l'usage d'un clone particulier pour cette Ligne directrice, faute de données suffisantes sur cette source de variabilité. Notons que cet essai n'est pas conduit dans des conditions axéniques, mais qu'à différentes étapes du mode opératoire il inclut des mesures permettant de limiter au maximum la contamination par d'autres organismes.
3. Les procédés avec renouvellement (semi-statique, et à écoulement continu dit « dynamique ») et sans renouvellement (statique) de la solution expérimentale sont décrits en détail. En fonction des objectifs de l'essai et des exigences réglementaires, on envisagera d'appliquer les méthodes semi-statique et dynamique, par exemple pour les substances qui disparaissent rapidement de la solution par volatilisation, photodégradation, précipitation ou biodégradation. Des orientations supplémentaires sont fournies dans la référence (8).
4. Les termes utilisés sont définis à l'Annexe 1.

#### PRINCIPE DE L'ESSAI

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

déterminée en fonction des taux de croissance spécifiques moyens relevés dans une série de solutions expérimentales et exprimée sous la forme  $C_xE_t$  (par exemple  $C_{50}E_t$ ).

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

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

### **INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI**

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

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

11. Si la maîtrise du pH du milieu expérimental est particulièrement importante, par exemple lorsqu'on teste des métaux ou des substances hydrolytiquement instables, il est recommandé d'ajouter un tampon au milieu de croissance (voir paragraphe 21). D'autres indications sur le traitement des substances qui se prêtent difficilement à cet essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont données dans la référence (8).

### **VALIDITÉ DE L'ESSAI**

12. Pour que l'essai soit valable, le temps de dédoublement du nombre de thalles chez les témoins doit être inférieur à 2,5 jours (60 heures), ce qui correspond approximativement à une multiplication par sept de ce nombre en sept jours et à un taux de croissance spécifique moyen de 0,275 par jour. Si l'on utilise le milieu et les conditions expérimentales décrits dans cette Ligne directrice, ce critère peut être atteint avec une méthode d'essai statique (5). Ce critère devrait aussi pouvoir être rempli dans des conditions semi-statiques et dynamiques. Le calcul du temps de dédoublement est exposé au paragraphe 49.

### **SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE**

13. Des substances de référence telles que le 3,5-dichlorophénol utilisé dans l'essai circulaire international (7) peuvent servir à vérifier le procédé expérimental. Il est conseillé de tester la substance de référence au moins deux fois par an ou, si l'essai est conduit moins fréquemment, parallèlement à la détermination de la toxicité de la substance d'essai.

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

### Appareillage

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

15. Les récipients expérimentaux et ceux contenant les cultures ne doivent pas être conservés ensemble. Le meilleur moyen d'y parvenir consiste à les garder dans des enceintes de croissance, des incubateurs ou des pièces séparés. Il faut pouvoir régler l'éclairage et la température et les maintenir à un niveau constant (voir paragraphes 35-36).

### Organisme expérimental

16. Cet essai se pratique sur *Lemna gibba* ou *Lemna minor*. L'Annexe 2 fournit une brève description condensée des espèces de lentilles d'eau ayant servi à des essais de toxicité. Le matériel végétal peut être obtenu auprès d'une collection de cultures, d'un autre laboratoire ou récolté sur le terrain. Dans ce dernier cas, les plantes doivent être maintenues dans le même milieu que celui qui servira à l'essai durant au moins huit semaines avant leur utilisation. Les cultures de départ ne seront prélevées que sur des sites manifestement non contaminés. Si les cultures proviennent d'un autre laboratoire ou d'une collection de cultures, elles seront également maintenues dans le même milieu que celui de l'essai durant au moins trois semaines. La source du matériel végétal ainsi que l'espèce et le clone (s'il est connu) utilisés pour l'essai doivent toujours figurer sur le rapport.

17. Il convient d'utiliser des monocultures visiblement non contaminées par d'autres organismes tels que des algues et des protozoaires. Les représentants sains de *L. minor* forment des colonies de deux à cinq thalles tandis que les colonies saines de *L. gibba* peuvent comprendre jusqu'à sept thalles.

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

### Culture

19. Afin d'alléger le travail d'entretien des cultures (par exemple lorsque aucun essai n'est prévu sur les *Lemna* durant un certain temps), les cultures peuvent être gardées sous un éclairage et une température réduits (4-10 °C). L'Annexe 3 fournit des précisions sur la culture. En cas de contamination visible par des algues ou d'autres organismes, il convient de stériliser en surface un sous-échantillon de thalles de *Lemna*

et de le transférer dans un milieu nouvellement préparé (voir Annexe 3). Dans cette éventualité, le reste de la culture contaminée est à éliminer.

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

### **Milieu expérimental**

21. Les différents milieux recommandés pour *Lemna minor* et *Lemna gibba* sont décrits ci-après. La prudence sera de rigueur en ce qui concerne l'ajout d'un tampon au milieu d'essai (MOPS (acide 4-morpholinepropanesulfonique, numéro CAS : 1132-61-2) au milieu de *L. minor* et  $\text{NaHCO}_3$  au milieu de *L. gibba*) si l'on soupçonne le tampon de réagir avec la substance d'essai et d'influencer l'expression de sa toxicité. Le milieu de Steinberg (9) est acceptable pour autant que les critères de validité soient respectés.

22. On préconise de cultiver et de tester *L. minor* sur une version modifiée du milieu de croissance pour *Lemna* établi par la norme suédoise (SIS). La composition de cette version modifiée est indiquée à l'Annexe 4.

23. Le milieu de croissance 20X - AAP, décrit à l'Annexe 4, est recommandé pour la culture et l'essai de *L. gibba*.

24. Le milieu de Steinberg, décrit à l'Annexe 4, convient à *L. minor*, mais peut aussi être employé pour *L. gibba* à condition que les critères de validité soient respectés.

### **Solutions expérimentales**

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

26. La plus haute concentration testée de la substance d'essai ne doit normalement pas dépasser l'hydrosolubilité de la substance dans les conditions de l'essai. Il est à noter toutefois que les espèces du genre *Lemna* flottent à la surface et risquent d'être exposées à des substances qui s'accumulent à l'interface eau-air (par exemple des substances peu solubles dans l'eau ou hydrophobes ou des tensio-actifs). Dans ces circonstances, l'exposition résultera de substances autres que celles qui sont en solution, de sorte que les concentrations expérimentales pourraient, suivant les caractéristiques de la substance d'essai, dépasser la solubilité dans l'eau. Pour les substances d'essai peu solubles dans l'eau, il peut être nécessaire de préparer une solution mère concentrée ou une dispersion de la substance au moyen d'un solvant organique ou d'un dispersant, afin de faciliter l'ajout de quantités précises de substance d'essai au milieu expérimental et de favoriser sa dispersion et sa dissolution. Le recours à ces auxiliaires doit être évité dans toute la mesure du possible. Les solvants ou les dispersants auxiliaires ne doivent induire de phytotoxicité. L'acétone et le diméthylformamide sont des exemples de solvants courants qui n'engendrent aucune phytotoxicité à des concentrations allant jusqu'à 100 µl/L. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant, sa concentration finale doit être limitée et ne peut pas dépasser 100 µl/L, doit être identique dans tous les récipients traités et témoins et spécifiée dans le rapport. La référence (8) donne des indications supplémentaires sur l'utilisation des dispersants.

### **Groupes traités et témoins**

27. Il est utile de cerner la toxicité de la substance d'essai à l'égard de *Lemna*, par exemple à l'aide d'un essai de détermination de l'ordre de grandeur, afin d'établir des concentrations expérimentales pertinentes. L'essai de toxicité proprement dit doit comprendre au moins cinq concentrations formant une série géométrique. Il est préférable que les concentrations expérimentales ne soient pas séparées par un facteur

supérieur à 3,2, mais on peut appliquer un facteur plus élevé si la courbe concentration-effet a une pente nulle. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Il faut conduire au moins trois expériences identiques à chaque concentration.

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

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

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

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

### **Exposition**

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

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

33. Si un essai de stabilité préliminaire montre que la concentration de la substance d'essai ne peut être maintenue (la concentration mesurée tombe en dessous de 80% de la concentration mesurée initialement) sur la durée de l'essai (7 jours), on recommande la méthode semi-statique. Dans ce cas, les colonies doivent être exposées au moins deux fois durant l'essai (par exemple les troisième et cinquième jours) à des

solutions d'essai et à des solutions témoins nouvellement préparées. La fréquence de l'exposition à un milieu renouvelé dépendra de la stabilité de la substance d'essai : une fréquence plus élevée peut s'avérer nécessaire pour maintenir des concentrations presque constantes dans le cas de substances très instables ou volatiles. Certaines circonstances appellent une méthode dynamique (8)(10).

34. La voie d'exposition par application foliaire (pulvérisation) n'est pas reprise dans cette Ligne directrice, mais la référence (11) donne des informations à ce sujet.

### **Conditions d'incubation**

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

36. La température des récipients d'essai est maintenue à  $24 \pm 2$  °C. Le pH du milieu témoin ne peut augmenter de plus de 1,5 unité au cours de l'essai. Toutefois, un écart supérieur à 1,5 unité n'invalidera pas l'essai, si le respect des critères de validité peut être démontré. Il faudra être particulièrement attentif aux variations du pH dans certains cas particuliers, notamment avec des substances instables et des métaux. La référence (8) fournit des indications supplémentaires à ce sujet.

### **Durée**

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

### **Mesures et déterminations analytiques**

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

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

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

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

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

- i) Superficie totale des thalles : La superficie totale des thalles de toutes les colonies peut être déterminée par analyse de l'image. On saisit la silhouette du récipient expérimental et des plantes avec une caméra vidéo (en plaçant le récipient sur une boîte lumineuse) et on numérise l'image obtenue. Un étalonnage réalisé avec des formes planes de superficie connue permet ensuite de déterminer la superficie totale des thalles dans un récipient d'essai. On veillera à éviter toute interférence avec le bord du récipient d'essai. Une autre méthode plus laborieuse consiste à photocopier les récipients d'essai contenant les plantes, à découper la silhouette résultante des colonies et à déterminer leur superficie à l'aide d'un analyseur de la surface foliaire ou de papier millimétré. D'autres techniques (par exemple le quotient du poids de la silhouette découpée dans le papier par le poids d'un morceau de papier de superficie connue) conviennent également.
- ii) Poids sec : Toutes les colonies sont prélevées dans chaque récipient d'essai et rincées avec de l'eau distillée ou désionisée. Elles sont déposées sur un buvard qui absorbe l'excès d'eau et séchées à 60°C jusqu'à ce qu'elles atteignent un poids constant. Tous les fragments de racines doivent être inclus. Le poids sec doit être exprimé avec une précision d'au moins 0,1 mg.
- iii) Poids frais : Toutes les colonies sont transférées dans des tubes de polystyrène (ou d'un autre matériau inerte) tarés et percés de petits trous (1 mm) dans leur fond arrondi. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3 000 tpm pendant 10 minutes à température ambiante. Les tubes contenant les colonies ainsi séchées sont repesés et le poids frais est calculé par déduction de la tare du tube.

### Fréquence des mesures et des déterminations analytiques

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

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

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

45. Dans les essais semi-statiques, où l'on s'attend à ce que la concentration de la substance d'essai ne reste pas dans un intervalle de  $\pm 20\%$  de la concentration nominale, il est nécessaire d'analyser toutes les solutions d'essai nouvellement préparées et les mêmes solutions à chaque renouvellement (voir paragraphe 33). Néanmoins, pour les essais où la concentration de la substance d'essai mesurée initialement ne se situe pas dans un intervalle de  $\pm 20\%$  de la concentration nominale, mais où

suffisamment d'indices attestent que les concentrations initiales sont répétables et stables (c'est-à-dire dans l'intervalle de 80 - 120% de la concentration initiale), les analyses chimiques peuvent n'être effectuées qu'aux concentrations expérimentales maximale et minimale. Dans tous les cas, la détermination des concentrations de la substance d'essai avant le renouvellement pourra n'être effectuée que dans un seul des récipients identiques de chaque concentration expérimentale (ou dans un récipient dans lequel on aura mélangé le contenu de tous les récipients traités de manière identique).

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

47. S'il s'avère que la concentration de la substance d'essai a pu se maintenir dans un intervalle de  $\pm 20\%$  de la concentration nominale ou mesurée initialement tout au long de l'essai, l'analyse des résultats peut s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement. Si l'écart à la concentration nominale ou mesurée initialement est supérieur à  $\pm 20\%$ , l'analyse des résultats devra reposer sur la moyenne géométrique de la concentration relevée durant l'exposition ou sur des modèles décrivant le déclin de la concentration de la substance d'essai (8).

#### **Essai limite**

48. Dans certaines circonstances, par exemple lorsqu'un essai préliminaire indique que la substance d'essai n'exerce aucun effet toxique à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/L ou à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (suivant celle qui est la plus basse), on peut conduire un essai limite afin de comparer les réactions d'un groupe témoin avec celles d'un groupe traité (à 100 mg/L ou à une concentration égale à la limite de solubilité). Il est fortement recommandé d'étayer cet essai par une analyse de la concentration d'exposition. Tous les critères de validité et conditions expérimentales décrits précédemment s'appliquent à l'essai limite, si ce n'est que le nombre de récipients traités de manière identique doit être doublé. La croissance des lentilles d'eau dans le groupe témoin et dans le groupe traité peut être analysée au moyen d'un test statistique permettant de comparer les moyennes, par exemple un test t de Student.

### **RÉSULTATS ET RAPPORT**

#### **Temps de doublement**

49. La formule suivante, appliquée avec les données provenant des récipients témoins, permet de déterminer le temps de doublement ( $T_d$ ) du nombre de thalles et de vérifier si l'étude respecte ce critère de validité (paragraphe 12) :

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

où  $\mu$  est le taux de croissance spécifique moyen calculé suivant les indications des paragraphes 54-55.

#### **Variables étudiées**

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

- (a) taux de croissance spécifique moyen : cette variable étudiée est calculée d'après les changements affectant, d'une part, les logarithmes du nombre de thalles et, d'autre part, des logarithmes d'un autre paramètre mesuré (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) en fonction du temps (exprimé en jours), chez les témoins et dans chaque groupe traité. Elle est quelquefois appelée «taux de croissance relatif» (12).
- (b) rendement : cette variable étudiée est calculée d'après les changements du nombre de thalles et d'un autre paramètre mesuré (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) chez les témoins et dans chaque groupe traité, jusqu'à la fin de l'essai.

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

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

53. On dresse un tableau réunissant le nombre de thalles et toute autre variable mesurée (c'est à dire superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) ainsi que les concentrations de la substance d'essai relevées à chaque mesure. Les analyses ultérieures, par exemple pour estimer la CME0, la CSE0 ou la  $CE_x$ , doivent s'appuyer sur les valeurs de chaque expérience identique d'un même essai et non sur les moyennes calculées pour chaque groupe traité.

### **Taux de croissance spécifique moyen**

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

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

où :

$\mu_{i-j}$  est le taux de croissance spécifique moyen du temps i au temps j

$N_i$  est la variable mesurée dans le récipient témoin ou traité au temps i

$N_j$  est la variable mesurée dans le récipient témoin ou traité au temps  $i$   
 $t$  est la période de temps comprise entre  $i$  et  $j$

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

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

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

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

où :

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

$\mu_c$  est la valeur moyenne de  $\mu$  dans le groupe témoin

$\mu_T$  est la valeur moyenne de  $\mu$  dans le groupe traité

### Rendement

57. Les effets sur le rendement sont déterminés en fonction de deux variables mesurées : le nombre de thalles et une autre variable (superficie totale des thalles, poids sec ou poids frais) mesurées dans chaque récipient d'essai au début et à la fin de l'essai. En ce qui concerne le poids frais ou sec, la biomasse de départ est déterminée à partir d'un échantillon de thalles prélevé dans le lot qui a servi à ensemercer les récipients d'essai (voir paragraphe 20). Pour chaque concentration expérimentale et le témoin, calculer un rendement moyen ainsi que les estimations de la variance. Le pourcentage moyen d'inhibition du rendement ( $\%I_r$ ) peut être calculé pour chaque groupe traité d'après la formule suivante :

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

où :

$\%I_r$  est le pourcentage de réduction du rendement

$b_c$  est la biomasse finale moins la biomasse de départ dans le groupe témoin

$b_T$  est la biomasse finale moins la biomasse de départ dans le groupe traité

### Courbes concentration-effet

58. On trace des courbes concentration-effet décrivant le pourcentage d'inhibition moyen de la variable étudiée ( $I_t$  ou  $I_r$  calculées comme indiqué aux paragraphes 56 et 57) en fonction du logarithme de la concentration de la substance d'essai.

### Estimation de la $CE_x$

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

### Méthodes statistiques

60. L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de la régression. Il est possible d'utiliser une régression linéaire pondérée après avoir effectué une transformation linéarisante des valeurs décrivant l'effet observé - par exemple dans des unités probit ou logit ou Weibull (13), mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression non linéaire, celles-ci traitant mieux les irrégularités inévitables des valeurs et les écarts par rapport aux distributions régulières. Proches de zéro ou de l'inhibition totale, ces irrégularités risquent d'être amplifiées par la transformation et d'interférer avec l'analyse (13). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull sont destinées à être utilisées avec des effets par tout ou rien (mortalité ou survie, par exemple) et doivent être modifiées pour pouvoir être utilisées avec les valeurs du taux de croissance ou du rendement. Les références (14)(15) et (16) décrivent des procédures permettant de déterminer les valeurs de la  $CE_x$  à partir de données continues.

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

62. Les estimations de la  $CE_{50}$  et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec bootstrap (rééchantillonnage) (17), si les modèles ou méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.

63. Afin d'estimer la CMEO, et par conséquent la CSEO, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par une analyse de la variance (ANOVA). La moyenne de chaque concentration doit ensuite être comparée avec la moyenne du témoin à l'aide d'un test approprié à comparaisons multiples ou de tendance. Les essais de Dunnett ou de William peuvent être utiles (18)(19)(20)(21). Il est nécessaire de vérifier si l'hypothèse de l'ANOVA de l'homogénéité de la variance tient. Cette vérification peut être pratiquée par un procédé graphique ou par un test formel (22), notamment les tests de Levene ou de Bartlett. L'infirmité de l'hypothèse de l'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance est extrême et ne peut être rectifiée par une transformation, on envisagera des méthodes d'analyse telles que les tests de tendance régressifs de Jonkheere. La référence (16) livre des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.

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

**Rapport**

65. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

Substance d'essai :

- état physique et propriétés physico-chimiques, notamment la limite de solubilité dans l'eau ;
- données d'identification chimique (par exemple numéro CAS), y compris la pureté (impuretés).

Espèce soumise à l'essai :

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

Conditions expérimentales :

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

Résultats :

- données brutes : nombre de thalles et autres variables mesurées dans chaque récipient traité et témoin à chaque observation et à chaque analyse ;
- moyennes et écarts-types de chaque variable mesurée ;
- courbes de croissance à chaque concentration (il est recommandé d'ajouter la transformation logarithmique de la variable mesurée, voir paragraphe 55) ;
- temps de doublement/taux de croissance chez le témoin d'après le nombre de thalles ;
- calcul des variables étudiées pour chaque expérience identique à chaque concentration, avec valeurs moyennes et coefficient de variation des expériences identiques ;
- représentation graphique de la relation concentration-effet ;
- estimation des effets toxiques pour les variables étudiées, par exemple  $CE_{50}$ ,  $CE_{20}$ ,  $CE_{10}$  et intervalles de confiance associés. Si elles ont été calculées, la CME0 et/ou la CSEO ainsi que les méthodes statistiques utilisées pour les déterminer ;
- si on a pratiqué une analyse de la variance, la puissance de l'effet détectable (par exemple, la différence la moins significative) ;
- toute stimulation de la croissance, le cas échéant, dans un groupe traité ;
- tout signe visuel de phytotoxicité et observations des solutions d'essai ;

- analyse des résultats, y compris l'influence d'un éventuel écart à cette Ligne directrice sur les résultats de l'essai.

### **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.
- (2) USEPA - United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.
- (3) AFNOR - Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.
- (4) Institut suédois de normalisation (SIS). (1995). Qualité de l'eau - Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, lentille d'eau, sur sept jours. SS 02 82 13. 15 pages (en suédois).
- (5) Environnement Canada. (1999). Méthode d'essai biologique : essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole, *Lemna minor*. SPE 1/RM/37 - 131 pages
- (6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service (Service Canadien de la faune), Technical Report Series No. 145.
- (7) Sims I., Whitehouse P. and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc - Environment Agency.
- (8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluation No.23. Organisation pour la coopération et le développement économiques.
- (9) International Organisation for Standardisation ISO DIS 20079. Qualité de l'eau -- Détermination de l'effet toxique des constituants de l'eau et des eaux résiduaires vis-à-vis des lentilles d'eau (*Lemna minor*) -- Essai d'inhibition de la croissance des lentilles d'eau
- (10) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory - Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.
- (11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 - 359.
- (12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.
- (13) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.

- (14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.
- (15) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.
- (16) OECD. (2005). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.
- (18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096-1121.
- (19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.
- (20) 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.
- (21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 519-531.
- (22) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

ANNEXE 1

## DÉFINITIONS

Les définitions et abréviations suivantes sont utilisées aux fins de la présente Ligne directrice :

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

Chlorose : jaunissement du tissu des thalles.

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

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

CE<sub>x</sub> : concentration de la substance d'essai dissoute dans le milieu d'essai entraînant une réduction de x% (par exemple 50%) de la croissance de *Lemna* durant une période d'exposition définie (à mentionner explicitement si elle dépasse la durée normale ou totale de l'essai). Afin de distinguer les valeurs de la CE mesurées en fonction du taux de croissance de celles mesurées en fonction du rendement, on utilise les abréviations CE<sub>c</sub>, s'agissant du taux de croissance, et CE<sub>r</sub>, s'agissant du rendement, suivies par la mention de la variable utilisée, par exemple CE<sub>c</sub> (nombre de thalles).

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

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

Gibbosité : bosse ou renflement apparaissant sur les thalles.

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

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

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

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

Monoculture : culture monospécifique.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANNEXE 2DESCRIPTION DE *LEMNA* SPP.

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

La sensibilité étant susceptible de varier entre les espèces, seules les comparaisons de sensibilités intraspécifiques sont valables.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Sources d'espèces de *Lemna***

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

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

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

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

**Bibliographie**

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

ANNEXE 3**ENTRETIEN D'UNE CULTURE MÈRE**

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

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

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

ANNEXE 4

## MILIEUX

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

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

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

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

- Pour préparer un litre de milieu SIS, ajouter les ingrédients suivants à 900 ml d'eau désionisée :
  - 10 ml de solution mère I
  - 5 ml de solution mère II
  - 5 ml de solution mère III
  - 5 ml de solution mère IV
  - 1 ml de solution mère V
  - 5 ml de solution mère VI
  - 1 ml de solution mère VII (facultatif).

*Note : la solution mère VII (tampon MOPS) peut être nécessaire pour certaines substances d'essai (voir au paragraphe 11).*

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

**Milieu de croissance 20X AAP**

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

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

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

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

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

\* Sauf mention contraire

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

**Milieu de STEINBERG (d'après la norme ISO 20079)****Concentrations et solutions mères**

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

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

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

**Tableau 2 – Solutions mères (macroéléments)**

1. Macroéléments (concentrés 50 fois)	g/L
<i>Solution mère 1:</i>	
KNO <sub>3</sub>	17.50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.63
<i>Solution mère 2:</i>	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5.00
<i>Solution mère 3:</i>	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	14.75

Tableau 3 – Solutions mères (microéléments)

2. Microéléments (concentrés 1 000 fois)	mg/L
<i>Solution mère 4:</i> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	120.0
<i>Solution mère 5:</i> ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	180.0
<i>Solution mère 6:</i> Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	44.0
<i>Solution mère 7:</i> MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	180.0
<i>Solution mère 8:</i> FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	760.00
EDTA dihydrate de sodium	1 500.00

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

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

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

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

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

