

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

ESSAI DE TOXICITÉ SUR *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* DANS UN SYSTÈME SANS SÉDIMENT

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice pour les essais a pour objet d'évaluer la toxicité de produits chimiques sur *Myriophyllum spicatum*, espèce de plante aquatique immergée dicotylédone de la famille des Myriophylles. Elle s'inspire d'une méthode d'essai existante de l'ASTM (1), modifiée pour reposer sur un système sans sédiment (2) afin d'estimer l'écotoxicité intrinsèque des produits chimiques d'essai (quelle que soit la manière dont ces produits chimiques se répartissent entre l'eau et le sédiment). Un système d'essai sans sédiment est peu complexe à analyser (il n'y a qu'une phase aqueuse), et les résultats peuvent être analysés parallèlement et/ou par rapport à ceux obtenus dans l'essai sur les espèces du genre *Lemna* (3). En outre, dans les conditions stériles requises, il est possible de minimiser les effets liés aux micro-organismes et aux algues (dégradation/absorption du composé testé, etc.). Cet essai ne supplante pas les autres essais de toxicité aquatique, mais doit les compléter de manière à permettre une évaluation plus complète des dangers et des risques pour la flore aquatique. La méthode d'essai a été validée par un essai circulaire (4).

2. Les modes opératoires avec renouvellement (essai semi-statique) et sans renouvellement (essai statique) de la solution d'essai sont décrits en détail. En fonction des objectifs de l'essai et des exigences réglementaires, la méthode semi-statique est conseillée, notamment pour les substances qui disparaissent rapidement de la solution par volatilisation, adsorption, photodégradation, hydrolyse, précipitation ou biodégradation. La référence (5) donne des indications supplémentaires. La présente Ligne directrice pour les essais s'applique aux substances, qui peuvent être testés soit isolément, cas pour lequel la méthode d'essai a été validée, comme l'indique le rapport de l'essai circulaire (4), soit dans des formulations, produits commerciaux ou mélanges connus. Si l'on teste un mélange, il convient d'en identifier et quantifier les composants dans toute la mesure du possible. La méthode d'essai sur *Myriophyllum spicatum* dans un système sans sédiment complète la Ligne directrice intitulée « Essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système eau-sédiment » (6). Avant d'utiliser la Ligne directrice sur un mélange pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on considérera si, et si oui

pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats dans cet objectif. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Des cultures de *Myriophyllum spicatum* en développement continu (uniquement dans le milieu d'Andrews modifié, voir annexe 2) sont mises en présence de différentes concentrations du produit chimique d'essai pendant 14 jours dans un système d'essai sans sédiment, sous forme de monocultures. L'essai vise à quantifier les effets du produit chimique sur le développement végétatif pendant cette période, d'après l'évaluation d'une série de variables mesurées. Ces variables sont la croissance de la longueur de la tige, celle des branches latérales et des racines et l'évolution des poids frais et sec ainsi que l'augmentation du nombre de verticilles. Par ailleurs, l'essai tient compte de modifications qualitatives particulières chez les organismes d'essai, telles qu'une malformation, une chlorose et une nécrose indiquées par un jaunissement ou une coloration blanche et brune. Pour quantifier les effets imputables au produit chimique, la croissance observée dans les solutions d'essai est comparée aux valeurs déterminées chez les témoins et la concentration induisant un pourcentage donné d'inhibition de la croissance est déterminée et exprimée en termes de CE_x , où « x » peut correspondre à n'importe quelle valeur exigée par la réglementation, par exemple CE_{10} , CE_{20} et CE_{50} . Notons que les estimations de la CE_{10} et de la CE_{20} ne sont fiables et appropriées que dans les essais où les coefficients de variation établis pour les plantes témoins sont inférieurs au niveau d'effet recherché ; pour la CE_{20} , cela signifie que ces coefficients de variation doivent rester sous la barre des 20 %.

4. On détermine le taux de croissance spécifique moyen (estimé à partir de la longueur de la tige principale et la mesure de trois autres variables) ainsi que le rendement (estimé à partir de l'accroissement de la tige principale et la mesure de trois autres variables) chez les plantes témoins et les plantes traitées. Le taux de croissance spécifique (t) et le rendement (r) sont ensuite utilisés pour déterminer la C_xE_t (par exemple $C_{10}E_t$, $C_{20}E_t$, $C_{50}E_t$) et la C_xE_r (par exemple, $C_{10}E_r$, $C_{20}E_r$, $C_{50}E_r$).

5. 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 LE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI

6. Il conviendrait de disposer d'une méthode analytique suffisamment sensible pour quantifier la substance d'essai dans le milieu expérimental. Parmi les données sur le produit chimique d'essai qui pourraient servir à établir les conditions expérimentales figurent la formule structurale, la pureté et les impuretés, l'hydrosolubilité, la stabilité dans l'eau et à la lumière, la constante d'acidité (pK_a), le coefficient de partition octanol-eau (K_{oc}), 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 produit chimique d'essai risquent de se produire durant l'essai. On saura ainsi s'il y a lieu de prendre des mesures particulières pour limiter ces pertes. Si la solubilité et la stabilité de la/les substance(s) 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.

7. Il est particulièrement important de maîtriser le pH du milieu expérimental, notamment pour tester des métaux ou des produits chimiques sensibles à l'hydrolyse. La référence (5) apporte des indications supplémentaires pour les essais rendus difficiles par les propriétés physico-chimiques de la substance testée.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

8. Pour que l'essai soit valable, il faut que la longueur de la tige principale soit multipliée par deux en moins de 14 jours dans le groupe témoin. Si l'on fait appel aux milieux et aux conditions expérimentales décrits dans la présente Ligne directrice, ce critère peut être satisfait en régime statique ou semi-statique.

9. Dans les cultures témoins, le coefficient de variation moyen du rendement du poids frais de la tige (entre le début et la fin de l'essai) et d'autres variables mesurées (voir paragraphe 37) ne doit pas dépasser 35 % entre les répliqués.

10. Plus de 50 % des répliqués du groupe témoin devront rester stériles pendant les 14 jours d'exposition ; on ne doit donc pas y observer de contamination par d'autres organismes comme des algues, des champignons ou des bactéries (la solution doit être limpide). *Note* : Le rapport de l'essai circulaire (4) fournit des indications sur la façon d'évaluer la stérilité.

SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

11. Une ou plusieurs substances de référence, comme le 3,5-dichlorophénol utilisé dans l'essai circulaire (4), peuvent servir à vérifier le procédé expérimental : sur la base des résultats de l'essai circulaire, les valeurs moyennes de CE_{50} du 3,5-DCP pour les différentes variables étudiées (voir paragraphes 37-41 de cette Ligne directrice) sont comprises entre 3,2 mg/L et 6,9 mg/L (pour les précisions concernant l'intervalle de confiance pour ces valeurs, voir le rapport de l'essai circulaire). 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 du produit chimique d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Appareillage**

12. Tout le matériel entrant en contact avec les milieux expérimentaux 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 expérimental. Les récipients d'essai doivent être suffisamment longs pour que la tige des plantes témoins puisse se développer dans la phase aqueuse sans en atteindre la surface à la fin de l'essai. Il est conseillé d'utiliser des tubes à essai en verre borosilicaté à parois épaisses et à bords droits, d'un diamètre interne d'environ 20 mm et d'une longueur proche de 250 mm, et munis de bouchons en aluminium.

13. Étant donné que le milieu d'Andrews modifié contient du sucrose (qui stimule la croissance des champignons et des bactéries), les solutions d'essai sont préparées en conditions stériles. L'ensemble des liquides et du matériel expérimental est stérilisé avant utilisation. Cette stérilisation est effectuée par traitement à l'air chaud (210 °C) pendant 4 heures, ou durant 20 minutes en autoclave à 121 °C. D'autre part, tous les récipients, fioles, boîtes et autres équipements sont passés à la flamme sur une paillasse stérile avant d'être utilisés.

14. 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. L'éclairage et la température doivent être contrôlables et maintenus à un niveau constant.

Organisme d'essai

15. *Myriophyllum spicatum* est une espèce de plante aquatique immergée dicotylédone de la famille des Myriophylles. Entre juin et août, elle produit de discrètes fleurs roses et blanches qui pointent à la surface de l'eau. Les plantes sont enracinées dans le sol grâce à un système de rhizomes robustes. Elles poussent dans tout l'hémisphère nord dans des eaux stagnantes eutrophiques mais non polluées et plutôt calcifères qui contiennent un substrat boueux. *Myriophyllum spicatum* s'épanouit mieux en eau douce, mais se trouve aussi en eau saumâtre.

16. L'essai de toxicité dans un système sans sédiment fait appel à des plantes stériles. Si le laboratoire d'essai n'a pas l'habitude de cultiver *Myriophyllum spicatum*, il peut s'approvisionner en matériel végétal stérile auprès d'un autre laboratoire ; il est aussi possible de prélever des spécimens dans la nature ou de les acheter dans le commerce, mais le matériel végétal ne sera pas stérile. Si les myriophylles sont prélevés dans la nature, il faut vérifier qu'il s'agit du taxon souhaité. Les plantes obtenues dans la nature ou le commerce doivent être stérilisées (1) et cultivées dans le même milieu que celui de l'essai pendant au moins huit semaines avant l'utilisation. Les sites naturels où sont prélevées les cultures de départ seront exempts de sources de contamination manifestes. Lors des prélèvements de *Myriophyllum spicatum* dans la nature, il faut très minutieusement veiller à collecter l'espèce voulue, en particulier dans les régions où ce taxon peut former des hybrides avec d'autres Myriophylles. Si c'est un autre laboratoire qui fournit les végétaux, ces derniers sont cultivés dans des conditions similaires pendant au moins trois semaines. On consignera systématiquement l'origine du matériel végétal et l'espèce utilisée pour l'essai.

17. La qualité et l'uniformité des plantes utilisées pour l'essai influenceront significativement sur le résultat de ce dernier, aussi les spécimens doivent-ils être choisis avec soin. On utilisera des plantes jeunes, en croissance rapide et dépourvues de lésions visibles ou de parties décolorées (chlorose). L'annexe 4 fournit des précisions sur la préparation de l'organisme d'essai.

Culture

18. Afin d'alléger le travail d'entretien des cultures (par exemple lorsqu'aucun essai n'est prévu sur *Myriophyllum* durant un certain temps), les cultures peuvent être gardées sous un éclairage et à une température réduits ($50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). L'annexe 3 fournit des précisions sur la culture.

19. À partir de 21 jours et au moins 14 jours avant l'essai, un nombre suffisant d'organismes d'essai sont transférés aseptiquement dans un milieu stérile fraîchement préparé, et mis en préculture pendant 14 à 21 jours dans les conditions de l'essai. L'annexe 4 fournit des précisions sur la préparation de la préculture.

Milieu expérimental

20. Il est recommandé d'utiliser un seul milieu nutritif pour *Myriophyllum spicatum* dans le cadre d'un système expérimental sans sédiment, tel que décrit à l'annexe 2. Il est conseillé de modifier le milieu d'Andrews pour la culture de *Myriophyllum spicatum* et pour les essais sur cette espèce, conformément aux indications de la référence (1). Le milieu d'Andrews modifié est préparé à partir de cinq solutions mères nutritives préparées séparément et auxquelles on ajoute du sucrose à hauteur de 3 %. L'annexe 2 fournit des précisions sur la préparation de la préculture.

21. Les solutions d'essai sont obtenues à partir du milieu d'Andrews modifié concentré dix fois puis dilué selon ce qui convient. La composition de ce milieu est indiquée à l'annexe 2.

Solutions d'essai

22. Les solutions d'essai sont généralement préparées par dilution d'une solution mère. Les solutions mères de la substance d'essai sont habituellement obtenues par dissolution du produit chimique dans de l'eau déminéralisée (distillée ou désionisée). Le milieu d'Andrews modifié concentré dix fois permet d'ajouter des nutriments.

23. Les solutions mères du produit chimique d'essai peuvent être stérilisées en autoclave à 121 °C durant 20 minutes ou par filtration stérile, à condition que la technique de stérilisation employée ne dénature pas le produit chimique. Il est également possible de préparer les solutions d'essai avec de l'eau déminéralisée ou un milieu stérile, dans des conditions stériles. On tiendra compte de la thermostabilité et de l'adsorption sur différentes surfaces pour choisir la méthode de stérilisation des solutions mères du produit chimique d'essai. C'est la raison pour laquelle il est conseillé de préparer les solutions mères en conditions stériles, c'est-à-dire en utilisant du matériel stérile pour dissoudre le produit chimique d'essai en conditions stériles (par exemple stérilisation à la flamme, hottes à flux laminaire, etc.) dans de l'eau stérile. Cette technique de préparation de solutions mères stériles peut être mise en œuvre tant pour les substances isolées que pour les mélanges ou les formulations.

24. Normalement, la concentration d'essai maximale de la substance d'essai ne peut dépasser son hydrosolubilité dans les conditions expérimentales. Pour les produits chimiques d'essai peu solubles dans l'eau, il est parfois nécessaire de préparer une solution mère concentrée ou une dispersion du produit chimique à l'aide d'un solvant organique ou d'un dispersant afin de faciliter l'ajout de quantités précises du produit chimique d'essai au milieu expérimental ainsi que sa dispersion et sa dissolution. Le recours à ces auxiliaires doit être évité dans toute la mesure du possible. Les solvants ou les dispersants auxiliaires ne doivent pas induire de phytotoxicité. L'acétone et le diméthylformamide sont des exemples de solvants courants qui n'engendrent aucune phytotoxicité à des concentrations allant jusqu'à 100 µL/L. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant, sa concentration finale doit être limitée et ne peut pas dépasser 100 µL/L ; elle doit être identique dans tous les récipients traités et témoins et spécifiée dans le rapport. La référence (5) donne des indications supplémentaires sur l'utilisation des dispersants.

Groupes traités et groupes témoins

25. Un essai de détermination de l'ordre de grandeur donnera une première idée de la toxicité du produit chimique d'essai sur *Myriophyllum spicatum* et permettra de sélectionner les concentrations expérimentales adéquates. L'essai de toxicité final doit normalement porter sur cinq (comme dans la LD 221 sur l'essai d'inhibition de la croissance des *Lemmas*) à sept concentrations d'essai formant une série géométrique. Ces concentrations sont choisies de manière que les valeurs de la CSEO et de la CE₅₀ soient situées à l'intérieur de la plage des concentrations d'essai (voir ci-dessous). 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 faible. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. On inclut au minimum cinq réplicats par concentration d'essai.

26. Le choix de la plage des concentrations expérimentales (pour la détermination de l'ordre de grandeur et/ou l'essai de toxicité final) doit tenir compte des aspects suivants :

- Pour déterminer la CE_x, les concentrations expérimentales doivent encadrer la valeur de la CE_x afin que le niveau de confiance soit suffisant. Par exemple, s'il s'agit d'estimer la CE₅₀, la concentration expérimentale la plus élevée doit dépasser la valeur de la CE₅₀. Si la CE₅₀ se situe en dehors de la plage 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 myriophylles traités ne soit pas ralentie de manière significative par rapport à celle des témoins. De plus, la concentration expérimentale la plus forte doit être suffisamment élevée pour que la croissance du groupe exposé soit significativement inférieure à celle des témoins. Si ce n'est pas le cas, l'essai devra être répété pour une plage 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).

27. Chaque essai doit inclure des témoins sans produit chimique d'essai mais identiques aux récipients traités pour ce qui est du milieu nutritif, de l'organisme d'essai (le matériel végétal choisi sera aussi homogène que possible et constitué de branches latérales fraîches obtenues dans les précultures, ramenées à 2.5 cm à partir de la base), des conditions environnementales et des procédures. 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 le produit chimique d'essai. Le nombre de répliquats de récipients témoins (et de récipients contenant le solvant, le cas échéant) doit être au moins égal à dix.

28. Si la détermination de la CSEO n'est pas requise, le plan d'essai peut être modifié en augmentant le nombre de concentrations et en réduisant le nombre de répliquats par concentration. Cependant, le nombre de répliquats des témoins doit toujours s'élever à dix minimum.

Exposition

29. Les branches latérales fraîches obtenues en préculture et raccourcies à 2.5 cm en partant de la base sont réparties de façon aléatoire entre les récipients d'essai en conditions aseptiques ; chaque récipient expérimental doit contenir une branche latérale de 2.5 cm dont une extrémité présente un méristème apical. Le matériel végétal choisi doit être de qualité identique dans tous les récipients expérimentaux.

30. 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 est également régie par un plan en blocs ou une procédure aléatoire (ou un repositionnement plus fréquent des récipients).

31. 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 (14 jours), on recommande la méthode semi-statique. Dans ce cas, les plantes doivent être exposées à des solutions témoins et des solutions d'essai fraîchement préparées au moins une fois au cours de l'essai (par exemple le jour 7). La fréquence de l'exposition à un milieu renouvelé dépendra de la stabilité du produit chimique 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.

32. La présente Ligne directrice n'aborde pas le scénario d'exposition fondé sur une application foliaire (pulvérisation).

Conditions de l'essai

33. On applique un éclairage fluorescent blanc chaud et/ou froid pour obtenir une intensité lumineuse comprise entre 100 et 150 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en termes de rayonnement photosynthétiquement actif (400-700 nm) mesuré à des points équidistants de la source de lumière, par exemple le fond des récipients d'essai (soit

l'équivalent de 6 000 à 9 000 lux environ), avec un cycle alternant 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. La méthode de détection et de mesure de la lumière, notamment le type de capteur, jouera sur 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.

34. La température des récipients d'essai est maintenue à 23 ± 2 °C. Il faudra être particulièrement attentif aux variations du pH dans certains cas particuliers, notamment pour tester des substances instables ou des métaux ; le pH devra rester dans une fourchette de 6 à 9. On trouvera des indications supplémentaires dans le document (5).

Durée

35. L'essai prend fin 14 jours après le transfert des plantes dans les récipients expérimentaux.

Mesures et déterminations analytiques

36. Au début de l'essai, la longueur de la tige principale de l'organisme d'essai est de 2.5 cm (voir paragraphe 29) ; on la mesure à l'aide d'une règle (voir annexe 4) ou par photographie et analyse d'image. La longueur de la tige principale de l'organisme d'essai, qu'il semble normal ou non, doit être déterminée au début de l'essai, au moins une fois pendant la période d'exposition de 14 jours, puis à la fin de l'essai. Note : Pour les laboratoires qui ne peuvent pas faire d'analyse d'image, il est également possible d'utiliser une règle stérile pour mesurer la longueur de la tige principale en début d'essai et pendant l'exposition, à condition que la paillasse ait été stérilisée avant de placer les végétaux dans les récipients expérimentaux. Il convient de noter les changements observés dans le développement des plantes, notamment en ce qui concerne la déformation des tiges, l'apparence, les signes de nécrose, de chlorose, de rupture ou de perte de flottabilité, ainsi que l'aspect et la longueur des racines. On consignera également les caractéristiques notables du milieu expérimental, par exemple la présence d'éléments non dissous ou le développement d'algues, de champignons ou de bactéries dans le récipient d'essai.

37. Outre la détermination de la longueur de la tige principale au cours de l'essai, il convient d'évaluer les effets du produit chimique d'essai sur au moins trois des variables mesurées suivantes :

- i. Longueur totale des branches latérales
- ii. Longueur totale des tiges
- iii. Longueur totale des racines
- iv. Poids frais
- v. Poids sec
- vi. Nombre de verticilles

Note 1 : Les observations réalisées pendant l'essai de détermination de l'ordre de grandeur peuvent aider à choisir des variables supplémentaires pertinentes parmi les six énumérées ci-dessus.

Note 2 : Il est hautement recommandé de déterminer les poids frais et sec (paramètres iv et v).

Note 3 : Étant donné que le sucrose et la lumière (exposition des racines à la lumière durant l'essai) sont susceptibles d'influencer les vecteurs de l'auxine (hormone de croissance végétale), et que certains produits chimiques ont des modes d'action similaires à ceux de l'auxine, l'intérêt de mesurer les effets sur les racines (paramètre iii) est discutable.

Note 4 : Les résultats de l'essai circulaire montrent que pour la longueur totale des branches latérales (paramètre i), les coefficients de variation sont élevés (> 60 %). Quoi qu'il en soit, la longueur totale des branches latérales est comprise dans la longueur totale des tiges (paramètre ii), variable pour laquelle les coefficients de variation sont plus acceptables car ils restent inférieurs à 30 %.

Note 5 : Il découle des considérations qui précèdent que les principales variables conseillées sont la longueur totale des tiges, le poids frais et le poids sec (paramètres ii, iv et v) ; le suivi du nombre de verticilles (paramètre vi) est laissé à la discrétion de l'opérateur.

38. La longueur de la tige principale et le nombre de verticilles présentent l'avantage de pouvoir être déterminés pour chaque récipient traité ou témoin au début, au cours et à la fin de l'essai par photographie et analyse d'image, bien qu'une règle (stérile) puisse aussi convenir.

39. La longueur totale des branches latérales, la longueur totale des racines (qui correspondent respectivement à la somme des longueurs de toutes les branches latérales et de toutes les racines) et la longueur totale des tiges (qui correspond à la somme de la longueur de la tige principale et de la longueur totale des branches latérales) peuvent être mesurées avec une règle à l'issue de l'exposition.

40. On détermine les poids frais et/ou sec au début de l'essai à l'aide d'un échantillon des précultures représentatif des végétaux utilisés pour lancer l'essai ; à la fin de l'essai, ces poids sont déterminés à partir du matériel végétal contenu dans chaque récipient traité ou témoin.

41. La longueur totale des branches latérales, la longueur totale des tiges, la longueur totale des racines, le poids frais, le poids sec et le nombre de verticilles peuvent être déterminés de la manière suivante :

- i. Longueur totale des branches latérales : La longueur des branches latérales peut être déterminée en mesurant toutes les branches latérales avec une règle à la fin de l'exposition. La longueur totale des branches latérales correspond à la somme des longueurs de toutes les branches latérales de chaque récipient traité ou témoin.
- ii. Longueur totale des tiges : La longueur de la tige principale peut être déterminée par analyse d'image ou à l'aide d'une règle. La longueur totale des tiges correspond à la somme de la longueur totale des branches latérales et de la longueur de la tige principale de chaque récipient traité ou témoin à la fin de l'exposition.
- iii. Longueur totale des racines : La longueur des racines peut être déterminée en mesurant toutes les racines avec une règle à la fin de l'exposition. La longueur totale des racines correspond à la somme des longueurs de toutes les racines de chaque récipient traité ou témoin.
- iv. Poids frais : Le poids frais peut être déterminé en pesant les organismes d'essai à la fin de l'exposition. La totalité du matériel végétal contenu dans chaque récipient traité ou témoin est rincé à l'eau distillée puis séché en le tamponnant avec du papier cellulose. Après cette étape de préparation, on obtient le poids frais par pesée. La biomasse de départ (poids frais) est

déterminée à partir d'un échantillon d'organisme d'essai issu du même lot que les plantes placées dans les récipients expérimentaux.

- v. Poids sec : Après les préparations destinées à la détermination du poids frais, les organismes d'essai sont séchés à 60 °C jusqu'à poids constant. Cette masse correspond au poids sec. La biomasse de départ (poids sec) est déterminée à partir d'un échantillon d'organisme d'essai issu du même lot que les plantes placées dans les récipients expérimentaux.
- vi. Nombre de verticilles : On compte tous les verticilles sur la tige principale.

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 « usées » correspondantes.

43. Il convient de mesurer l'intensité lumineuse dans l'enceinte de croissance, dans l'incubateur ou dans la pièce à des points équidistants de la source de lumière et des organismes d'essai. Ces mesures sont effectuées au moins une fois pendant 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 (ou mesurée en continu par un enregistreur de données).

44. Au cours de l'essai, les concentrations de la/des substance(s) d'essai sont déterminées à des 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 les concentrations de la/des substance(s) d'essai ne restent 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. Néanmoins, pour les essais où la concentration de la/des substance(s) 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 du produit chimique d'essai avant le renouvellement pourra n'être effectuée que dans un réplicat de chaque concentration expérimentale (ou dans un récipient dans lequel on aura mélangé le contenu de tous les réplicats).

46. S'il s'avère que la concentration d'essai a pu être maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de $\pm 20\%$ de la concentration nominale ou mesurée initialement, l'analyse des résultats peut s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement. Si l'écart à la concentration nominale ou mesurée initialement est supérieur à $\pm 20\%$, l'analyse des résultats devra reposer sur la moyenne géométrique de la concentration relevée durant l'exposition ou sur des modèles décrivant le déclin de la concentration du produit chimique d'essai (5).

Essai limite

47. Dans certaines circonstances, par exemple lorsqu'un essai préliminaire indique que le produit chimique d'essai n'exerce aucun effet toxique à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/L ou, dans le cas d'une substance à sa limite de solubilité dans le milieu expérimental, ou dans le cas d'une formulation à sa

limite de dispersion, on peut conduire un essai limite afin de comparer les réponses 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 réplicats de traitement doit être doublé. La croissance des plantes dans le groupe témoin et 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

Variables étudiées

48. L'objectif de cet essai est d'établir les effets d'un produit chimique d'essai sur le développement végétatif de *Myriophyllum spicatum*. La présente Ligne directrice décrit deux variables étudiées.

- a) Taux de croissance spécifique moyen: cette variable est calculée en fonction de l'évolution logarithmique de la longueur de la tige principale, ainsi que de l'évolution logarithmique d'autres paramètres de mesure, à savoir la longueur totale des tiges, le poids frais, le poids sec ou le nombre de verticilles au cours du temps (variables exprimées par jour), dans les témoins et dans chaque groupe traité. *Note* : Pour deux variables mesurées, la longueur totale des branches latérales et la longueur totale des racines, il n'est pas possible de calculer le taux de croissance spécifique moyen. Au début de l'essai, la plante n'a ni branches latérales, ni racines (conformément à la méthode de préparation à partir des précultures), or le taux de croissance spécifique moyen ne peut être calculé avec une valeur initiale nulle.
- b) Rendement: cette variable est calculée en fonction de l'évolution de la longueur de la tige principale, ainsi que d'autres paramètres de mesure – à savoir, de préférence, la longueur totale des tiges, le poids frais, le poids sec ou le nombre de verticilles, ainsi que d'autres paramètres, si cela paraît utile – dans les témoins et dans chaque groupe traité jusqu'à la fin de l'essai.

49. Les estimations de la toxicité doivent reposer sur la longueur de la tige principale et sur trois variables mesurées supplémentaires (de préférence longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles, voir paragraphe 37 et les notes 2, 4 et 5 qui y figurent), car certains produits chimiques sont susceptibles d'avoir une influence bien plus forte sur les autres variables mesurées que sur la longueur de la tige principale. Cet effet n'est pas visible si l'on ne calcule que la longueur de la tige principale.

Taux de croissance spécifique moyen

50. Le taux de croissance spécifique moyen durant une période donnée correspond à l'accroissement logarithmique des variables de croissance, à savoir la longueur de la tige principale et trois autres variables mesurées (longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles), grâce à la formule ci-dessous, appliquée à chaque réplicat des groupes témoins et traités :

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

où :

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

- N_i : variable mesurée dans le récipient témoin ou traité au temps i
- N_j : variable mesurée dans le récipient témoin ou traité au temps j
- t : période de temps comprise entre i et j

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

51. 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 d'essai et chaque témoin, 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 du produit chimique d'essai durant la période d'exposition (par exemple en analysant les courbes de croissance log-transformées).

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

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

où :

- $\% I_t$: pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique moyen
- μ_c : valeur moyenne de μ dans le groupe témoin (*control*)
- μ_t : valeur moyenne de μ dans le groupe traité

Rendement

53. Les effets sur le rendement sont déterminés en fonction de la variable mesurée correspondant à la longueur de la tige principale, à laquelle s'ajoutent trois autres variables (de préférence longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles) pour les plantes de chaque récipient expérimental au début et à la fin de l'essai. Pour le poids sec comme pour le poids frais, la biomasse de départ est déterminée à partir d'un échantillon d'organisme d'essai issu du même lot que les plantes placées dans les récipients expérimentaux. Pour chaque concentration d'essai et chaque témoin, calculer un rendement moyen ainsi que les estimations de la variance. Le pourcentage moyen d'inhibition du rendement ($\% I_r$) peut être calculé pour chaque groupe traité d'après la formule suivante :

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

où :

- $\% I_r$: pourcentage de réduction du rendement
- b_c : biomasse finale moins biomasse de départ dans le groupe témoin (*control*)
- b_t : biomasse finale moins biomasse de départ dans le groupe traité

Temps de doublement

54. Pour déterminer le temps de doublement (T_d) de la longueur de la tige principale et ainsi vérifier que ce critère de validité est respecté (voir paragraphe 8), on applique la formule suivante avec les données obtenues dans les récipients témoins :

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

où μ est le taux de croissance spécifique moyen calculé suivant les indications des paragraphes 50-52.

Courbes concentration-effet

55. On trace des courbes concentration-effet décrivant le pourcentage d'inhibition moyen de la variable étudiée (I_t ou I_r , calculé comme indiqué aux paragraphes 53-54) en fonction du logarithme de la concentration du produit chimique d'essai.

Estimation de la CE_x

56. Les estimations de la CE_x doivent reposer à la fois sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) et sur le rendement (C_xE_r), chacune de ces variables étudiées découlant de la longueur de la tige principale, et, éventuellement, d'autres variables mesurées (idéalement longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles). En effet, certains produits chimiques peuvent avoir des effets différents sur la longueur de la tige principale et sur d'autres variables mesurées. Les paramètres de toxicité souhaités sont donc quatre valeurs CE_x pour chaque niveau d'inhibition x calculé : C_xE_t (longueur de la tige principale) ; C_xE_t (idéalement longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles) ; C_xE_r (longueur de la tige principale) ; et C_xE_r (idéalement longueur totale des tiges, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles).

57. Il convient de noter que les valeurs de la CE_x calculées à l'aide de ces deux variables étudiées ne sont pas comparables, et que cette différence est prise en compte lors de l'exploitation des 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.

Méthodes statistiques

58. L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de 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 (7), mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression non linéaire, celles-ci traitant mieux les inévitables irrégularités de 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 (7). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull sont prévues pour analyser des réponses de type 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 (8) (9) (10) décrivent des procédures permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues.

59. 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 régression doit s'appuyer sur les effets relevés dans chaque réplicat et non sur les moyennes par groupe traité.

60. Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec bootstrap (rééchantillonnage) (10), si les modèles ou les méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.

61. Afin d'estimer la CME0, et par conséquent la CSEO, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par une analyse de variance (ANOVA). La moyenne pour chaque concentration est alors comparée à la moyenne des témoins en faisant appel à une méthode appropriée de comparaison multiple ou à des tests de tendance. Les tests de Dunnett ou de William peuvent être utiles (12) (13) (14) (15) (16). Il est nécessaire de vérifier si l'hypothèse d'homogénéité de la variance de l'ANOVA tient. On peut effectuer cette vérification graphiquement ou à l'aide d'un test formel (15). Les tests de Levene ou de Bartlett conviennent à cet effet. L'infirmité de l'hypothèse d'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 (10) livre des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.

62. 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 . Pour cet essai sur Myriophylles, aucune valeur de x appropriée n'a été établie. Toutefois, un intervalle allant de 10 à 20 % semble convenir (selon la variable étudiée choisie), et il est préférable de mentionner à la fois la CE_{10} et la CE_{20} , ainsi que les limites de confiance associées.

Rapport

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

Produit chimique d'essai

Substance mono-constituant :

- apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques ;
- identification chimique : nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).

Substance multi-constituants, UVCBs et mélanges :

- caractérisée, autant que possible par p.ex. l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence quantitative et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

Espèce soumise à l'essai

- Nom scientifique et source.

Conditions de l'essai

- Mode opératoire suivi (statique ou semi-statique).
- 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, longueur de la tige principale par récipient expérimental au début de l'essai).
- Concentrations d'essai (nominales et mesurées selon les besoins) et nombre de réplicats par concentration.
- Méthodes de préparation des solutions mères et des solutions d'essai, y compris utilisation éventuelle d'un solvant ou d'un dispersant.
- Température durant l'essai.
- Source, intensité et homogénéité lumineuses.
- Valeurs du pH des milieux traités et des milieux témoins.
- Méthode d'analyse du produit chimique d'essai, avec données appropriées sur l'évaluation de la qualité (études de validation, écarts-types ou limites de confiance des analyses).
- Méthodes de détermination de la longueur de la tige principale et des autres variables mesurées, par exemple longueur totale des branches latérales, longueur totale des tiges, longueur totale des racines, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles.
- État de la culture (stérile ou non stérile) de chaque récipient traité ou témoin à chaque observation.
- Toute déviation par rapport à la présente Ligne directrice.

Résultats

- Données brutes : longueur de la tige principale et autres variables mesurées pour chaque récipient traité et témoin à chaque observation et à chaque analyse.
- Moyennes et écarts-types pour chaque variable mesurée.
- Courbes de croissance pour chaque variable mesurée.
- Calcul des variables étudiées pour chaque réplicat traité, avec valeurs moyennes et coefficient de variation des réplicats.
- Représentation graphique de la relation concentration-effet.

- Estimation des effets toxiques pour les variables étudiées, par exemple CE_{50} , CE_{10} , CE_{20} 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 l'on a effectué une analyse de variance, amplitude de l'effet détectable (par exemple, différence la moins significative).
- Toute stimulation de la croissance constatée, le cas échéant, dans un groupe traité.
- Tout signe visuel de phytotoxicité et observations des solutions d'essai.
- Discussion des résultats, notamment concernant une influence éventuelle sur les résultats de l'essai de modifications apportées à cette Ligne directrice.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.
- (2) Maletzki, D. et al. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch*, No. 22, pp. 702–710.
- (3) OCDE (2006), *Essai n° 221: Lemna sp. Essai d'inhibition de la croissance*. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, Éditions OCDE, Paris.
<http://dx.doi.org/10.1787/9789264016309-fr>.
- (4) OECD (2014), “*Myriophyllum spicatum* toxicity test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.
- (5) OECD (2000), “Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.
- (6) OCDE (2014), *Essai n° 239 : Essai de toxicité sur Myriophyllum spicatum dans un système eau-sédiment*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, Édition OCDE, Paris.
- (7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.
- (8) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, pp. 157-167.
- (9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.
- (10) OECD (2006), “Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.
- (11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.
- (12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
- (13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.

- (14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.
- (15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.
- (16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

ANNEXE 1

DÉFINITIONS

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

Biomasse : poids frais et/ou sec de la matière vivante présente dans une population. Dans cet essai, la biomasse comprend la tige principale, toutes les branches latérales et toutes les racines.

Chlorose : décoloration de l'organisme d'essai, en particulier des verticilles, passant du vert au jaune.

CE_x : concentration du produit chimique d'essai dissous dans le milieu expérimental qui entraîne une réduction de x % (par exemple 50 %) de la croissance de *Myriophyllum spicatum* pendant une période d'exposition définie (à mentionner explicitement si elle s'écarte de la durée normale ou totale de l'essai). Afin de distinguer les valeurs de la CE mesurées en fonction du taux de croissance de celles mesurées en fonction du rendement, on utilise les abréviations CE_t s'agissant du taux de croissance, et CE_r s'agissant du rendement, suivies par la mention de la variable mesurée utilisée, par exemple CE_r (longueur de la tige principale).

Croissance : augmentation de la variable mesurée, par exemple longueur de la tige principale, longueur totale des branches latérales, longueur totale des tiges, longueur totale des racines, poids frais, poids sec ou nombre de verticilles, pendant la période d'essai.

Taux de croissance (taux de croissance spécifique moyen) : accroissement logarithmique de la variable mesurée pendant la période d'exposition. *Note* : Les variables étudiées relatives au taux de croissance ne dépendent pas de la durée de l'essai tant que la croissance des organismes témoins non traités obéit à une loi exponentielle.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO) : concentration d'essai la plus faible à laquelle on observe que le produit chimique exerce un effet statistiquement significatif de réduction de la croissance (à $p < 0.05$) par comparaison avec le témoin, durant une période d'exposition donnée. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO devraient avoir un effet néfaste supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Si ces deux conditions ne sont pas réunies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la CMEO (et donc de la CSEO).

Variable mesurée : tout type de variable mesurée pour exprimer l'effet étudié au cours de l'essai par une ou plusieurs variables étudiées. Dans la présente Ligne directrice, les variables mesurées sont la longueur de la tige principale, la longueur totale des branches latérales, la longueur totale des tiges, la longueur totale des racines, le poids frais, le poids sec et le nombre de verticilles.

Monoculture : culture monospécifique.

Nécrose : tissu mort (d'aspect blanc ou brun foncé) de l'organisme d'essai.

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

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

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

Essai statique : essai pendant lequel la solution d'essai n'est pas renouvelée.

Effet étudié : décrit le facteur général qui sera modifié par rapport au témoin par le produit chimique d'essai. Dans la présente 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 au produit chimique d'essai. Normalement, le produit chimique d'essai est dissous 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. *Note* : Lorsque la croissance des organismes non exposés obéit à une loi exponentielle, les variables étudiées fondées sur le rendement diminuent quand la durée du test augmente.

ANNEXE 2

MILIEU D'ANDREWS MODIFIÉ POUR LES PRÉCULTURES ET LES CULTURES MÈRES

Le milieu d'Andrews modifié nécessaire aux précultures et aux cultures mères est préparé à partir de cinq solutions mères nutritives élaborées séparément, auxquelles on ajoute 3 % de sucre.

Tableau 1 : Composition de la solution nutritive d'Andrews (Norme ASTM E 1913-04)

Production des solutions mères nutritives			Production de la solution nutritive
Solution mère	Produit chimique	Poids initial pour 1 000 mL	mL pour 5 L de solution nutritive
1	KCl	74.6 mg	50
	KNO ₃	8.08 g	
	Ca(NO ₃) ₂ * 4 H ₂ O	18.88 g	
2	MgSO ₄ *7 H ₂ O	9.86 g	50
3	Voir solution mère n° 3.1 ci-dessous		50
4	KH ₂ PO ₄	2.72 g	50
5	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0.278 g	50
	Na ₂ EDTA* 2 H ₂ O	0.372 g	

Les solutions mères peuvent être conservées au réfrigérateur pendant six mois (entre 5 et 10 °C). Seule la solution mère n° 5 a une durée de conservation inférieure (deux mois).

Tableau 2 : Production de la **solution mère n° 3.1** servant à préparer la solution mère n° 3

Produit chimique	Poids initial en g/100 mL
MnSO ₄ * 4 H ₂ O	0.223
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0.115
H ₃ BO ₃	0.155
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0.0125
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O	0.0037

Après obtention de la solution mère n° 3.1 (Tableau 2), la répartir en aliquotes d'environ 11 mL qui seront congelées à une température inférieure ou égale à -18°C . Ces portions congelées se conservent cinq ans.

Pour préparer la solution mère n° 3, décongeler une solution mère n° 3.1, en verser 10 mL dans une fiole volumétrique de 1 L et ajouter de l'eau ultra pure jusqu'à la jauge.

Pour obtenir le milieu d'Andrews modifié, verser environ 2 500 mL d'eau ultra pure dans une fiole volumétrique de 5 L. Y ajouter 50 mL de chaque solution mère, remplir 90 % de la fiole volumétrique avec de l'eau ultra pure et amener le pH à 5.8.

Ajouter ensuite 150 g de sucrose dissous (équivalant à 3 % dans 5 L), puis compléter jusqu'à la jauge avec de l'eau ultra pure. Enfin, verser la solution nutritive dans des fioles Schott de 1 L placées en autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

La solution nutritive ainsi obtenue peut être conservée stérile au réfrigérateur (entre 5 et 10°C) pendant trois mois.

MILIEU D'ANDREWS MODIFIÉ POUR L'ESSAI DE TOXICITÉ DANS UN SYSTÈME SANS SÉDIMENT

Le milieu d'Andrews modifié concentré dix fois qui entre dans la composition des solutions d'essai est préparé à partir des cinq solutions mères nutritives déjà mentionnées dans les tableaux 1 et 2, après ajout de sucrose à hauteur de 30 %. Pour ce faire, verser environ 100 mL d'eau ultra pure dans une fiole volumétrique de 1 L. Ajouter 100 mL de chacune des solutions mères puis amener le pH à 5.8. Ensuite, dissoudre du sucrose pour une concentration de 30 % (soit 300 g dans 1 000 mL), puis compléter avec de l'eau ultra pure jusqu'à la jauge.

Enfin, verser la solution nutritive dans des fioles Schott de 0.5 L placées en autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

La solution nutritive concentrée dix fois ainsi obtenue peut être conservée stérile au réfrigérateur (entre 5 et 10°C) pendant trois mois.

ANNEXE 3

ENTRETIEN D'UNE CULTURE MÈRE

La présente annexe 3 décrit la culture mère de *Myriophyllum spicatum* L¹, espèce de plante aquatique immergée dicotylédone de la famille des myriophylles. Entre juin et août, elle produit de discrètes fleurs roses et blanches qui pointent à la surface de l'eau. Les plantes sont enracinées dans le sol grâce à un système de rhizomes robustes. Elles poussent dans tout l'hémisphère nord dans des eaux stagnantes eutrophiques mais non polluées et plutôt calcifères qui contiennent un substrat boueux. *Myriophyllum spicatum* s'épanouit mieux en eau douce, mais se trouve aussi en eau saumâtre.

La culture mère dans un système sans sédiment en conditions de laboratoire fait appel à des plantes stériles. On peut obtenir des plantes stériles auprès du laboratoire d'écotoxicologie de l'Umweltbundesamt allemand (Agence fédérale allemande pour l'environnement).

Il est aussi possible d'obtenir des organismes d'essai à partir de végétaux non stériles, conformément à la norme ASTM E 1913-04. La méthode de culture de spécimens de *Myriophyllum sibiricum* prélevés dans la nature indiquée ci-dessous est tirée de l'ASTM Standard Guide :

Si l'on opte pour des plantes non stériles prélevées dans la nature, récolter des turions de *M. sibiricum* à l'automne. Placer ces turions dans un aquarium de 20 L contenant 5 cm de sédiment stérile recouvert de sable siliceux ou de Turface® et de 18 L d'eau de qualité réactif. Aérer l'aquarium, maintenir sa température à 15 °C ainsi que l'intensité lumineuse entre 200 et 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pendant 16 heures par jour. La culture des plantes en aquarium peut fournir des végétaux de remplacement si les cultures stériles sont détruites par un dysfonctionnement mécanique dans l'enceinte de croissance, par une contamination ou d'autres causes encore. Les spécimens cultivés dans l'aquarium ne sont pas stériles, et les cultures stériles ne peuvent être conservées dans un système de culture en discontinu. Pour stériliser la culture, les plantes sont retirées de l'aquarium et rincées pendant une demi-heure environ dans un courant d'eau désionisée. Elles sont ensuite désinfectées en conditions aseptiques dans une hotte à flux laminaire pendant moins de 20 min (jusqu'à ce que la majorité des tissus végétaux aient blanchi et que seul l'apex en croissance reste vert) dans une solution d'hypochlorite de sodium à 3 % (m/v) contenant 0.01 % d'un tensioactif adapté. Agiter le désinfectant et le matériel végétal. Les segments comptant plusieurs nœuds sont transférés dans des tubes de culture stériles contenant 45 mL de milieu d'Andrews modifié stérilisé, ensuite clos avec leurs bouchons ordinaires. On ne place qu'un segment végétal par enceinte expérimentale. Pour s'assurer que les récipients de culture sont bien fermés, on les scelle avec du film de laboratoire. Une fois qu'une culture stérile a été préparée, il convient de transférer les segments végétaux comptant plusieurs nœuds dans de nouvelles enceintes expérimentales contenant du milieu nutritif liquide nouvellement préparé tous les dix à douze jours. Des cultures sur boîtes de gélose ont montré que les plantes doivent être stériles et le demeurer pendant huit semaines avant le lancement de l'essai.

Comme le milieu d'Andrews modifié contient du sucrose (qui stimule la croissance des champignons et des bactéries), l'ensemble du matériel, des solutions et des cultures seront manipulés en conditions stériles. Il convient de stériliser tous les liquides et le matériel expérimental avant de les utiliser. Cette stérilisation est effectuée par traitement à l'air chaud (210 °C) pendant 4 heures, ou en autoclave durant 20 minutes à 121 °C. D'autre part, tous les ballons, fioles, boîtes et autres équipements sont passés à la flamme sur une paillasse stérile avant d'être utilisés.

¹ Carl von Linné (né le 23 mai 1707 à Råshult/Ålmhult, mort le 10 janvier 1778 à Uppsala).

Les cultures mères peuvent être conservées plus longtemps sous un éclairage et à une température réduits ($50 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) sans qu'il faille les préparer à nouveau. Le milieu de croissance des myriophylles doit être à le même que celui utilisé pour l'essai, mais d'autres milieux riches en éléments nutritifs peuvent être utilisés pour les cultures mères.

Les segments végétaux axéniques sont répartis dans plusieurs erlenmeyers de 500 mL et/ou dans des fioles Fernbach de 2 000 mL, chaque récipient contenant environ 450 mL (erlenmeyers) ou 1 000 mL (fioles Fernbach) de milieu d'Andrews modifié. Les récipients sont alors scellés axéniquement avec des bouchons en cellulose.

D'autre part, il est impératif de minutieusement passer à la flamme l'équipement de la paillasse stérile juste avant de l'utiliser. En fonction de leur nombre et de leur taille, les plantes sont transférées dans une nouvelle solution nutritive toutes les trois semaines environ.

Pour cette culture renouvelée, on peut utiliser les apex ou des segments de la partie médiane de la tige. Le nombre et la taille des plantes (ou segments de plante) transférées dépendent du nombre de plantes nécessaire. Par exemple, il est possible de transférer cinq segments de tige dans une fiole Fernbach et trois segments de tige dans un erlenmeyer, chaque segment ayant une longueur de 5 cm. Éliminer tout segment présentant des racines, des fleurs, des parties mortes ou qui se distinguent d'une manière ou d'une autre.



Graphique 1 : Sectionnement des plantes pour la culture mère et la préculture après 3 semaines de culture.

Les plantes sont cultivées dans des erlenmeyers de 500 mL et des fioles Fernbach de 2 000 mL dans un incubateur réfrigérant à $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ avec un éclairage continu dont l'intensité est approximativement comprise entre 100 et $150 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou $6\,000$ - $9\,000$ lux (émis par l'éclairage de l'enceinte avec une température de couleur correspondant à une « lumière blanche chaude »).



Graphique 2 : Culture des plantes dans un incubateur réfrigérant éclairé.

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. En cas de contamination de la culture mère, notamment par des algues, des champignons et/ou des bactéries, il convient de préparer une nouvelle culture ou d'utiliser une culture mère provenant d'un autre laboratoire pour la remplacer.

ANNEXE 4

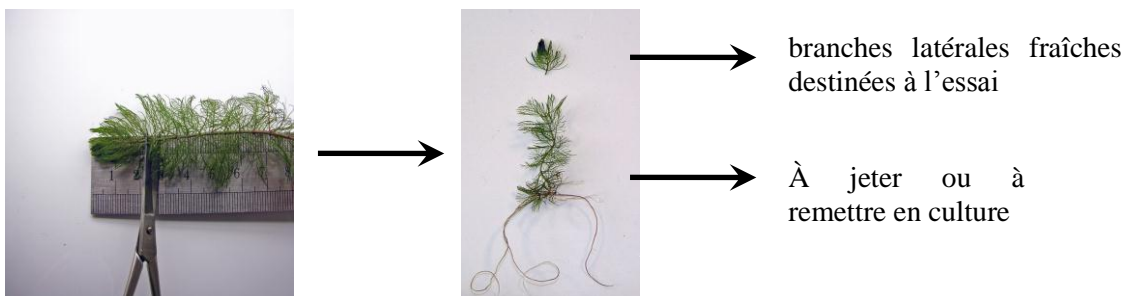
ENTRETIEN D'UNE PRÉCULTURE ET PRÉPARATION DE L'ORGANISME POUR L'ESSAI

Pour obtenir une préculture, couper les tiges de la culture mère en segments comptant deux verticilles chacun. Placer ces segments dans des fioles Fernbach remplies de milieu d'Andrews modifié contenant 3 % de sucrose. Chaque fiole peut recevoir jusqu'à 50 segments de tige. Cependant, on s'assurera que les segments sont vivants et ne présentent ni racines, ni branches latérales, ni bourgeons (voir graphique 1 de l'annexe 3).

La préculture dure 14 à 21 jours en conditions stériles dans une enceinte environnementale alternant 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. L'intensité lumineuse sera comprise entre 100 et 150 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La température des récipients d'essai est maintenue à 23 ± 2 °C.

Étant donné que le milieu d'Andrews modifié contient du sucrose (qui stimule la croissance des algues, des champignons et des bactéries), les solutions du produit chimique d'essai sont préparées et la culture est effectuée en conditions stériles. L'ensemble des liquides et du matériel expérimental est stérilisé avant utilisation. Cette stérilisation se fait par traitement à l'air chaud (210 °C) pendant 4 heures, ou en autoclave durant 20 minutes à 121 °C. D'autre part, tous les ballons, fioles, boîtes et autres équipements sont passés à la flamme sur une paillasse stérile avant d'être utilisés.

On retire les tiges des fioles de préculture en conditions axéniques, en choisissant un matériel végétal aussi homogène que possible. Chaque essai nécessite au moins 60 spécimens (essai portant sur huit concentrations du produit chimique d'essai). Aux fins de l'essai, prélever des branches latérales des végétaux précultivés, les raccourcir à 2.5 cm à partir de leur base (mesure effectuée à l'aide d'une règle) et les transférer dans un bécher contenant du milieu d'Andrews modifié stérile. Ces branches latérales fraîches peuvent servir à l'essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système sans sédiment.



Graphique 2 : Sectionnement des plantes précultivées pour l'essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système sans sédiment.