

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

ESSAI DE TOXICITÉ SUR MYRIOPHYLLUM SPICATUM DANS UN SYSTÈME EAU- SÉDIMENT

INTRODUCTION

1. Il existe des Lignes directrices de l'OCDE pour les essais portant sur des plantes aquatiques monocotylédones flottantes appartenant au genre *Lemna* (1) et pour des espèces d'algues (2). Ces Lignes directrices sont utilisées en routine pour livrer des données permettant d'examiner les risques liés à des produits chimiques d'essai, en particulier des agents herbicides, pour des espèces végétales aquatiques non visées. Il est néanmoins parfois nécessaire d'obtenir des données pour d'autres espèces de macrophytes. Selon un document d'orientation récemment publié à l'issue d'un atelier de la Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) sur l'évaluation des risques liés aux pesticides pour les macrophytes aquatiques (*Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides*, AMRAP), il est parfois nécessaire de disposer de données concernant les effets sur une espèce de macrophyte enracinée d'un produit chimique d'essai dont on sait que son mode d'action n'affecte pas les espèces *Lemna* et les algues, ou dont le coefficient de partage dans le sédiment laisse craindre une exposition par les racines (3). D'après les connaissances actuelles et l'expérience acquise à ce jour, ce sont les végétaux appartenant au genre des Myriophylles qui ont été choisis comme spécimens privilégiés lorsque des données supplémentaires sur une espèce dicotylédone immergée et enracinée sont requises (4) (5) (6). 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 sur *Myriophyllum spicatum* dans un système eau-sédiment complète la Ligne directrice intitulée « Essai de toxicité sur *Myriophyllum spicatum* dans un système sans sédiment » (7).

2. Le présent document décrit une méthode d'essai qui permet d'évaluer l'effet d'un produit chimique d'essai sur une plante aquatique enracinée, *Myriophyllum spicatum*, dans un système eau-sédiment. Cette méthode s'inspire partiellement de lignes directrices existantes (1) (2) (8) et tient compte de recherches récentes sur l'évaluation des risques pour les plantes aquatiques (3). La méthode fondée sur un système eau-sédiment a été validée par un essai circulaire international mené sur des myriophylles cultivés en conditions statiques et exposés au produit chimique d'essai via la colonne d'eau (9). Ce système

expérimental est toutefois facile à adapter pour exposer les plantes par le biais d'un sédiment chargé ou de la phase aqueuse dans des scénarios semi-statiques ou à dose pulsée, bien que ces modes opératoires n'aient pas été formellement étudiés dans l'essai circulaire. Par ailleurs, la méthode générale peut convenir pour d'autres espèces enracinées immergées ou émergées, notamment d'autres espèces de Myriophylles (dont *Myriophyllum aquaticum*) ou *Glyceria maxima* (10). Pour ces autres taxons, il faudra éventuellement modifier les conditions, la conception et la durée de l'essai. Plus spécifiquement, d'autres recherches s'imposent pour définir les procédures appropriées concernant *Myriophyllum aquaticum*. Ces options ne sont pas présentées en détail dans cette Ligne directrice, qui décrit l'approche standard de l'exposition de *Myriophyllum spicatum* via la phase aqueuse dans un système statique.

3. La présente Ligne directrice pour les essais s'applique aux substances pour lesquelles la méthode d'essai a été validée, comme l'indique le rapport de l'essai circulaire (9), soit aux formulations, produits commerciaux ou mélanges connus. Un essai sur myriophylles peut servir à répondre à un besoin de données de niveau I motivé par une éventuelle contamination du sédiment par une partie du produit chimique d'essai, ou par des questions relatives au mode d'action ou à la sélectivité. De même, un essai sur myriophylles en laboratoire peut être requis dans le cadre d'une stratégie de niveau supérieur répondant à des préoccupations quant aux risques pour les plantes aquatiques. C'est la motivation particulière de l'essai qui déterminera la voie d'exposition (via l'eau ou via le sédiment). 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

4. L'essai est conçu pour évaluer les effets de produits chimiques sur le développement végétatif de plantes appartenant au genre des Myriophylles cultivées dans des milieux normalisés (eau, sédiment et nutriments). À cette fin, on plante des apex d'individus sains et sans fleurs dans un sédiment synthétique normalisé complété par des nutriments supplémentaires assurant leur croissance adéquate, puis on les maintient dans le milieu de Smart et Barko. Après une période d'implantation permettant aux racines de se former, les végétaux sont exposés à une série de concentrations d'essai ajoutées à la colonne d'eau. Il est aussi possible de simuler une exposition via le sédiment en chargeant le sédiment synthétique avec le produit chimique d'essai avant d'y transplanter les végétaux. Dans les deux cas, les plantes sont ensuite cultivées dans des conditions environnementales contrôlées pendant 14 jours. Les effets sur la croissance sont déduits d'évaluations quantitatives de la longueur de la tige, du poids frais et du poids sec, ainsi que d'observations qualitatives de symptômes tels que la chlorose, la nécrose ou les anomalies de croissance.

5. Pour quantifier les effets imputables au produit chimique, la croissance observée dans les solutions d'essai est comparée à celle des plantes 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 %.

6. On détermine le taux de croissance spécifique moyen (estimé à partir de la longueur de la tige, du poids frais et du poids sec de la tige) ainsi que le rendement (estimé à partir de l'accroissement de la tige, du poids frais et du poids sec de la tige) 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, $C_{10}E_r$, $C_{20}E_r$, $C_{50}E_r$).

7. S'il y a lieu, la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la concentration sans effet observé (CSEO) peuvent être déterminées par un calcul statistique en s'appuyant sur les estimations du rendement et des taux de croissance spécifiques moyens.

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI

8. Il conviendrait de disposer d'une méthode analytique suffisamment sensible pour quantifier la substance d'essai dans le milieu expérimental.

9. Parmi les données sur la/les substance(s) d'essai qui pourraient servir à établir les conditions expérimentales figurent la formule structurale, la composition (pour les mélanges et les formulations), la pureté, l'hydrosolubilité, la stabilité dans l'eau et à la lumière, la constante d'acidité (pK_a), le coefficient de partage octanol-eau (K_{oe}), si possible le K_d dans les sédiments, 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. Si l'on peut s'attendre à des pertes de substance d'essai, celles-ci doivent être quantifiées et les mesures prises pour y remédier doivent être documentées. 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. *Note* : Quand l'essai porte sur des herbicides qui ont une action peroxydante photo-induite, l'éclairage du laboratoire sera réglé de façon à émettre le même rayonnement ultraviolet que la lumière naturelle du soleil.

10. Le pH du milieu d'essai est mesuré et ajusté, s'il y a lieu. Il est particulièrement important de maîtriser le pH du milieu expérimental, notamment pour tester des métaux ou des produits chimiques sensibles à l'hydrolyse. Pour les essais rendus difficiles par les propriétés physico-chimiques du produit chimique testé, on trouvera des informations supplémentaires dans le document d'orientation de l'OCDE n° 23, Série sur les essais et l'évaluation (11).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

11. Pour que les résultats de l'essai soient valables, il faut que les moyennes de la longueur totale des tiges et du poids frais des tiges obtenues pour les plantes témoins aient au moins doublé au cours de la phase d'exposition de l'essai. Par ailleurs, les plantes témoins ne doivent pas présenter de symptômes apparents de chlorose, ni de signes manifestes de contamination par d'autres organismes comme des algues et/ou des films de bactéries, que ce soit sur le végétal, à la surface du sédiment ou dans le milieu expérimental.

12. Dans les cultures témoins, le coefficient de variation moyen du rendement du poids frais des tiges (entre le début et la fin de l'essai) ne doit pas dépasser 35 % entre les réplicats.

SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

13. Une ou plusieurs substances de référence, comme le 3,5-dichlorophénol utilisé dans l'essai circulaire (9), doivent faire l'objet d'essais réguliers pour vérifier la validité du procédé expérimental au fil du temps. Dans l'essai circulaire, les valeurs moyennes de la CE_{50} du 3,5-DCP pour les différentes variables étudiées étaient situées entre 4.7 et 6.1 mg/L (voir le rapport de l'essai circulaire pour plus de précisions sur les intervalles de confiance anticipés associés à ces valeurs). Il est conseillé de tester la substance de référence au moins deux fois par an ou, si l'essai est rarement conduit, parallèlement aux essais de toxicité finaux. Le rapport statistique de l'essai circulaire international (9) comprend un guide indiquant les valeurs de la CE_{50} attendues pour le 3,5-DCP.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**Appareillage**

14. L'essai est mené dans des conditions environnementales contrôlées, c'est-à-dire dans une enceinte de croissance, une salle de croissance ou un laboratoire où il est possible de maîtriser la durée d'une journée, l'éclairage et la température (voir les paragraphes 55-57 de la section « Conditions expérimentales »). Les cultures mères doivent être conservées séparément des récipients d'essai.

15. Cette étude fait appel à des récipients expérimentaux en verre, par exemple des aquariums ou des béchers ; on utilise communément des béchers en verre de 2 L (environ 24 cm de hauteur et 11 cm de diamètre). D'autres récipients (plus grands) pourraient néanmoins convenir, à condition que la hauteur d'eau permette une croissance illimitée et que les plantes restent immergées pendant toute la durée de l'essai.

16. Des pots de fleurs en plastique ou en verre (environ 9 cm de diamètre et 8 cm de hauteur, pour un volume de 500 mL) peuvent être utilisés pour planter les végétaux dans le sédiment. Des béchers en verre peuvent aussi remplir cet office, et sont même préférables dans certains cas, notamment pour tester des substances hydrophobes ou à K_{oc} élevé.

17. La taille des béchers ou des pots dépendra des récipients expérimentaux et de la conception d'essai choisis (voir ci-dessous). Pour la conception expérimentale A (une tige par pot, trois pots par récipient), il faudra peut-être des pots plus petits ou des récipients plus grands. Pour la conception expérimentale B (trois tiges par pot, un pot par récipient), la taille indiquée pour les pots et les récipients devrait convenir. Dans tous les cas, il faut que le sédiment soit recouvert d'au moins 12 cm d'eau, et on déterminera le rapport entre superficie/volume de sédiment et superficie/volume d'eau.

Organisme d'essai

18. Le principe général de cette méthode d'essai peut être adopté pour soumettre à l'essai différentes espèces de plantes aquatiques. Cependant, les conditions définies dans la présente Ligne directrice ont été établies pour une espèce précise de Myriophylles, *Myriophyllum spicatum*. Cette espèce appartient à une famille de plantes dicotylédones, les Haloragidacées.

19. *Myriophyllum spicatum* (Myriophylle en épis) est une espèce immergée enracinée qui tolère des conditions très diverses et pousse dans des masses d'eau courantes ou stagnantes. C'est une plante vivace dont la partie non enracinée meurt pendant l'hiver. En général, ces végétaux fleurissent et produisent des graines librement, même si la propagation végétative à partir de bourgeons axillaires ou de fragments de tige, qui se détachent naturellement ou après une perturbation, est souvent la principale méthode de colonisation.

Culture de l'organisme d'essai

20. Le matériel végétal utilisé peut provenir de populations naturelles ou de fournisseurs de plantes aquatiques. Dans les deux cas, il convient de garder une trace de la source des plantes et d'en vérifier l'espèce. 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. En cas de doute, il est conseillé de faire appel à des plantes cultivées en laboratoire dont l'espèce a été vérifiée et dont les sources sont connues. On évitera les spécimens exposés à des contaminants chimiques ou prélevés sur des sites que l'on sait contaminés.

21. Dans les régions où *M. spicatum* n'est pas aisément disponible pendant les mois d'hiver, il peut s'avérer nécessaire d'entretenir durablement des cultures mères dans une serre ou en laboratoire. Les cultures mères sont entretenues dans des conditions similaires à celles de l'essai, mais l'énergie lumineuse et la température peuvent être réduits pour limiter la fréquence des opérations d'entretien (par exemple quand aucun essai sur myriophylles n'est prévu pendant un certain temps). Il est recommandé d'utiliser des pots de fleurs ou des aquariums plus grands que ceux qui sont employés dans les essais afin de laisser aux végétaux assez de place pour proliférer. La composition du sédiment et des milieux aqueux doit être identique à celle de l'essai, bien qu'il soit possible d'adopter d'autres méthodes de fertilisation du sédiment (en ayant par exemple recours à des formulations commerciales d'engrais à diffusion lente).

22. Les cultures mères ne doivent présenter aucune contamination visible par d'autres organismes comme des escargots, des algues filamenteuses, des champignons ou des insectes, notamment des œufs ou des larves du papillon *Paraponyx stratiotata* ainsi que des larves ou des adultes du curculionidé *Eubrychius velutus*. Pour éliminer les contaminations visibles, il faudra parfois rincer les végétaux avec de l'eau fraîche. En outre, on s'efforcera de réduire au minimum le développement d'algues unicellulaires et la contamination bactérienne, même s'il n'est pas nécessaire que les plantes soient parfaitement stériles. Les cultures mères sont surveillées et, s'il y a lieu, transplantées pour éviter la progression de contaminations par des algues ou des bactéries. Si ces contaminations deviennent problématiques, une aération des cultures mères peut s'avérer utile.

23. Dans tous les cas, les plantes sont cultivées ou acclimatées dans des conditions similaires – mais pas nécessairement identiques – aux conditions expérimentales pendant une période suffisante (supérieure à deux semaines) avant leur utilisation dans l'essai.

24. Les cultures mères qui fleurissent ne sont pas utilisées pour l'essai car les taux de croissance végétative sont généralement plus faibles pendant et après la floraison.

Sédiment

25. Il est recommandé d'utiliser pour cet essai un sédiment reconstitué préparé selon la méthode ci-dessous, inspirée de la Ligne directrice pour les essais de l'OCDE n° 219 (8). À part l'ajout d'éléments nutritifs, la méthode est la même que celle décrite dans la LD 219 :

- a) 4-5 % de tourbe (poids sec, pour 2 ± 0.5 % de carbone organique) avec un pH aussi proche que possible de 5.5-6.0 ; il est important d'utiliser une tourbe sous forme de poudre, finement broyée (taille des particules de préférence inférieure à 1 mm) et séchée uniquement à l'air.
- b) 20 % (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %).
- c) 75-76 % (poids sec) de sable quartzique (composé en majorité de sable fin, plus de 50 % des particules mesurant entre 50 et 200 μm).
- d) ajouter un milieu nutritif aqueux de façon que le lot de mélange composant le sédiment final contienne 200 mg de chlorure d'ammonium + phosphate de sodium par kilogramme de sédiment sec, avec un taux d'humidité situé entre 30 et 50 %.
- e) ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure (CaCO_3) pour ajuster le pH du mélange final composant le sédiment à 7.0 ± 0.5 .

26. La source de tourbe, d'argile kaolinique et de sable doit être connue et documentée. Si l'origine est inconnue ou suscite quelque préoccupation, il faut vérifier que chaque composant est exempt de contamination chimique (métaux lourds, composés organochlorés ou organophosphorés, etc.).

27. On mélange les ingrédients secs du sédiment de manière homogène avant d'y incorporer uniformément la solution aqueuse de nutriments. Le sédiment humide est préparé au moins deux jours à l'avance pour que la tourbe soit complètement imbibée, et pour empêcher que des particules de tourbe hydrophobes ne surnagent une fois que le sédiment est recouvert par les milieux expérimentaux ; avant utilisation, le sédiment humide peut être conservé dans l'obscurité.

28. Aux fins de l'essai, le sédiment est transféré dans des récipients de taille adaptée, par exemple des pots de fleurs pouvant être contenus dans les récipients en verre (la superficie du sédiment doit recouvrir environ 70 % minimum de la superficie du récipient). Lorsque le récipient est troué au fond, on peut y placer un morceau de papier filtre pour empêcher le sédiment de s'échapper du récipient. Le sédiment est versé dans les pots de façon à obtenir une surface plane, puis on le recouvre d'une fine couche (2 à 3 mm environ) d'un matériau inerte tel que du sable, du gravier de jardin fin ou du corail broyé pour le maintenir en place.

Milieu expérimental

29. Il est conseillé d'employer le milieu de Smart et Barko (12) pour cultiver *Myriophyllum spicatum* et le soumettre à l'essai. La préparation de ce milieu est décrite en annexe. Au début de l'essai, le pH du milieu (phase aqueuse) doit être situé entre 7.5 et 8.0 pour garantir une croissance végétale optimale.

Conception de l'essai

30. L'essai doit inclure au moins six récipients expérimentaux identiques (réplicats) du témoin non traité et au moins quatre réplicats pour chacune des concentrations d'exposition, lesquelles sont au nombre de cinq minimum.

31. 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 réplicats par concentration.

32. Chaque récipient d'essai représente un réplicat contenant trois tiges. Il existe deux possibilités pour cultiver trois tiges par récipient expérimental :

- Conception expérimentale A : une tige par pot et trois pots par récipient.
- Conception expérimentale B : trois tiges par pot et un pot par récipient.
- D'autres conceptions prévoyant une tige par pot et par récipient expérimental sont acceptables, à condition d'ajuster le nombre de réplicats de manière à satisfaire les critères de validité.

33. Chaque récipient d'essai doit être assigné à un groupe traité de façon aléatoire. L'emplacement des récipients expérimentaux sur la surface d'essai doit être aléatoire, afin de réduire au minimum l'influence des différences spatiales d'intensité lumineuse ou de température.

Groupes témoins et concentrations du produit chimique d'essai

34. Les concentrations forment habituellement une série géométrique, et ne sont pas séparées par un facteur supérieur à 3.2. Un essai de détermination de l'ordre de grandeur donnera une première idée de la

toxicité du produit chimique d'essai et permettra de sélectionner les concentrations expérimentales adéquates.

35. Pour déterminer une CE_x , il faut que les concentrations expérimentales encadrent 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} 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. Recourir à un plus grand nombre de concentrations d'essai améliorera l'intervalle de confiance encadrant la CE_x obtenue.

36. Pour déterminer la CMEO et la CSEO (effet étudié facultatif), il faut que la concentration expérimentale la plus faible soit suffisamment basse pour que la croissance des plantes exposées ne soit pas sensiblement différente de celle des témoins. De plus, la concentration expérimentale la plus forte doit être significativement élevée pour que la croissance des plantes exposées soit significativement inférieure à celle des témoins. L'augmentation du nombre de réplicats accroît la puissance statistique du modèle reposant sur la concentration sans effet et l'analyse de variance.

Essai limite

37. Lorsqu'un essai de détermination de l'ordre de grandeur 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 effets observés sur un groupe témoin et sur un groupe traité (à 100 mg/L ou dans le cas d'une substance à une concentration égale à la limite de solubilité, ou à 1 000 mg/kg de sédiment sec). Cet essai doit suivre les principes généraux d'un essai dose-effet classique, à ceci près qu'il est conseillé d'augmenter le nombre minimal de réplicats à six récipients expérimentaux par témoin et par concentration. 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.

Solutions d'essai

38. Les solutions d'essai sont habituellement préparées par dilution d'une solution mère, elle-même obtenue par dissolution ou par dispersion du produit chimique d'essai dans le milieu de Smart et Barko avec de l'eau déminéralisée (distillée ou désionisée) (voir l'annexe).

39. Normalement, la concentration expérimentale maximale ne peut dépasser l'hydrosolubilité de la substance d'essai ou, dans le cas des formulations, sa dispersibilité dans les conditions expérimentales.

40. Pour les substances 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 μ L/L. Si l'on utilise un solvant ou un dispersant, sa concentration finale doit être limitée et ne peut pas dépasser 100 μ L/L. Elle doit alors être identique dans tous les récipients traités et témoins (du solvant) et spécifiée dans le rapport. L'essai doit aussi inclure des réplicats de témoins non traités qui ne contiennent ni solvant, ni dispersant. On trouvera des indications supplémentaires sur le recours aux dispersants dans le document d'orientation de l'OCDE n° 23, Série sur les essais et l'évaluation (11).

MODE OPÉRATOIRE

41. Le mode opératoire varie en fonction de la voie d'application du produit chimique d'essai (phase aqueuse ou sédimentaire). Le comportement probable du produit chimique d'essai dans un système eau-sédiment doit être pris en compte dans le choix du régime d'exposition utilisé dans l'essai (statique ou à renouvellement statique, eau chargée ou sédiment chargé). Les essais avec sédiment chargé sont parfois préférables, notamment quand on s'attend à ce qu'une partie non négligeable du produit chimique passe dans la phase sédimentaire.

Phase d'implantation

42. Couper des apex ou extrémités de tige sains, c'est-à-dire sans tiges latérales, sur les plantes des cultures mères, pour obtenir des segments de tige de 6 cm (± 1 cm). Pour la conception expérimentale A (une tige par pot et trois pots par récipient), placer une seule extrémité de tige par pot. Pour la conception expérimentale B (trois tiges par pot et un pot par récipient), placer quatre à cinq apex par pot contenant du sédiment.

43. Dans les deux cas, inclure des plantes dans des pots supplémentaires pour pouvoir choisir une série de spécimens homogènes au début de l'essai, ainsi que pour disposer de plantes surnuméraires qui serviront à contrôler la croissance des racines immédiatement avant le traitement ou seront récoltées pour mesurer la biomasse et la longueur de la tige au Jour 0.

44. On plante environ trois centimètres de tige dans le sédiment, la partie située sous la surface du sédiment devant comporter au moins deux nœuds.

45. Les pots sont ensuite transférés dans les récipients d'essai dans les mêmes conditions environnementales que pour la phase d'exposition, et sont maintenus sept jours dans le milieu de Smart et Barko afin de stimuler le développement racinaire.

46. Après cette étape, plusieurs plantes des pots surnuméraires sont retirées pour contrôler la croissance des racines. Si celle-ci n'est pas manifeste (pas d'extrémité de racine visible), il convient de prolonger la phase d'implantation jusqu'à ce qu'on constate un développement racinaire. Cette étape est recommandée pour garantir que les plantes sont en phase de croissance active quand l'essai débute.

Choix d'une série de plantes homogènes

47. Pour la conception expérimentale A (une tige par pot et trois pots par récipient), les pots sont choisis en fonction de leur homogénéité avant le début de l'essai. Pour la conception expérimentale B (trois tiges par pot, un pot par récipient), les plantes surnuméraires sont retirées pour ne laisser que trois spécimens de taille et d'apparence uniformes.

Exposition via la phase aqueuse

48. Les pots, choisis en fonction de leur homogénéité, sont placés dans des récipients d'essai conformément à la conception adoptée. On y ajoute ensuite le milieu de Smart et Barko. Ce faisant, il faut prendre soin de ne pas perturber le sédiment. À cet effet, on peut utiliser un entonnoir pour verser le milieu, ou placer un disque en plastique pour couvrir le sédiment pendant que le milieu est versé dans les récipients d'essai, à condition que le disque soit retiré immédiatement après. Il est aussi possible de placer les pots dans les récipients expérimentaux après l'ajout du milieu. Dans tous les cas, on pourra utiliser du milieu nouvellement préparé au début de la phase d'exposition, s'il y a lieu de minimiser le risque de

développement d'algues ou de bactéries, ou pour préparer des lots individuels de solution d'essai destinée aux réplicats.

49. La longueur de la tige qui dépasse du sédiment est mesurée, soit avant soit après l'ajout du milieu.

50. Les quantités appropriées de produit chimique d'essai peuvent être ajoutées au milieu expérimental avant que celui-ci soit versé dans les récipients d'essai. On peut également incorporer le produit chimique d'essai dans le milieu après qu'il a été ajouté aux récipients d'essai. Dans ce cas, il conviendra de veiller à ce que le produit chimique d'essai soit uniformément réparti dans l'ensemble du système expérimental, sans perturber le sédiment.

51. Dans tous les cas, l'apparence du milieu expérimental (limpide, trouble, etc.) au début de l'essai doit être consignée.

Exposition via le sédiment

52. On prépare les sédiments chargés à la concentration souhaitée en ajoutant directement une solution du produit chimique d'essai à du sédiment nouvellement préparé. Une solution mère du produit chimique d'essai dissous dans de l'eau désionisée est mélangée au sédiment reconstitué à l'aide d'un laminoir, d'un mélangeur d'aliments ou mélangée à la main. Si le produit chimique d'essai est peu soluble dans l'eau, il peut être dissous dans un volume aussi faible que possible d'un solvant organique adéquat (hexane, acétone ou chloroforme, par exemple). Cette solution est ensuite mélangée à environ 10 g de sable quartzique fin par récipient expérimental. On laisse le solvant s'évaporer, puis le sable est mélangé avec la quantité appropriée de sédiment pour un bécher expérimental. Seuls des agents très volatils peuvent être utilisés pour solubiliser, disperser ou émulsifier le produit chimique d'essai. Il faut garder à l'esprit que le volume et le poids du sable chargé avec le produit chimique d'essai doivent être pris en compte pour la préparation finale du sédiment (c'est-à-dire que le sédiment doit être préparé avec moins de sable). On s'assurera que le produit chimique d'essai ajouté au sédiment est totalement et uniformément réparti dans le sédiment.

53. Les pots sont remplis de sédiment chargé conformément à la méthode décrite précédemment. Les plantes présentant un système racinaire suffisant et choisies en fonction de leur homogénéité sont retirées des pots servant à la phase d'implantation et transplantées dans le sédiment chargé suivant la méthode exposée ci-dessus.

54. Les pots sont placés dans les récipients expérimentaux conformément à la conception adoptée. Le milieu de Smart et Barko est ensuite ajouté avec précaution (au moyen d'un entonnoir) pour éviter de perturber le sédiment. La longueur de la tige qui dépasse du sédiment est mesurée soit avant, soit après l'ajout du milieu.

Maintien des niveaux d'eau pendant la durée de l'essai

55. Le volume d'eau final est consigné et le niveau de l'eau est marqué sur chaque récipient expérimental. Si plus de 10 % de l'eau s'évapore pendant l'essai, il convient d'en ajuster la quantité avec de l'eau distillée. Le cas échéant, il est possible de recouvrir les bécchers de façon non hermétique avec une protection transparente, par exemple un couvercle en plastique transparent, afin de minimiser l'évaporation et la contamination par des spores d'algues.

Conditions expérimentales

56. On applique un éclairage fluorescent blanc chaud et/ou froid pour obtenir une énergie lumineuse d'environ $140 \pm 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ en termes de rayonnement photosynthétiquement actif (400-700 nm) mesuré à la surface de l'eau, avec un cycle alternant 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. L'énergie lumineuse mesurée à la surface du milieu expérimental ne doit pas varier de plus de 15 % par rapport à la valeur choisie.

57. La température des récipients d'essai est maintenue à $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

58. Le pH du milieu témoin ne doit pas 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 spécifiés précédemment peut être démontré.

Durée de l'essai

59. La période d'exposition est de 14 jours.

Mesures et déterminations analytiques

60. Après la phase d'implantation et immédiatement avant l'exposition (soit au Jour 0), les plantes surnuméraires de cinq pots sélectionnés au hasard (conception à trois tiges par pot) ou de 15 pots (conception à une tige par pot) sont prélevées afin d'évaluer la longueur de la tige ainsi que les poids frais et sec, comme indiqué ci-dessous.

61. Pour les plantes qui passent en phase d'exposition, procéder aux évaluations suivantes, récapitulées dans le tableau 1 :

- Déterminer et noter la longueur de la tige principale, le nombre de tiges latérales et la longueur des tiges latérales au moins à la fin de la période d'exposition (par exemple, Jour 14).
- Déterminer visuellement et noter l'état de santé des végétaux au moins trois fois pendant la période d'exposition (par exemple, Jours 0, 7 et 14).
- Déterminer et noter les poids frais et sec des tiges à la fin de l'essai (Jour 14).

62. La longueur de la tige est mesurée avec une règle. Si la plante présente des tiges latérales, leur nombre et leur longueur sont également établis.

63. Les évaluations visuelles de l'état de santé des plantes s'effectuent en consignant l'aspect des végétaux et l'état général du milieu expérimental. Voici quelques-unes des observations à noter :

- nécrose, chlorose ou autre décoloration, comme un rougissement excessif par rapport aux plantes témoins ;
- développement d'une contamination par des algues ou des bactéries ;
- anomalies de croissance, par exemple retard de croissance, altération de l'intervalle entre deux nœuds, malformation des tiges ou des feuilles, prolifération des tiges latérales, perte de feuilles, baisse de la pression de turgescence et fragmentation de la tige ;
- évaluations visuelles de l'état de santé des racines à la fin de l'essai, en éliminant délicatement le sédiment des racines par lavage afin d'observer le système racinaire. L'échelle suivante est recommandée pour évaluer les organismes traités par rapport au groupe témoin :

- 1) absence de racines ;
- 2) développement racinaire faible ;
- 3) développement racinaire modéré ;
- 4) très bon développement racinaire, semblable à celui des témoins.

64. Le poids frais est déterminé au début et à la fin de l'essai en sectionnant la tige au ras du sédiment, puis en séchant la partie sectionnée en la tamponnant avant de la peser. On veillera à éliminer les particules de sédiment susceptibles d'adhérer à la base de la tige. Les tiges sont alors placées dans une étuve à environ 60 °C et déshydratées jusqu'à l'obtention d'un poids constant, avant une nouvelle pesée qui permet de relever le poids sec.

65. Le tableau 1 récapitule les évaluations biologiques minimales à effectuer au cours de l'essai.

Tableau 1 : Programme d'évaluation

Jour post-exposition	<i>Myriophyllum spicatum</i>			
	Longueur de la tige, nombre et longueur des tiges latérales	Évaluation visuelle de l'état des tiges	Poids frais et poids sec de la tige, Évaluation visuelle de l'état des racines	pH O ₂
0	Oui	Oui	Oui	Oui
4	-	-	-	-
7	-	Oui	-	Oui
14	Oui	Oui	Oui	Oui

Oui : indique que les évaluations sont requises à cette date

- : indique que les évaluations ne sont pas nécessaires

Fréquence des mesures et des déterminations analytiques

66. La température du milieu est mesurée au moins une fois par jour dans un récipient d'essai supplémentaire maintenu 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).

67. Le pH et la concentration d'oxygène dissous du milieu expérimental sont vérifiés au début de l'essai, au moins une fois pendant l'essai et à la fin de l'essai dans tous les réplicats. Tous les jours où elles sont prévues, les évaluations sont effectuées à la même heure. Si, pour chaque concentration d'essai, on ne prépare qu'une solution globale pour remplir tous les réplicats, les déterminations au Jour 0 peuvent ne porter que sur ces solutions.

68. Il convient de mesurer l'énergie lumineuse dans l'enceinte de croissance, l'incubateur ou la pièce à des points situés au même niveau que la surface de la phase aqueuse. Ces mesures sont effectuées au moins une fois au début ou pendant 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.

Mesures analytiques du produit chimique d'essai

69. Pour que l'application du produit chimique d'essai soit jugée valide, il convient de l'étayer par des analyses des concentrations expérimentales.

70. On prélève des échantillons d'eau afin de doser le produit chimique pour toutes les concentrations expérimentales peu après le début de l'essai (c'est-à-dire le jour de l'application pour les produits chimiques d'essai stables, ou une heure après l'application pour les produits chimiques instables) et à la fin de l'essai.

71. Il est nécessaire d'établir les concentrations dans le sédiment et dans l'eau interstitielle du sédiment au début et à la fin de l'essai, au moins pour la concentration expérimentale la plus élevée, sauf s'il est attesté que les produits chimiques d'essai sont stables dans l'eau (> 80 % de la concentration nominale). Il n'est pas forcément nécessaire d'effectuer les dosages dans le sédiment et l'eau interstitielle si la répartition du produit chimique d'essai entre l'eau et le sédiment a été clairement déterminée par une étude eau/sédiment menée dans des conditions comparables (par exemple, en termes de rapport sédiment/eau, de méthode d'application ou de type de sédiment).

72. Le prélèvement des échantillons de sédiment au début de l'essai étant susceptible de perturber le système d'essai, il peut s'avérer nécessaire de traiter des récipients supplémentaires pour faciliter les mesures analytiques au début et à la fin de l'essai. De même, quand des évaluations intermédiaires sont jugées nécessaires, c'est-à-dire au Jour 7, et quand les analyses exigent des échantillons de sédiment importants qui ne peuvent être retirés facilement du système d'essai, les déterminations analytiques doivent être pratiquées sur des récipients expérimentaux supplémentaires exposés au même traitement que ceux qui servent aux évaluations biologiques.

73. Il est conseillé d'isoler l'eau interstitielle par centrifugation, par exemple à 10 000 g et 4 °C pendant 30 minutes. Cependant, s'il est démontré que le produit chimique d'essai ne s'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Lorsque les échantillons sont trop petits, il arrive que les concentrations dans l'eau interstitielle soient impossibles à établir.

74. Dans les essais semi-statiques (exposition via la phase aqueuse), où l'on prévoit que la concentration du produit chimique d'essai s'écartera de plus de 20 % de la concentration nominale pendant la durée de l'essai si les solutions expérimentales ne sont pas renouvelées, il convient de prélever des échantillons des solutions d'essai utilisées et fraîchement préparées afin d'y doser le produit chimique d'essai à chaque renouvellement.

75. Lorsque la concentration du produit chimique d'essai mesurée initialement ne se situe pas dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale, mais que 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.

76. Dans tous les cas, il suffira de doser le produit chimique d'essai dans un seul réplicat pour chaque concentration expérimentale. Une autre option consiste à effectuer ces analyses en regroupant des échantillons de tous les réplicats pour chaque concentration.

77. S'il s'avère que la concentration du produit chimique testé a pu se maintenir tout au long de l'essai dans un intervalle de ± 20 % de la concentration nominale ou mesurée initialement, l'analyse des résultats et les conclusions sur les effets étudiés qui en découlent peuvent s'appuyer sur les valeurs nominales ou mesurées initialement.

78. Les concentrations caractérisant les effets sont alors établies à partir des concentrations nominales ou mesurées dans la phase aqueuse au début de l'essai.

79. Cependant, s'il est attesté que la concentration a baissé (variation de plus de 20 % par rapport à la concentration nominale ou mesurée initialement dans le récipient traité) au cours de l'essai, l'analyse des résultats doit se fonder sur la moyenne géométrique de la concentration pendant l'exposition, ou sur des modèles décrivant la diminution de la concentration du produit chimique d'essai dans le récipient traité (11).

ÉVALUATION DES DONNÉES

80. S'il est nécessaire d'employer un solvant ou un dispersant, on pourra regrouper les données des témoins du solvant et non traités pour effectuer les analyses statistiques, à condition que les résultats obtenus dans ces groupes non exposés et contenant le solvant ne présentent pas de différence statistiquement significative.

Variables étudiées

81. Cet essai a pour objectif de déterminer les effets du produit chimique testé sur le développement végétatif de l'espèce d'essai au moyen de deux variables étudiées, à savoir le taux de croissance spécifique moyen et le rendement.

Taux de croissance spécifique moyen

82. Cette variable étudiée est fondée sur l'évolution logarithmique de la longueur totale des tiges, du poids frais total des tiges et du poids sec total des tiges au cours du temps dans les groupes témoins et dans chaque groupe traité. Cette variable est calculée pour chaque réplicat de chaque groupe témoin ou traité. La longueur moyenne et le poids moyen des trois plantes d'un récipient (réplicat) et, par suite, le taux de croissance de chaque réplicat, sont calculés en appliquant la formule suivante :

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

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

83. À partir des résultats relevés dans les réplicats, on calcule une valeur moyenne du taux de croissance ainsi que des estimations de la variance pour chaque groupe témoin ou traité.

84. 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.

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

$$\%Ir = \frac{\mu c - \mu t}{\mu c} \times 100$$

où :

%It : pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique moyen

μc : valeur moyenne de μ dans le groupe témoin (*control*)

μt : valeur moyenne de μ dans le groupe traité

Rendement

86. Cette variable étudiée est fondée sur l'évolution de la longueur totale des tiges, du poids frais total des tiges et du poids sec total des tiges au cours du temps dans les groupes témoins et dans chaque groupe traité. Le pourcentage moyen d'inhibition du rendement (%Ir) peut être calculé pour chaque groupe traité d'après la formule suivante :

$$\%Iy = \frac{bc - bt}{bc} \times 100$$

où :

- %Ir: pourcentage de réduction du rendement
- bc : biomasse finale moins biomasse de départ dans le groupe témoin (*control*)
- bt : biomasse finale moins biomasse de départ dans le groupe traité

Courbes concentration-effet

87. On trace des courbes concentration-effet décrivant le pourcentage d'inhibition moyen de la variable étudiée (It ou Ir, calculé comme indiqué précédemment) en fonction du logarithme de la concentration du produit chimique d'essai.

Estimation de la CE_x

88. Les estimations de la CE_x (par exemple, CE_{50}) s'appuient à la fois sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) et, le cas échéant, sur le rendement (C_xE_r), chacune de ces variables étudiées découlant de la longueur totale des tiges, du poids frais total des tiges et du poids sec total des tiges.

89. 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

90. 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 (13), 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 (13). 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 (14) (15) (16) et (17) décrivent des procédures spécifiques permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues.

91. Pour chaque variable étudiée à analyser, utiliser la relation concentration-effet pour calculer des estimations ponctuelles des valeurs de CE_x . Les limites de confiance à 95 % sont établies pour chaque estimation et 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.

92. Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec bootstrap (rééchantillonnage) (18), si les modèles ou les méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.

93. 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, par exemple les tests de Dunnett ou de William (19) (20) (21) et (22). Il est nécessaire de vérifier si les hypothèses de distribution normale et d'homogénéité de la variance de l'ANOVA tiennent, à l'aide respectivement du test de Shapiro-Wilks et du test de Levene. L'infirmité des hypothèses de distribution normale et d'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance et/ou la déviation de la loi normale sont extrêmes et ne peuvent être corrigées par une transformation, on envisagera d'effectuer l'analyse en appliquant des méthodes comme le test t de Welch avec correction de Bonferroni, le test de tendance régressif de Jonkheere-Terpstra ou le test des médianes de Bonferroni. La référence (16) livre des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.

RAPPORT

94. 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.

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

- durée et conditions de la phase d'implantation ;
- procédé expérimental appliqué (statique ou semi-statique) ;
- date du début de l'essai et durée de l'essai ;
- milieu expérimental, c'est-à-dire sédiment et milieu nutritif liquide ;
- description de la conception expérimentale : enceinte/pièce de croissance ou laboratoire, récipients expérimentaux et couvercles, volumes des solutions, longueur et poids des plantes par récipient expérimental au début de l'essai, rapport entre la superficie du sédiment et celle de l'eau, rapport entre le volume du sédiment et celui de l'eau ;
- 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 de lumière, énergie lumineuse ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) ;
- valeurs du pH dans les milieux des groupes témoins et traités, et aspect des milieux expérimentaux au début et à la fin de l'essai ;
- concentrations d'oxygène ;
- méthode d'analyse et données appropriées sur l'évaluation de la qualité (études de validation, écarts-types ou limites de confiance des analyses) ;
- méthodes de détermination des variables mesurées, par exemple longueur, poids sec, poids frais ;
- tout écart par rapport à la présente Ligne directrice.

Résultats

- données brutes : longueur des tiges et poids des tiges des plantes par pot, et autres variables mesurées pour chaque récipient traité et témoin à chaque observation, et dates des analyses conformément au programme d'évaluation fourni dans le tableau 1 ;
- moyennes et écarts-types pour chaque variable mesurée ;
- courbes de croissance pour chaque concentration ;
- temps de doublement/taux de croissance chez les témoins d'après le poids frais et la longueur des tiges, y compris le coefficient de variation du rendement pour le poids frais ;
- 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} , 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, puissance de l'effet détectable (par exemple, différence significative minimale) ;
- 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 de modifications apportées à cette Ligne directrice sur les résultats de l'essai.

BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (2006), *Essai n° 221: Espèces Lemna, 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>.
2. OCDE (2006), *Essai n° 201: Algues d'eau douce et cyanobactéries, 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/10.1787/9789264069930-fr>.
3. Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.
4. Arts, GHP. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, *Environmental Pollution*, Vol. 153, pp. 199-206.
5. ISO 16191:2013 Water quality – Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of *Myriophyllum aquaticum*.
6. Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, *Pest Management Science*, Vol. 62/8, pp. 715-722.
7. OCDE (2014), *Essai n° 238 : Essai de toxicité sur Myriophyllum spicatum dans un système sans sédiment*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, Éditions OCDE, Paris.
8. OCDE (2004), *Essai n° 219: Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau chargée-sédiment*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, Éditions OCDE, Paris.
<http://dx.doi.org/10.1787/9789264070295-fr>.
9. Ratte, M., H. Ratte (2014), “*Myriophyllum* Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.
10. Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, *Pest Management Science*, Vol. 59/2, pp. 231 – 237.
11. OECD (2000), “Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”, OECD Environmental Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.
12. Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, *Aquatic Botany*, Vol. 21/3, pp. 251-263.
13. Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science Technology*, Vol. 18/9, pp. 713-718.

14. Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, pp. 157-167.
15. Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, 1485-1494.
16. OECD (2006), "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.
21. 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.
22. Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.

ANNEXE

COMPOSITION DU MILIEU DE SMART ET BARKO

Composant	Quantité de réactif ajoutée à l'eau* (mg/L)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	91.7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	69.0
NaHCO_3	58.4
KHCO_3	15.4
pH (équilibre avec l'atmosphère)	7.9

* eau déminéralisée (distillée ou désionisée)