

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

Algues d'eau douce et cyanobactéries, essai d'inhibition de la croissance

INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE sont régulièrement revues et mises à jour, à la lumière des progrès scientifiques. S'agissant de la Ligne directrice 201 : Algues, Essai d'inhibition de la croissance (adoptée en juin 1984), il s'est avéré nécessaire d'ajouter des espèces et de la remanier conformément aux exigences nouvelles en matière d'évaluation des dangers et de classification des substances chimiques. Cette révision s'est appuyée sur la somme des informations tirées, depuis son adoption, d'une solide expérience concrète, des avancées scientifiques dans le domaine des études de toxicité sur les algues et d'une longue pratique réglementaire.

2. Les définitions utilisées sont présentées en Annexe 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Cet essai vise à déterminer les effets d'une substance sur la croissance d'algues microscopiques dulcicoles et/ou de cyanobactéries. Les organismes d'essai en phase de croissance exponentielle sont exposés à la substance d'essai dans des cultures en lots sur une période durant normalement 72 heures. La relative brièveté de l'essai permet néanmoins d'évaluer les effets sur plusieurs générations.

4. L'effet observé est la réduction de la croissance dans une série de cultures d'algues (unités expérimentales) exposées à différentes concentrations de la substance d'essai. L'effet est évalué en fonction de la concentration d'exposition, en comparaison avec la croissance moyenne d'une série de cultures témoins identiques et non traitées. Afin que les effets toxiques ne soient nullement restreints (sensibilité optimale des cultures), les cultures d'algues sont placées dans des conditions propres à une croissance exponentielle non limitée : éléments nutritifs en suffisance et lumière continue, et ce, sur une période assez longue pour que la réduction du taux de croissance spécifique puisse être mesurée.

5. La croissance et l'inhibition de la croissance sont quantifiées d'après des mesures de la biomasse des algues en fonction du temps. La biomasse des algues est définie en poids sec par volume, par exemple des milligrammes d'algues par litre de solution expérimentale. Le poids sec étant difficile à mesurer, on recourt à d'autres paramètres, tels que la numération cellulaire, qui est le plus souvent utilisé, ou le volume, la fluorescence et la densité optique cellulaires, etc. Le facteur de conversion du paramètre de substitution mesuré en biomasse doit être connu.

6. L'effet étudié est l'inhibition de la croissance, exprimée par l'accroissement logarithmique de la biomasse (taux de croissance spécifique moyen) durant la période d'exposition. La concentration entraînant un pourcentage donné d'inhibition du taux de croissance (par exemple 50%) est déterminée en fonction des

© OCDE, (2011).

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

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

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

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

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

9. Les informations sur la substance d'essai pouvant être utiles à l'établissement des conditions expérimentales comprennent la formule structurale, la pureté, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pouvoir d'absorption lumineuse, le pKa et les résultats d'études de transformation, notamment la biodégradabilité dans l'eau.

10. Il faut connaître l'hydrosolubilité, le coefficient de partage octanol-eau (P_{oc}) et la pression de vapeur de la substance d'essai et disposer d'une méthode validée pour quantifier la substance dans les solutions expérimentales, méthode dont le rendement de récupération et le seuil de détection seront mentionnés dans le rapport.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

11. La validité de l'essai repose sur les critères de performance suivants :

- L'accroissement exponentiel de la biomasse des cultures témoins doit être d'un facteur au moins égal à 16 en l'espace de 72 heures (durée de l'essai). Ce qui correspond à un taux de croissance spécifique de 0,92/jour. Le taux de croissance des espèces les plus fréquemment utilisées est généralement nettement supérieur (voir Annexe 2). Ce critère ne sera pas forcément rempli avec les espèces à croissance plus lente que celles énumérées à l'Annexe 2. Dans ce cas, il convient d'allonger la durée de l'essai, afin d'obtenir un facteur de multiplication de la croissance au moins égal à 16 dans les cultures témoins, la croissance devant être exponentielle tout au long de l'essai. La durée de l'essai peut être ramenée à au moins 48 heures pour maintenir une croissance exponentielle non limitée durant l'essai, pourvu que le facteur de multiplication minimal, à savoir 16, soit atteint.
- Le coefficient de variation moyen des taux de croissance spécifiques section par section (jours 0-1, 1-2 et 2-3, pour les essais de 72 heures) dans les cultures témoins (voir le «coefficient de variation» à l'Annexe 1) ne peut pas excéder 35%. Le calcul du taux de croissance spécifique section par section est exposé au paragraphe 49. Ce critère s'applique à la valeur moyenne des coefficients de variation calculés pour les expériences identiques du groupe témoin.
- Le coefficient de variation des taux de croissance spécifiques moyens sur toute la durée de l'essai les cultures témoins identiques ne peut pas dépasser 7% dans les essais menés sur *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Desmodesmus subspicatus*. S'agissant des autres espèces moins souvent testées, cette valeur ne doit pas dépasser 10%.

SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

12. Le procédé expérimental peut être vérifié au moyen de substance(s) de référence telle(s) que le 3,5-dichlorphénol, utilisé dans l'essai tournant international (1). Le dichromate de potassium peut également servir de substance de référence pour les algues vertes. Il est recommandé de mettre une substance de référence à l'essai au moins deux fois par an.

APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

13. Cette Ligne directrice se prête mieux aux substances hydrosolubles qui, dans les conditions de l'essai, sont susceptibles de rester dans l'eau. Les substances volatiles, s'adsorbant fortement, colorées, peu solubles dans l'eau ou les substances susceptibles d'affecter la disponibilité des nutriments ou des minéraux dans le milieu d'essai appellent éventuellement certaines modifications du procédé décrit (par exemple un système fermé, le conditionnement des récipients d'essai). Certaines modifications appropriées sont abordées dans les références (2)(3) et (4).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

14. Les récipients expérimentaux et les autres appareils entrant en contact avec les solutions d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte. Il convient de les nettoyer à fond afin qu'aucun contaminant organique ou minéral n'interfère avec la croissance des algues ou la composition des solutions expérimentales.

15. Généralement en verre, les récipients d'essai possèdent des dimensions autorisant un volume de culture suffisant pour les mesures à effectuer durant l'essai et un transfert massique suffisant de CO₂ depuis l'atmosphère (voir paragraphe 30). Notons que le volume de liquide doit être assez grand pour les déterminations analytiques (voir paragraphe 37).

16. Une partie ou la totalité du matériel suivant peut également être nécessaire :

- Appareillage destiné aux cultures : il est recommandé d'utiliser une armoire ou une enceinte dans laquelle la température d'incubation choisie peut être maintenue à $\pm 2^{\circ}\text{C}$ près.
- Instruments de mesure de la lumière : il est important de savoir que la méthode de mesure de l'intensité lumineuse, et en particulier le type de capteur (collecteur), peut affecter la valeur mesurée. Il est préférable d'effectuer les mesures à l'aide d'un capteur sphérique 4π (sensible à la lumière directe et réfléchie provenant de tous les angles situés au-dessus et en dessous du plan de mesure) ou d'un capteur 2π (sensible à la lumière provenant de tous les angles situés au-dessus du plan de mesure).
- Dispositif permettant de déterminer la biomasse des algues : la numération cellulaire, qui est le paramètre de substitution le plus fréquemment utilisé pour déterminer la biomasse des algues, peut être effectuée avec un compteur électronique de particules, un microscope équipé d'une enceinte de comptage ou un cytomètre à flux. D'autres paramètres de substitution de la biomasse peuvent être mesurés au moyen d'un cytomètre à flux, d'un fluorimètre, d'un spectrophotomètre ou d'un colorimètre. Il est utile de calculer le facteur de conversion du nombre de cellules en poids sec de biomasse. Afin d'obtenir des mesures utiles pour les faibles concentrations de biomasse quand on utilise un spectrophotomètre, il peut s'avérer nécessaire d'employer des cuves avec une longueur d'au moins 4 cm.

Organismes d'essai

17. Plusieurs espèces d'algues microscopiques et de cyanobactéries ne formant pas d'agrégats peuvent être utilisées. Les souches énumérées à l'Annexe 2 se sont avérées convenir au protocole expérimental de cette Ligne directrice.

18. Si l'on utilise d'autres espèces, il faut mentionner leur souche et/ou leur origine. Il y a lieu de confirmer que la croissance exponentielle des algues d'essai sélectionnées peut être maintenue tout au long de l'essai dans les conditions appliquées.

Milieu de croissance

19. Deux milieux de croissance possibles sont préconisés : celui de l'OCDE et le milieu AAP. Les compositions de ces milieux sont détaillées à l'Annexe 3. Il est à noter que la valeur initiale du pH et le pouvoir tampon (régulation de l'augmentation du pH) de ces deux milieux sont différents. De sorte que les résultats des essais risquent d'être différents suivant le milieu employé, notamment avec des substances d'essai ionisantes.

20. Il peut parfois s'avérer nécessaire de modifier le milieu de croissance, par exemple si la substance d'essai est un métal ou un agent chélatant ou si l'essai est mené à différents pH. L'utilisation d'un milieu modifié est décrite en détail et justifiée (3)(4).

Concentration initiale de la biomasse

21. La biomasse initiale doit être identique dans toutes les cultures de l'essai et suffisamment basse pour autoriser une croissance exponentielle tout au long de la période d'incubation sans risque d'épuisement des éléments nutritifs. La biomasse initiale ne dépassera pas 0,5 mg/L en poids sec. On recommande les concentrations cellulaires initiales suivantes :

<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> :	$5 \times 10^3 - 10^4$	cellules/ml
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	$2-5 \times 10^3$	cellules/ml
<i>Navicula pelliculosa</i>	10^4	cellules/ml
<i>Anabaena flos-aquae</i>	10^4	cellules/ml
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	$5 \times 10^4 - 10^5$	cellules/ml

Concentrations de la substance d'essai

22. La gamme de concentrations dans laquelle des effets sont susceptibles de se produire peut être déterminée d'après les résultats d'essais de détermination de l'ordre de grandeur. L'essai proprement dit comprend au moins cinq concentrations formant une série géométrique et séparées par un facteur n'excédant pas 3,2. Un facteur supérieur peut se justifier pour les substances d'essai dont la courbe concentration-effet a une pente nulle. Il est préférable que la gamme de concentrations couvre des valeurs entraînant une inhibition de 5 à 75% du taux de croissance des algues.

Expériences identiques et témoins

23. La conception de l'essai inclut trois expériences identiques à chaque concentration expérimentale. S'il n'est pas nécessaire de déterminer la CSEO, l'essai peut être modifié de manière à inclure un plus grand nombre de concentrations et un plus petit nombre d'expériences identiques par concentration. Le nombre

d'expériences identiques pour le témoin est au moins trois et, idéalement, le double du nombre d'expériences identiques utilisées à chaque concentration expérimentale.

24. Un ensemble séparé de solutions d'essai peut être préparé pour les déterminations analytiques des concentrations de la substance d'essai (voir paragraphes 36 et 38).

25. Si la substance d'essai est solubilisée à l'aide d'un solvant, on inclut des témoins supplémentaires contenant le solvant à la même concentration que celle appliquée dans les cultures expérimentales.

Préparation de la culture de l'inoculum

26. Afin que les algues soumises à l'essai soient adaptées aux conditions expérimentales et soient bien en phase de croissance exponentielle lorsqu'on les utilise pour ensemercer les solutions d'essai, on prépare une culture d'inoculum dans le milieu expérimental 2 à 4 jours avant le début de l'essai. La biomasse des algues doit être ajustée afin que la culture de l'inoculum présente une croissance exponentielle jusqu'au moment où l'essai débute. La culture de l'inoculum est incubée dans les mêmes conditions que les cultures expérimentales. On mesure l'accroissement de la biomasse dans la culture de l'inoculum pour vérifier qu'elle présente une croissance normale pour la souche expérimentale en question dans les conditions de culture. Un exemple de méthode de culture des algues est décrit à l'Annexe 4. Pour éviter des divisions cellulaires synchrones durant l'essai, il est parfois nécessaire de lancer une seconde étape de propagation de la culture de l'inoculum.

Préparation des solutions expérimentales

27. Toutes les solutions expérimentales doivent contenir les mêmes concentrations de milieu de croissance et la même biomasse initiale d'algues d'essai. On prépare généralement les solutions expérimentales aux concentrations choisies en mélangeant une solution mère de la substance d'essai avec le milieu de croissance et la culture de l'inoculum. Les solutions mères sont normalement préparées par dissolution de la substance dans le milieu d'essai.

28. Des solvants, par exemple de l'acétone, de l'alcool t-butylique et du diméthylformamide, peuvent être utilisés comme véhicules pour ajouter des substances peu solubles dans l'eau au milieu expérimental (2)(3). La concentration de solvant ne doit pas excéder 100 µl/L et doit être identique dans toutes les cultures (y compris les témoins) de l'essai.

Incubation

29. Les récipients expérimentaux sont munis de bouchons perméables à l'air. Les récipients sont agités et placés dans l'appareil destiné aux cultures. Durant l'essai, il est nécessaire de garder les algues en suspension et de faciliter le transfert de CO₂. À cette fin, les récipients sont agités, ou leur contenu est remué, en permanence. Les cultures doivent être maintenues à une température comprise entre 21 et 24 °C, maintenue à ± 2 °C près. Des températures plus élevées peuvent être appliquées pour des espèces autres que celles reprises à l'Annexe 2, par exemple des espèces tropicales, à condition que les critères de validité soient respectés. Il est recommandé de disposer les récipients de façon aléatoire et de modifier quotidiennement leur emplacement dans l'incubateur.

30. Le pH du milieu des témoins ne doit pas s'accroître de plus de 1,5 unité durant l'essai. Dans le cas des métaux et des substances qui s'ionisent partiellement à un pH proche de celui de l'essai, il peut s'avérer nécessaire de limiter l'évolution du pH, afin d'obtenir des résultats reproductibles et bien définis. Il est techniquement possible de limiter l'évolution du pH à < 0,5 unités en induisant un taux adéquat de transfert massique de CO₂ de l'air environnant à la solution d'essai, par exemple en augmentant l'intensité de

l'agitation. Une autre possibilité consiste à diminuer la demande en CO₂ en réduisant la biomasse initiale ou la durée de l'essai.

31. La surface sur laquelle les cultures sont incubées reçoit un éclairage continu, uniforme et fluorescent, par exemple «blanche froide» ou de type «lumière naturelle». Les besoins lumineux varient selon les souches d'algues et de cyanobactéries. L'intensité lumineuse est choisie en fonction de l'organisme d'essai utilisé. Pour les espèces d'algues vertes recommandées, l'intensité lumineuse au niveau des solutions d'essai doit être choisie dans l'intervalle 60-120 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ lorsqu'elle est mesurée dans le domaine de longueur d'onde autorisant la photosynthèse (400 à 700 nm) avec un capteur approprié. Certaines espèces, en particulier *Anabaena flos-aquae*, se développent bien sous des intensités lumineuses plus faibles et peuvent être endommagées par des intensités plus fortes. Pour ces espèces, il convient d'appliquer une intensité lumineuse moyenne comprise dans la gamme 40-60 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. (En ce qui concerne les instruments de mesure de la lumière étalonnés en lux, la gamme de 4440-8880 lux pour la lumière blanche froide correspond approximativement à l'intensité lumineuse recommandée de 60-120 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$). L'intensité lumineuse ne s'écarte pas de plus de $\pm 15\%$ de l'intensité lumineuse moyenne dans la zone de l'incubation.

Durée de l'essai

32. L'essai dure normalement 72 heures. Néanmoins des durées plus ou moins longues peuvent être appliquées, à condition que tous les critères de validité mentionnés au paragraphe 11 soient respectés.

Mesures et déterminations analytiques

33. La biomasse des algues contenue dans chaque flacon est déterminée au moins une fois par jour durant la période d'essai. Si les mesures sont effectuées sur de petits volumes extraits de la solution d'essai avec une pipette, ceux-ci ne doivent pas être réintroduits dans le récipient d'essai.

34. La biomasse est mesurée par comptage manuel des cellules au microscope ou au moyen d'un compteur électronique de particules (dénombrement des cellules et/ou biovolume). D'autres techniques, par exemple la cytométrie à flux, la fluorescence chlorophyllienne *in vitro* ou *in vivo* (5)(6) ou la densité optique, peuvent être utilisées, à condition de pouvoir démontrer qu'il existe une corrélation satisfaisante avec la biomasse dans la gamme de valeurs de la biomasse de l'essai.

35. Le pH des solutions est mesuré au début et à la fin de l'essai.

36. Si l'on dispose d'une méthode permettant d'analyser la substance d'essai dans la gamme de concentrations appliquées, il faut analyser les solutions expérimentales afin de vérifier les concentrations initiales et le maintien des concentrations d'exposition durant l'essai.

37. L'analyse de la concentration de la substance d'essai, au début et à la fin de l'essai, dans des récipients renfermant une concentration élevée, une concentration faible et une concentration proche de la CE₅₀ escomptée peut suffire, si les concentrations d'exposition ne sont pas censées s'écartier de plus de 20% des valeurs nominales durant l'essai. Il est préconisé d'analyser toutes les concentrations d'essai au début et à la fin de l'essai, si les concentrations ne sont pas supposées demeurer dans l'intervalle de 80-120% de la concentration nominale. S'agissant des substances d'essai volatiles, instables ou s'adsorbant fortement, on recommande de prélever des échantillons à analyser toutes les 24 heures durant la période d'exposition, afin de préciser la perte de substance d'essai. Pour ces substances, il pourrait être nécessaire d'augmenter le nombre d'expériences identiques. Dans tous les cas, il suffira de déterminer la concentration de la

substance d'essai dans un seul récipient traité de manière identique pour chaque concentration expérimentale (ou dans le mélange du contenu de tous les récipients traités de manière identique).

38. Les milieux d'essai destinés spécialement à l'analyse des concentrations d'exposition durant l'essai doivent être traités de la même manière que les milieux utilisés pour l'essai : ils doivent êtreensemencés avec les algues et incubés dans des conditions identiques. Si l'on doit analyser la concentration de la substance d'essai dissoute, les algues devront peut-être être séparées du milieu. À cette fin, il est préférable de procéder par centrifugation à une faible force d'accélération, suffisante pour sédimenter les algues.

39. S'il s'avère que la concentration de la substance d'essai a pu se maintenir 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 la baisse de la concentration de la substance d'essai (3)(7).

40. L'essai d'inhibition de la croissance des algues est un système expérimental plus dynamique que la plupart des autres essais de toxicité à court terme sur des organismes aquatiques. Aussi, les concentrations d'exposition réelles risquent d'être difficiles à définir, en particulier pour les substances s'adsorbant testées à faibles concentrations. Dans ces circonstances, la disparition de la substance de la solution par adsorption sur la biomasse croissante des algues ne signifie pas que la substance d'essai soit absente du système d'essai. En analysant le résultat de l'essai, il y a lieu de vérifier si la diminution de la concentration de la substance d'essai au cours de l'essai s'est accompagnée d'une baisse de l'inhibition de la croissance. Si tel est le cas, on peut envisager d'appliquer un modèle décrivant convenablement la baisse de la concentration de la substance d'essai (7). Dans le cas contraire, il sera peut-être pertinent de fonder l'analyse des résultats sur les concentrations initiales (nominales ou mesurées).

Autres observations

41. On observe au microscope la culture de l'inoculum pour vérifier si elle présente un aspect normal et sain ainsi que l'aspect des algues pour détecter la présence éventuelle d'anomalies (susceptibles de résulter de l'exposition à la substance d'essai) à la fin de l'essai.

Essai limite

42. Dans certaines circonstances, par exemple lorsqu'un essai préliminaire indique que la substance d'essai n'exerce aucun effet toxique à des concentrations allant jusqu'à 100 mg/L ou à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (suivant celle qui est la plus basse), on peut conduire un essai limite afin de comparer les réactions d'un groupe témoin avec celles d'un groupe traité (à 100 mg/L ou à une concentration égale à la limite de solubilité). Il est fortement recommandé d'étayer cet essai par une analyse de la concentration d'exposition. Tous les critères de validité et conditions expérimentales décrits précédemment s'appliquent à l'essai limite, si ce n'est que le nombre de récipients traités de manière identique doit être au moins égal à six. Les variables étudiées dans le groupe témoin et le groupe traité peuvent être analysées au moyen d'un test statistique permettant de comparer les moyennes, par exemple un test t de Student. Si les variances des deux groupes sont inégales, on effectue un test t ajusté en fonction des variances inégales.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Courbes de croissance

43. La biomasse des récipients d'essai peut être exprimée en unités du paramètre de substitution utilisé pour la mesurer (nombre de cellules, fluorescence, par exemple).

44. Porter dans un tableau la concentration estimée de la biomasse dans les cultures expérimentales et les cultures témoins, les concentrations de la substance d'essai et les moments des mesures, enregistrés avec une précision minimale de l'ordre de l'heure, afin d'obtenir les points des courbes de croissance. Les échelles tant logarithmiques que linéaires peuvent être utiles à ce premier stade, mais les échelles logarithmiques sont indispensables et représentent généralement mieux les variations du rythme de la croissance durant l'essai. Notons que la croissance exponentielle produit une droite lorsqu'elle est portée sur une échelle logarithmique et que la pente de cette droite indique le taux de croissance spécifique.

45. À l'aide des points portés sur le graphique, examiner si les cultures témoins se développent au rythme exponentiel prévu tout au long de l'essai. Étudier attentivement tous les points et l'allure des graphiques et vérifier si les données brutes et les méthodes employées ne sont entachées d'aucune erreur. Vérifier en particulier tous les points qui semblent s'écarter du tracé suivant une erreur systématique. Si, à l'évidence, la manière dont on a procédé comporte des erreurs identifiables ou très probables, le point concerné est à signaler comme une valeur nettement divergente et ne doit pas être pris en compte dans l'analyse statistique ultérieure. (Une concentration nulle d'algues dans un sur deux ou trois récipients traités de manière identique peut révéler que le récipient n'a pas étéensemencé correctement ou qu'il n'a pas été suffisamment bien nettoyé.) Les raisons pour lesquelles on a décidé d'exclure un point parce qu'on le considère comme une valeur nettement divergente sont exposées clairement dans le rapport de l'essai. Les raisons acceptées ne représentent que des erreurs méthodologiques (rares) et non un manque de précision. Les méthodes statistiques d'identification des valeurs nettement divergentes sont d'un usage limité pour ce type de problème et ne peuvent remplacer le jugement d'un expert. Il est préférable de conserver les valeurs nettement divergentes (signalées comme telles) parmi les données présentées ultérieurement sur un graphique ou un tableau.

Variables étudiées

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

- (a) taux de croissance spécifique moyen : cette variable étudiée est calculée d'après l'accroissement logarithmique de la biomasse pendant la durée de l'essai, exprimé par jour.
- (b) rendement : cette variable étudiée correspond à la valeur de la biomasse à la fin de l'essai diminuée de la valeur de la biomasse au début de l'essai.

47. Notons que les valeurs de toxicité calculées avec ces deux variables étudiées ne sont pas comparables et qu'il faut tenir compte de cette différence lorsqu'on utilise les résultats de l'essai. Les valeurs de la CE_x basées sur le taux de croissance spécifique moyen (C_xE_t) seront généralement supérieures à celles basées sur le rendement (C_xE_r), si les conditions expérimentales de cette Ligne directrice sont appliquées, en raison de la base mathématique de chacune de ces approches. Cette différence n'est due qu'au calcul mathématique, il ne s'agit pas d'une différence de sensibilité entre les deux variables étudiées. Le concept du taux de croissance spécifique moyen repose sur l'allure générale de la croissance exponentielle des algues dans des cultures non limitées, où la toxicité est estimée d'après les effets sur le taux de croissance, sans tenir compte du niveau absolu du taux de croissance spécifique du témoin, de la pente de la courbe concentration-effet, ni de la durée de l'essai. En revanche, les résultats basés sur la variable de rendement dépendent de toutes ces autres variables. La C_xE_r dépend du taux de croissance spécifique de l'espèce d'algue utilisée dans chaque essai et du taux de croissance maximum spécifique,

susceptible de varier entre les espèces, voire entre différentes souches. S'il est préférable, du point de vue scientifique, d'estimer la toxicité d'après le taux de croissance spécifique moyen, cette Ligne directrice inclut également l'estimation basée sur le rendement afin de satisfaire à la réglementation en vigueur dans certains pays.

Taux de croissance spécifique moyen

48. Le taux de croissance spécifique moyen durant une période donnée est calculé comme l'accroissement logarithmique de la biomasse, pour chaque expérience identique des groupes traités et témoins, au moyen de l'équation présentée ci-dessous :

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \text{ (jour}^{-1}\text{)}$$

où :

μ_{i-j} est le taux de croissance spécifique moyen du temps i au temps j ;

X_i est la biomasse au temps i ;

X_j est la biomasse au temps j.

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

49. Calculer le taux de croissance spécifique moyen sur l'ensemble de la durée de l'essai (normalement du jour 0 au jour 3), en prenant comme valeur de départ, la valeur nominale de la biomasse ensemencée plutôt que sa valeur mesurée, car cela permet généralement d'obtenir une plus grande précision. Si l'instrument utilisé pour mesurer la biomasse autorise des déterminations suffisamment précises d'une petite biomasse d'inoculum (par exemple un cytomètre à flux), la concentration initiale mesurée de la biomasse peut alors être utilisée. Évaluer également les taux de croissance section par section, en considérant, pour ce calcul, qu'ils équivalent aux taux de croissance spécifiques de chaque jour de l'essai (jours 0-1, 1-2 et 2-3) et vérifier si le taux de croissance des témoins reste constant (voir critères de validité, paragraphe 11). Le fait que le taux de croissance spécifique du premier jour soit sensiblement inférieur au taux de croissance spécifique moyen peut indiquer une phase de latence. S'il est possible de réduire presque à néant la phase de latence dans les cultures témoins par une propagation appropriée de la préculture, la présence d'une phase de latence dans les cultures exposées peut refléter un rétablissement après un choc toxique initial ou une exposition réduite due à une perte de substance d'essai (notamment par sorption sur la biomasse des algues) après l'exposition initiale. Le taux de croissance section par section permet ainsi d'étudier les différents effets de la substance d'essai durant la période d'exposition, d'où son intérêt. Des différences sensibles entre le taux de croissance section par section et le taux de croissance moyen traduisent un écart à la croissance exponentielle constante et appellent un examen attentif des courbes de croissance.

50. Calculer le pourcentage d'inhibition du taux de croissance pour chaque expérience identique de chaque groupe traité selon l'équation suivante :

$$\%I_t = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

où :

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

μ_C est la valeur moyenne du taux de croissance spécifique moyen (μ) dans le groupe témoin ;

μ_T est le taux de croissance spécifique moyen d'une des expériences identiques du groupe traité.

51. Si les solutions d'essai sont préparées à l'aide d'un solvant, c'est le témoin au solvant plutôt que le témoin sans solvant qui doit être utilisé pour calculer le pourcentage d'inhibition.

Rendement

52. Le rendement est calculé d'après la différence entre la valeur de la biomasse à la fin de l'essai et sa valeur au début de l'essai pour chaque expérience identique des groupes traités et témoins. Pour chaque concentration expérimentale et le témoin, calculer un rendement moyen ainsi que les estimations de la variance. Le pourcentage d'inhibition du rendement ($\%I_r$) peut être calculé pour chaque expérience identique de chaque groupe traité d'après la formule suivante :

$$\%I_r = \frac{(R_C - R_T)}{R_C} \times 100$$

où :

$\%I_r$ est le pourcentage d'inhibition du rendement

R_C est la valeur moyenne du rendement dans le groupe témoin

R_T est la valeur du rendement dans l'une des expériences identiques du groupe traité.

Courbes concentration-effet

53. Porter sur un graphique le pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration de la substance d'essai et examiner les points attentivement, sans tenir compte des points ayant été éliminés parce que considérés comme des valeurs nettement divergentes au cours de la première phase. Faire passer une courbe régulière entre les points, à vue d'oeil ou par interpolation informatique, afin d'obtenir une première impression de la relation concentration-effet et poursuivre par une méthode plus détaillée, de préférence une méthode statistique informatisée. En fonction de l'usage auquel on destine les données, de la qualité (précision) et de la quantité des données ainsi que de la disponibilité des outils d'analyse des données, on pourra décider (et bien justifier certains cas) d'arrêter l'analyse des données à ce stade et de ne retenir que les chiffres clés, à savoir la CE_{50} et la CE_{10} (et/ou la CE_{20}), de la courbe ajustée à vue d'oeil (voir également la section ci-après sur les effets stimulants). Citons quelques raisons valables de ne pas recourir à une méthode statistique :

- traitées par des méthodes informatisées, les données ne livreront pas de résultats plus fiables que ceux obtenus par une analyse d'expert - dans ces circonstances, certains programmes informatiques risquent même d'être incapables de produire une solution fiable (les itérations peuvent ne pas converger, etc.)
- les effets stimulant la croissance ne peuvent être traités correctement par les programmes informatiques disponibles (voir plus bas).

Méthodes statistiques

54. L'objectif consiste à obtenir une relation quantitative concentration-effet par une analyse de la régression. Il est possible d'appliquer une régression linéaire pondérée après avoir effectué une

transformation linéarisant les valeurs décrivant l'effet observé - par exemple en unités probit ou logit ou Weibull (8), mais il est préférable d'appliquer des méthodes de régression non linéaire, celles-ci traitant mieux les irrégularités inévitables des valeurs et les écarts par rapport aux distributions régulières. Proches de zéro ou de l'inhibition totale, ces irrégularités risquent d'être amplifiées par la transformation et d'interférer avec l'analyse (8). Notons que les méthodes d'analyse courantes faisant appel aux transformations probit, logit ou Weibull se prêtent aux effets par tout ou rien (mortalité ou survie, par exemple) et doivent être modifiées pour pouvoir être utilisées avec les valeurs de croissance ou de biomasse. Les références (9)(10) et (11) décrivent des procédures permettant de déterminer les valeurs de la CE_x à partir de données continues. L'utilisation d'une analyse de la régression non linéaire est détaillée à l'Annexe 5.

55. Pour chaque variable étudiée à analyser, utiliser la relation concentration-effet pour calculer des estimations ponctuelles des valeurs de CE_x . Déterminer, si possible, les limites de confiance à 95% pour chaque estimation. La validité de l'ajustement des données décrivant les effets au modèle de régression est à évaluer par un procédé statistique ou graphique. L'analyse de la régression doit s'appuyer sur les effets relevés dans chaque récipient traité de manière identique et non sur les moyennes des groupes traités. Si toutefois, l'ajustement d'une courbe non linéaire est difficile ou échoue parce que les données sont trop dispersées, une régression peut alors être effectuée sur les moyennes des groupes, ce qui permet de réduire l'influence des valeurs soupçonnées d'être nettement divergentes. Le recours à cette option doit être signalé dans le rapport d'essai en tant qu'écart à la procédure normale, écart dû au fait que l'ajustement de la courbe avec les valeurs individuelles des expériences identiques n'a pas livré un bon résultat.

56. Les estimations de la CE_{50} et les limites de confiance peuvent aussi être obtenues par interpolation linéaire avec bootstrap (rééchantillonnage) (13), si les modèles ou les méthodes de régression disponibles ne conviennent pas aux données.

57. Afin d'estimer la CMEO, et par conséquent la CSEO, pour les effets de la substance d'essai sur le taux de croissance, il est nécessaire de comparer les moyennes des groupes traités par des techniques d'analyse de la variance (ANOVA). La moyenne de chaque concentration doit ensuite être comparée avec la moyenne du témoin à l'aide d'un test approprié à comparaisons multiples ou de tendance. Les tests de Dunnett ou de William peuvent être utiles (12)(14)(15)(16)(17). Il est nécessaire de vérifier si l'hypothèse de l'ANOVA de l'homogénéité de la variance tient. Cette vérification peut être pratiquée par un procédé graphique ou par un test formel (17), notamment les tests de Levene ou de Bartlett. L'infirmité de l'hypothèse de l'homogénéité de la variance peut quelquefois être corrigée par une transformation logarithmique des données. Si l'hétérogénéité de la variance est extrême et ne peut être rectifiée par une transformation, on envisagera des méthodes d'analyse telles que les tests de tendance régressifs de Jonkheere. La référence (11) livre des renseignements supplémentaires sur la détermination de la CSEO.

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

Stimulation de la croissance

59. On observe quelquefois une stimulation de la croissance (inhibition négative) aux faibles concentrations. Ce phénomène peut résulter d'une hormèse («stimulation toxique») ou de l'introduction de facteurs de stimulation de la croissance, véhiculés par la substance d'essai, dans le milieu minimal utilisé. Notons que l'addition de nutriments minéraux ne devrait exercer aucun effet direct étant donné que le milieu d'essai doit contenir un excès de nutriments tout au long de l'essai. La stimulation à faible dose peut

habituellement être ignorée dans les calculs de la CE_{50} , à moins qu'elle ne soit très prononcée. Néanmoins, si cette stimulation est extrême ou s'il faut calculer une valeur de CE_x pour une faible valeur de x , des procédures particulières pourraient être requises. On évitera, dans la mesure du possible, de soustraire les effets stimulants à l'analyse des données et, si le logiciel permettant d'ajuster la courbe ne peut pas accepter une stimulation mineure, une interpolation linéaire avec bootstrap peut être employée. Si la stimulation est extrême, l'utilisation d'un modèle d'hormèse est envisageable (18).

Inhibition non toxique de la croissance

60. Les substances d'essai absorbant la lumière peuvent abaisser le taux de croissance, car l'obscurcissement diminue la quantité de lumière disponible. Il y a lieu de séparer ces types d'effets physiques des effets toxiques en modifiant les conditions expérimentales et de rapporter les premiers séparément. Les références (2) et (3) donnent des indications à ce sujet.

Rapport d'essai

61. Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes :

Substance d'essai :

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

Espèce soumise à l'essai :

- souche, fournisseur ou source et conditions de culture utilisées.

Conditions expérimentales :

- date du début de l'essai et durée de l'essai ;
- description de la conception de l'essai : récipients d'essai, volumes des cultures, densité de la biomasse au début de l'essai ;
- composition du milieu ;
- concentrations expérimentales et expériences identiques (par exemple nombre d'expériences identiques, nombre de concentrations expérimentales et progression géométrique appliquée) ;
- description de la préparation des solutions expérimentales, y compris l'utilisation de solvants, etc.
- appareillage destiné aux cultures ;
- intensité et qualité lumineuses (source, homogénéité) ;
- température ;
- concentrations mises à l'essai : concentrations d'essai nominales et tous les résultats d'analyses pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans les récipients expérimentaux. Le rendement de récupération de la méthode et le seuil de quantification dans la matrice expérimentale doivent être mentionnés ;
- tous les écarts à cette Ligne directrice ;
- méthode de détermination de la biomasse et démonstration de la corrélation entre le paramètre mesuré et le poids sec ;

Résultats :

- valeurs du pH au début et à la fin de l'essai dans tous les récipients traités ;
- biomasse dans chaque récipient à chaque point de mesure et méthode de mesure de la biomasse ;
- courbes de croissance (biomasse en fonction du temps) ;
- calcul des variables étudiées pour chaque expérience identique de chaque traitement ainsi que des moyennes et du coefficient de variation des expériences identiques ;
- représentation graphique de la relation concentration-effet ;
- estimation de la toxicité pour les variables étudiées, par exemple la CE₅₀, la CE₁₀ et la CE₂₀ et intervalles de confiance associés. CME0 et CSEO, si elles ont été calculées, et méthodes statistiques appliquées à leur détermination ;
- si une analyse de la variance (ANOVA) a été pratiquée, puissance de l'effet détectable (par exemple la différence la moins significative) ;
- stimulation de la croissance éventuellement observée dans un groupe traité ;
- tout autre effet observé, par exemple changement morphologique des algues ;
- analyse des résultats, notamment l'influence d'un éventuel écart à cette Ligne directrice sur les résultats de l'essai.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) International Organisation for Standardisation (1993) ISO 8692 Qualité de l'eau – Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires.
- (2) International Organisation for Standardisation (1998) ISO/DIS 14442 Qualité de l'eau – Lignes directrices pour essais d'inhibition de la croissance algale avec des matières peu solubles, des composés volatils, des métaux et des eaux résiduaires.
- (3) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.
- (4) International Organisation of Standardisation (1998) ISO 5667-16 Qualité de l'eau – Échantillonnage – Partie 16 : Lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons.
- (5) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.
- (6) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22,5, pp.919-925
- (7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem* 22, 2073-2079.
- (8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.
- (9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.

- (10) Bruce, R.D.,and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Env. Toxicol. Chem.* 11:1485-1494.
- (11) OECD. (2004). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*. Organisation pour la Cooperation et le Development Economiques, Paris.
- (12) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121
- (13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.
- (14) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- (15) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
- (16) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519-531.
- (17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, New York.
- (18) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

ANNEXE 1**DÉFINITIONS**

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

Biomasse : poids sec de la matière vivante présente dans une population exprimé en fonction d'un volume donné, par exemple en mg d'algues/litre de solution d'essai. D'habitude la biomasse est définie comme une masse, mais, dans cet essai, le terme «biomasse» se réfère à une masse par unité de volume. Remarquons également que, dans cet essai, la biomasse est en général mesurée indirectement, par la numération des cellules, la fluorescence, etc., si bien que le terme «biomasse» recouvre également ces mesures de substitution.

Coefficient de variation : mesure sans dimension de la variabilité d'un paramètre, définie par le rapport de l'écart-type à la moyenne. Il s'exprime également en pourcentage. Le coefficient moyen de variation du taux de croissance spécifique moyen des expériences identiques du groupe témoin se calcule comme suit :

1. Calculer le coefficient de variation (en %) du taux de croissance spécifique moyen en fonction des taux de croissance quotidiens (section par section) pour chaque expérience identique.
2. Calculer la valeur moyenne de toutes les valeurs calculées au point 1, afin d'obtenir le coefficient moyen de variation du taux de croissance spécifique quotidien (section par section) des cultures témoins identiques.

CE_x : concentration de la substance d'essai dissoute dans le milieu d'essai entraînant une réduction de x% (par exemple 50%) de la croissance des organismes d'essai durant 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.

Milieu de croissance : milieu de culture synthétique complet dans lequel les algues se développent lorsqu'elles sont exposées à la substance d'essai, celle-ci étant généralement dissoute dans le milieu d'essai.

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

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

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 cette Ligne directrice, les taux de croissance et le rendement représentent les variables étudiées déduites de la mesure directe de la biomasse ou de sa mesure indirecte d'après l'un des paramètres de substitution mentionnés précédemment.

Taux de croissance spécifique: variable étudiée correspondant au quotient de la différence des logarithmes népériens d'un paramètre observé (la biomasse, dans cette Ligne directrice) par la période de temps respective.

Rendement: différence entre la valeur d'une variable mesurée à la fin de la période d'exposition et la valeur de cette variable mesurée au début de la période d'exposition, utilisée pour exprimer l'accroissement de biomasse durant l'essai.

ANNEXE 2

SOUCHES CONVENANT À L'ESSAI

Algues vertes

- *Pseudokirchneriella subcapitata* (dénommée précédemment *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG.
- *Desmodesmus subspicatus* (dénommé précédemment *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG.

Diatomées

- *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Cyanobactéries

- *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A
- *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Sources de souches

Les souches recommandées sont disponibles sous la forme de cultures unialgales dans les collections suivantes (par ordre alphabétique) :

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
États-Unis

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
Royaume-Uni

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nicholausberger Weg 18
D-3400 Göttingen
Allemagne

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
The University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
États-Unis.

Aspect et caractéristiques des espèces recommandées

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Aspect	Cellules solitaires, incurvées et torsées	Cellules ovales et solitaires la plupart du temps	Bâtonnets	Chaînes de cellules ovales	Bâtonnets
Dimension (L x l) µm	8-14 x 2-3	7-15 x 3-12	7.1x3.7	4.5x3	6x1
Volume cellulaire (µm ³ /cellule)	40-60 ¹	60-80 ¹	40-50 ¹	30-40 ¹	2.5 ²
Poids sec des cellules (mg/cellule)	2-3x10 ⁻⁸	3-4x10 ⁻⁸	3-4x10 ⁻⁸	1-2x10 ⁻⁸	2-3x10 ⁻⁹
Taux de croissance ³ (jour ⁻¹)	1.5 – 1.7	1.2-1.5	1.4	1.1-1.4	2.0 – 2.4

¹ Mesuré avec un compteur électronique de particules

² Calculé d'après la taille

³ Taux de croissance le plus souvent observé dans le milieu de l'OCDE sous une intensité lumineuse approximative de 70 µE·m⁻²·s⁻¹ et à 21 °C.

Recommandations particulières pour la culture et la manipulation des espèces d'essai recommandées*Pseudokirchneriella subcapitata et Desmodesmus subspicatus*

Ces algues vertes sont généralement faciles à cultiver dans différents milieux de culture. Les collections de cultures renseignent les utilisateurs sur les milieux appropriés. Ces cellules sont normalement solitaires et la densité cellulaire se mesure aisément à l'aide d'un compteur électronique de particules ou d'un microscope.

Anabaena flos-aquae

La culture mère se conserve dans divers milieux de croissance. Il importe particulièrement d'éviter que le lot de culture ait dépassé la phase exponentielle de croissance au moment du renouvellement, le rétablissement étant difficile à ce stade.

Anabaena flos-aquae forme des chaînes de cellules enroulées en pelotes (agrégats). La dimension de ces agrégats est susceptible de varier en fonction des conditions de culture. Il peut s'avérer nécessaire de dissocier ces agrégats pour compter les cellules au microscope ou avec un compteur électronique de particules, afin de déterminer la biomasse.

Les chaînes de sous-échantillons peuvent être rompues en différents points par sonication, afin de réduire la variabilité lors du comptage. Une sonication plus longue que celle requise pour couper les chaînes en petits segments risque de détruire les cellules. L'intensité et la durée de la sonication doivent être identiques pour chaque traitement.

On dénombrera suffisamment de champs sur l'hémocytomètre (au moins 400 cellules) afin de compenser la variabilité. Cela augmentera la fiabilité des déterminations de la densité au microscope.

Après le découpage des chaînes de cellules par une sonication menée délicatement, le volume cellulaire total d'*Anabaena* peut être déterminé avec un compteur électronique de particules. Il convient de régler l'énergie de la sonication de façon à éviter de briser les cellules.

Utiliser un mélangeur à vortex ou un instrument analogue pour s'assurer que la suspension d'algues utilisée pour ensemercer les récipients d'essai est bien mélangée et homogène.

Les récipients d'essai doivent être placés sur une table agitée et animée d'un mouvement orbital ou de va-et-vient à environ 150 tours par minute. Les *Anabaena* peuvent également être agitées par intermittences de façon à former moins d'agrégats. Si elles s'agrègent, on veillera soigneusement à prélever des échantillons représentatifs pour les mesures de biomasse. Une agitation vigoureuse avant le prélèvement peut être nécessaire pour désagréger les agrégats d'algues.

Synechococcus leopoliensis

La culture mère se conserve dans divers milieux de croissance. Les collections de cultures renseignent les utilisateurs sur les milieux appropriés.

Synechococcus leopoliensis croît en formant des bâtonnets solitaires. La très petite dimension des cellules rend difficile le comptage au microscope pour les mesures de biomasse. Dans ce cas, il est utile de disposer d'un compteur électronique capable de dénombrer des particules mesurant jusqu'à 1 µm. Une mesure par fluorométrie *in vitro* convient également.

Navicula pelliculosa

La culture mère se conserve dans divers milieux de croissance. Les collections de cultures renseignent les utilisateurs sur les milieux appropriés. Ici, le milieu doit être additionné de silicate.

Navicula pelliculosa peut former des agrégats dans certaines conditions de culture. À cause de leur production lipidique, les cellules algales tendent parfois à s'accumuler dans le film qui se forme à la surface. Si tel est le cas, des mesures spéciales accompagneront le prélèvement de sous-échantillons en vue de la détermination de la biomasse, afin d'assurer la représentativité des échantillons. Une agitation vigoureuse, par exemple au moyen d'un mélangeur à vortex, peut être nécessaire.

ANNEXE 3**MILIEUX DE CROISSANCE**

L'un des deux milieux de croissance suivants peut être utilisé :

Milieu de l'OCDE : milieu de la première version de la Ligne directrice 201 de l'OCDE, conforme à la norme ISO 8692

Milieu AAP de l'Agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (US EPA), conforme à l'ASTM.

Ces milieux doivent être préparés avec des produits de qualité "réactif" ou "pour analyse" et de l'eau désionisée.

Composition du milieu AAP (US EPA) et du milieu de la LD 201 de l'OCDE

Ingrédient	US EPA		OCDE	
	mg/L	mM	mg/L	mM
NaHCO ₃	15,0	0,179	50,0	0,595
NaNO ₃	25,5	0,300		
NH ₄ Cl			15,0	0,280
MgCl ₂ ·6(H ₂ O)	12,16	0,0598	12,0	0,0590
CaCl ₂ ·2(H ₂ O)	4,41	0,0300	18,0	0,122
MgSO ₄ ·7(H ₂ O)	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K ₂ HPO ₄	1,044	0,00599		
KH ₂ PO ₄			1,60	0,00919
FeCl ₃ ·6(H ₂ O)	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
Na ₂ EDTA·2(H ₂ O)	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H ₃ BO ₃	0,186	0,00300	0,185	0,00299
MnCl ₂ ·4(H ₂ O)	0,415	0,00201	0,415	0,00210
ZnCl ₂	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
CoCl ₂ ·6(H ₂ O)	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
Na ₂ MoO ₄ ·2(H ₂ O)	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
CuCl ₂ ·2(H ₂ O)	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

- Le rapport molaire de l'EDTA sur le fer est légèrement supérieur à l'unité. Cela empêche le fer de précipiter et réduit en même temps au minimum la chélation des ions de métaux lourds.

Dans l'essai mené sur la diatomée *Navicula pelliculosa*, les deux milieux doivent être additionnés de $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, afin d'atteindre une concentration de 1,4 mg de Si/L.

Le pH du milieu est obtenu à l'équilibre entre le système carbonate du milieu et la pression partielle de CO_2 dans l'air atmosphérique. Le pH à 25 °C et la concentration molaire de bicarbonate sont liés approximativement par l'équation suivante :

$$\text{pH}_{\text{éq}} = 11,30 + \log [\text{HCO}_3^-]$$

Avec 15 mg/L de NaHCO_3 , le $\text{pH}_{\text{éq}} = 7,5$ (milieu de l'US EPA) et avec 50 mg/L de NaHCO_3 , le $\text{pH}_{\text{éq}} = 8,1$ (milieu de l'OCDE)

Composition élémentaire du milieu d'essai

Élément	US EPA mg/L	OCDE mg/L
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Préparation du milieu de l'OCDE

Élément nutritif	Concentration dans la solution mère
Solution mère 1 : macroéléments	
NH ₄ Cl	1,5 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g/L
KH ₂ PO ₄	0,16 g/L
Solution mère 2 : fer	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	64 mg/L
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 mg/L
Solution mère 3 : oligoéléments	
H ₃ BO ₃	185 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg/L
ZnCl ₂	3 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg/L
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg/L
Solution mère 4 : bicarbonate	
NaHCO ₃	50 g/L
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	

Stériliser les solutions mères par filtration sur membrane (diamètre moyen des pores : 0,2 µm) ou à l'autoclave (15 minutes à 120 °C). Stocker les solutions à l'obscurité et à 4 °C.

Ne pas autoclaver les solutions mères 2 et 4 mais les stériliser par filtration sur membrane.

Préparer le milieu de croissance en ajoutant un volume approprié des solutions mères 1 à 4 à de l'eau :

Ajouter à 500 ml d'eau stérilisée :

- 10 ml de solution mère 1
- 1 ml de solution mère 2
- 1 ml de solution mère 3
- 1 ml de solution mère 4

Porter à 1 000 mL avec de l'eau stérilisée.

Attendre que le milieu atteigne l'équilibre avec le CO₂ atmosphérique, si nécessaire, en y faisant barboter de l'air stérile et filtré durant quelques heures.

Préparation du milieu de l'U.S. EPA

1. Ajouter 1 mL de chaque solution mère 2.1–2.7 à environ 900 mL d'eau désionisée ou distillée, et porter le volume à 1 litre.

2. Préparer les solutions mères de macroéléments en dissolvant les composés suivants dans 500 ml d'eau désionisée ou distillée. Les réactifs 2.1, 2.2, 2.3 et 2.4 peuvent être combinés dans une seule solution mère.

- 2.1 $NaNO_3$ —12,750 g.
- 2.2 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ —6,082 g.
- 2.3 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ —2,205 g.
- 2.4 Solution mère d'oligoéléments (voir 3)
- 2.5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ —7,350 g.
- 2.6 K_2HPO_4 —0,522 g.
- 2.7 $NaHCO_3$ —7,500 g.
- 2.8 $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ —Voir Note 1.

NOTE 1 : À n'utiliser que pour les diatomées. Peut être ajouté directement (202,4 mg) ou véhiculé dans une solution mère pour donner une concentration finale de 20 mg/L en Si dans le milieu.

3. Préparer la solution mère d'oligoéléments en dissolvant les composés suivants dans 500 ml d'eau désionisée ou distillée :

- 3.1 H_3BO_3 —92,760 mg.
- 3.2 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ —207,690 mg.
- 3.3 $ZnCl_2$ —1,635 mg.
- 3.4 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ —79,880 mg.
- 3.5 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ —0,714 mg.
- 3.6 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ —3,630 mg.
- 3.7 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ —0,006 mg.
- 3.8 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ —150,000 mg. [Ethylènedinitrilotétraacétate de sodium].
- 3.9 $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ —0,005 mg. Voir Note 2.

NOTE 2 : À n'utiliser que dans le milieu pour les substances mères des diatomées.

4. Ajuster le pH à $7,5 \pm 0,1$ avec du NaOH ou de l'HCl 0,1 N ou 1,0 N.

5. Filtrer le milieu dans un récipient stérile sur un filtre à membrane à pores de 0,22 μm , si l'on utilise un compteur de particules, ou sur un filtre à pores de 0,45 μm , si l'on n'utilise pas de compteur de particules.

6. Garder le milieu à l'obscurité, à environ 4 °C jusqu'à son utilisation.

ANNEXE 4**EXEMPLE DE MÉTHODE DE CULTURE DES ALGUES****Observations générales**

La méthode suivante s'applique à la culture des algues destinées aux essais de toxicité.

Il convient d'utiliser des méthodes préservant les cultures d'algues de toute contamination bactérienne. Il peut être souhaitable d'établir des cultures axéniques, mais il faut employer des cultures unialgales.

Toutes les opérations doivent être conduites dans des conditions stériles, afin d'éviter toute contamination par des bactéries ou d'autres algues.

Matériel

Voir à la section «appareillage» de cette Ligne directrice.

Procédé d'obtention de cultures d'algues***Préparation de solutions nutritives (milieu) :***

Tous les sels minéraux du milieu sont préparés sous la forme de solutions mères concentrées et entreposées au frais et à l'abri de la lumière. Ces solutions sont stérilisées par filtration ou à l'autoclave.

On prépare le milieu en ajoutant une quantité correcte de solution mère à de l'eau distillée stérile, en prenant bien soin d'éviter tout risque d'infection. Pour les milieux solides, on ajoute 0,8% d'agar.

Culture mère :

Les cultures mères qui servent de matériau d'essai initial sont de petites cultures d'algues régulièrement transférées dans un milieu frais. Si les cultures ne sont pas utilisées régulièrement, il convient de les étaler en stries dans des tubes inclinés remplis d'agar. Ces cultures sont transférées dans un milieu frais au moins une fois tous les deux mois.

Les cultures mères sont cultivées dans des erlenmeyers contenant le milieu approprié (volume de quelque 100 ml). Lorsque les algues sont incubées à 20 °C sous un éclairage permanent, un transfert hebdomadaire s'impose.

Lors du transfert, on transvase avec des pipettes stériles une quantité telle de «vieille» culture, dans un flacon de milieu frais, que, pour les espèces à croissance rapide, la concentration initiale est environ 100 fois inférieure à ce qu'elle était dans la vieille culture.

Le taux de croissance d'une espèce peut être déterminé à partir de la courbe de croissance. S'il est connu, il est possible d'estimer la densité à laquelle la culture doit être introduite dans le nouveau milieu. Il convient de le faire avant que la culture atteigne la phase de mort.

Préculture :

La préculture sert à fournir une quantité d'algues suffisante pour l'ensemencement des cultures d'essai. La préculture est incubée dans les conditions de l'essai et utilisée lorsqu'elle est encore en

croissance exponentielle, normalement après une période d'incubation de 2 à 4 jours. Si les cultures d'algues renferment des cellules déformées ou anormales, il faut éliminer ces cultures.

ANNEXE 5

ANALYSE DES DONNÉES PAR UNE RÉGRESSION NON LINÉAIRE

Considérations générales

L'effet observé dans les essais sur les algues et autres essais sur la croissance de micro-organismes (augmentation de la biomasse) est, par nature, exprimé par une variable continue ou métrique – le rythme d'un processus si l'on utilise le taux de croissance et son intégrale en fonction du temps si on choisit la biomasse. Ces deux variables sont comparées à l'effet moyen correspondant observé sur des témoins non exposés (représentés en plusieurs exemplaires identiques) manifestant un effet maximal dans les conditions imposées, la lumière et la température étant les principaux facteurs déterminants dans l'essai sur les algues. Le système est distribué ou homogène et la biomasse peut être considérée comme un continuum où il est fait abstraction des cellules individuelles. La distribution de la variance du type d'effet d'un tel système ne dépend que des facteurs expérimentaux (décrits généralement par les distributions log-normales ou normales de l'erreur). Et ce, contrairement aux bioessais classiques où les effets sont exprimés par des réponses par tout ou rien pour lesquelles la tolérance (affichant généralement une distribution binomiale) des organismes individuels est souvent supposée être la composante dominante de la variance. Dans ce cas, l'effet relevé chez les témoins est nul ou assimilé à un niveau de fond.

Dans la situation simple, l'effet normalisé ou relatif, r , diminue de façon monotonique de 1 (inhibition nulle) à 0 (inhibition à 100%). Notons que tous les effets ont une erreur associée et qu'il est possible de calculer les inhibitions négatives apparentes en considérant qu'elles résultent uniquement de l'erreur aléatoire.

Analyse de la régression

Modèles

Une analyse de la régression a pour objet de décrire quantitativement la courbe concentration-effet sous la forme d'une fonction mathématique de régression $Y = f(C)$ ou, plus souvent, $F(Z)$ où $Z = \log C$. La fonction inverse, $C = f^{-1}(Y)$ permet de calculer des valeurs de la CE_x , notamment la CE_{50} , CE_{10} et CE_{20} , et leurs limites de confiance à 95%. Plusieurs fonctions mathématiques simples se sont avérées décrire correctement la relation concentration-effet obtenue dans les essais d'inhibition de la croissance des algues. Parmi ces fonctions, citons l'équation logistique, l'équation asymétrique de Weibul et la distribution log-normale, qui sont toutes des courbes sigmoïdes se rapprochant asymptotiquement de zéro pour $C \rightarrow 0$ et de un pour $C \rightarrow \text{infini}$.

L'utilisation de modèles de fonctions de seuil continues (par exemple le modèle de Kooijman pour «l'inhibition de la croissance de la population», Kooijman et al., 1996) constitue une solution récemment proposée, différente des modèles asymptotiques. Ce modèle suppose qu'il n'y a pas d'effet aux concentrations inférieures à un certain seuil, CE_{0+} , estimé par une extrapolation de la relation concentration-effet consistant à intercepter l'axe des concentrations à l'aide d'une fonction continue simple non différentiable au point de départ.

Notons que l'analyse peut être une simple minimisation des sommes des carrés résiduels (en supposant que la variance est constante) ou des carrés pondérés si l'hétérogénéité de la variance est compensée.

Marche à suivre

Sélectionner une équation fonctionnelle appropriée, $Y = f(C)$, et l'ajuster aux données par une régression non linéaire. Utiliser de préférence les mesures relevées dans chaque flacon, plutôt que les moyennes des expériences identiques, afin de tirer un maximum d'informations des données. D'un autre côté, si la variance est élevée, l'expérience pratique nous porte à croire que les moyennes des expériences identiques peuvent fournir une estimation mathématique plus solide, moins influencée par les erreurs systématiques des données, que chaque donnée prise individuellement.

Porter sur un graphique les valeurs mesurées et la courbe ajustée et vérifier si l'ajustement est valable. L'analyse des valeurs résiduelles peut être particulièrement utile à ce propos. Si la fonction choisie pour ajuster la courbe concentration-effet ne décrit pas bien l'ensemble de la courbe ou une partie essentielle de celle-ci, telle que les effets aux faibles concentrations, choisir un autre modèle d'ajustement, par exemple une courbe asymétrique, telle que la fonction de Weibul, à la place d'une fonction symétrique. Les inhibitions négatives peuvent poser un problème, par exemple avec la fonction de distribution log-normale, qui nécessitera, de la même manière, la recherche d'une autre fonction de régression. Il est déconseillé d'assigner une valeur nulle ou une faible valeur positive à ces valeurs négatives parce que cela déforme la distribution des erreurs. Il peut être utile de procéder à des ajustements séparés sur des portions de la courbe telles que celle où l'inhibition est faible, afin d'estimer les valeurs de CE_x faibles. En partant de l'équation ajustée (par «estimation inverse», $C = f^{-1}(Y)$), calculer des estimations ponctuelles caractéristiques des CE_x et rapporter au moins la CE_{50} et une ou deux CE_x faibles. La pratique des essais a montré que la précision de l'essai sur les algues permet normalement d'effectuer une estimation raisonnablement précise au seuil de 10% d'inhibition si les points dont on dispose sont en nombre suffisant – à moins qu'une stimulation ne survienne aux faibles concentrations, ce qui créerait une confusion. La précision de l'estimation de la CE_{20} est souvent bien meilleure que celle de la CE_{10} , parce que la CE_{20} se situe généralement sur la partie à peu près linéaire de la courbe concentration-effet centrale. Quelquefois, la CE_{10} peut être difficile à interpréter à cause de la stimulation de la croissance. De sorte que, même si la CE_{10} s'obtient généralement avec une précision suffisante, il est toujours recommandé de mentionner également la CE_{20} .

Facteurs de pondération

En général, la variance expérimentale n'est pas constante et inclut une composante proportionnelle, d'où l'intérêt de procéder d'office à une régression pondérée. Les facteurs de pondération s'appliquant à une telle analyse sont normalement supposés être inversement proportionnels à la variance :

$$W_i = 1/\text{Var}(r_i)$$

De nombreux programmes de régression permettent d'effectuer une analyse de la régression pondérée avec des facteurs de pondération repris dans un tableau. Pour se simplifier la tâche, il faudrait normaliser les facteurs de pondération en les multipliant par $n/\sum w_i$ (n étant le nombre de données) de telle sorte que leur somme soit égale à un.

Normalisation des valeurs prises par les effets

La normalisation par la valeur moyenne de l'effet sur les témoins donne lieu à certains problèmes de principe et à une structure de variance plutôt compliquée. En divisant les valeurs par la valeur moyenne des témoins en vue d'obtenir le pourcentage d'inhibition, on introduit une erreur supplémentaire due à l'erreur sur la moyenne des témoins. À moins que cette erreur soit négligeable, les facteurs de pondération appliqués à la régression et les limites de confiance doivent être corrigés en fonction de la covariance avec

le témoin (Draper and Smith, 1981). Notons qu'il est important d'obtenir une précision élevée pour la moyenne estimée des valeurs affichées par les témoins, afin de minimiser la variance globale de l'effet relatif. Cette variance se calcule comme suit (l'indice i se réfère au niveau de concentration i et l'indice 0 aux témoins) :

$$Y_i = \text{effet relatif} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

$$\text{avec une variance } \text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + ((\partial Y_i / \partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0))$$

$$\text{et comme } (\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0 \text{ et } (\partial Y_i / \partial r_0) = -r_i/r_0^2$$

$$\text{avec des données à distribution normale et des expériences identiques } m_i \text{ et } m_0 : \text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

la variance totale de l'effet relatif Y_i devient donc

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

L'erreur sur la moyenne du témoin est inversement proportionnelle à la racine carrée du nombre d'expériences identiques du témoin prises en compte dans la moyenne, et il est quelquefois justifié d'inclure des données antérieures, ce qui réduit considérablement l'erreur. Il est également possible de ne pas normaliser les données ni d'ajuster les effets absolus, y compris l'effet affiché par le témoin, mais d'introduire la valeur de l'effet prise par le témoin en tant que paramètre supplémentaire à ajuster par une régression non linéaire. Avec une équation de régression ordinaire à deux paramètres, cette méthode requiert l'ajustement de trois paramètres et demande, par conséquent, plus de points qu'une régression non linéaire pratiquée sur des données normalisées à l'aide d'une valeur de l'effet prise par le témoin déterminée à l'avance.

Intervalles de confiance inverses

Le calcul des intervalles de confiance d'une régression non linéaire par une estimation inverse est assez complexe et ne figure généralement pas parmi les options livrées avec les programmes courants de calcul statistique. Des limites de confiance approximatives peuvent être obtenues avec des programmes classiques de régression non linéaire, à l'aide d'une reparamétrisation (Bruce et Versteeg, 1992), consistant à reformuler l'équation mathématique en prenant les estimations ponctuelles désirées, par exemple la CE_{10} et la CE_{50} , comme paramètres à estimer (Soit la fonction $I = f(\alpha, \beta, \text{concentration})$, utilisons les relations de définition $f(\alpha, \beta, CE_{10}) = 0,1$ et $f(\alpha, \beta, CE_{50}) = 0,5$ pour remplacer $f(\alpha, \beta, \text{concentration})$ par une fonction équivalente $g(CE_{10}, CE_{50}, \text{concentration})$).

Il existe un calcul plus direct (Andersen et al., 1998) effectué en conservant l'équation d'origine et en appliquant une expansion de Taylor autour des moyennes de r_i et r_0 .

Les procédés par bootstrap, introduits récemment, sont appréciés. Ces procédés utilisent les données mesurées et un rééchantillonnage fréquent dirigé par un générateur de nombre aléatoire, pour estimer une distribution empirique de la variance.

Références :

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J.(1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data.. *Env. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.