

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

Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie

INTRODUCTION

1. Les essais effectués sur les poissons au cours des premiers stades de leur vie sont destinés à déterminer les effets létaux et sublétaux des produits chimiques sur les stades de développement des espèces étudiées. Ils fournissent des informations précieuses pour l'évaluation des effets létaux et sublétaux chroniques de tel ou tel produit chimique sur d'autres espèces de poisson.
2. Cette ligne directrice 210, basée sur une proposition du Royaume-Uni qui a été examinée lors d'une réunion d'experts de l'OCDE tenue à Medmenham (Royaume-Uni) en novembre 1988, a été mise à jour en 2013 pour rendre compte de l'expérience de son utilisation et des recommandations formulées lors d'un atelier de l'OCDE sur les essais de toxicité pour les poissons qui s'est tenu en septembre 2010 (1).

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Les poissons aux premiers stades de leur vie sont exposés à une série de concentrations du produit chimique testé dissout dans l'eau. On privilégie des conditions dynamiques ; à défaut, des conditions semi-statiques sont néanmoins acceptables. Pour de plus amples informations, le document d'orientation de l'OCDE No. 23 sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges « difficiles » devrait être consulté (2). Au début de l'essai, les œufs fécondés sont placés dans des enceintes expérimentales ; la durée de l'essai est variable selon les espèces, car elle est déterminée en fonction du temps nécessaire pour que les poissons témoins atteignent le stade de développement juvénile. Les effets létaux et sublétaux sont évalués et comparés aux valeurs des témoins, en vue de déterminer la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et d'en déduire i) la concentration sans effet observé (CSEO) et/ou ii) la CE_x (par exemple CE_{10} , CE_{20}) à l'aide d'un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une modification de x % de l'effet mesuré. Les concentrations expérimentales doivent couvrir la CE_x de façon à ce que la CE_x soit interpolée plutôt qu'extrapolée (voir les définitions à l'annexe 1).

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE TESTÉ

4. Le produit chimique testé désigne le produit soumis à l'essai. La solubilité dans l'eau (voir LD 105) et la pression de vapeur (voir LD 104) du produit chimique testé doivent être connues et il faut pouvoir disposer, pour doser le produit chimique dans les solutions d'essai, d'une méthode d'analyse fiable dont la précision et le seuil de détection sont connus. Bien qu'ils ne soient pas nécessaires pour mener l'essai, les résultats d'un essai de toxicité aiguë (voir la LD 203, ou la LD 236), effectué de préférence sur les mêmes espèces que celles sélectionnées pour le présent essai, peuvent être une source d'information précieuse.
5. Si la Ligne Directrice est utilisée pour tester un mélange, sa composition devrait être déterminée dans la mesure du possible, p.ex. par l'identité chimique de ses constituants, leur présence et quantité, ainsi que leur propriétés spécifiques (telles que mentionnées au paragraphe précédent). Avant d'utiliser la Ligne Directrice pour tester un mélange à des fins réglementaires, il convient de vérifier si les résultats seront acceptables dans le cadre réglementaire imposé.

6. Les informations suivantes sont utiles : formule structurale, pureté du produit chimique, solubilité dans l'eau, stabilité dans l'eau et à la lumière, pK_a , $P_{o/e}$ et résultats d'un essai de biodégradabilité facile (LD 301 ou la LD310, par exemple).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

7. Pour qu'un essai soit valable, les conditions suivantes doivent être satisfaites :

- la concentration d'oxygène dissous doit être $> 60 \%$ de la valeur de saturation en air tout au long de l'essai ;
- à aucun moment au cours de l'essai, la température de l'eau ne doit varier de plus de $\pm 1.5^\circ\text{C}$ entre les différentes enceintes expérimentales ou entre deux jours consécutifs, et elle doit être maintenue dans la gamme spécifiée pour l'espèce soumise à l'essai (annexe 2) ;
- le dosage analytique des concentrations expérimentales est obligatoire.
- le taux de survie des œufs fécondés et après éclosion dans les groupes témoins, y compris, s'il y a lieu, dans les témoins contenant le solvant, doit être supérieur ou égal aux valeurs limites définies à l'annexe 2.

8. En cas d'observation d'une légère déviation par rapport aux critères de validité de l'essai, les conséquences doivent être considérées en fonction de la fiabilité des données, et ces considérations doivent être notées dans le rapport d'essai. Les effets sur la survie, l'éclosion ou la croissance observés dans l'enceinte témoin contenant le solvant, après comparaison avec le témoin négatif, doivent être notés dans le rapport et discutés dans le contexte de la fiabilité des données d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Enceintes expérimentales

9. On peut utiliser tout récipient en verre, acier inoxydable ou autre matériau chimiquement inerte. Le silicone étant connu pour sa bonne capacité d'absorption des substances lipophiles, l'usage de tubes en silicone dans les essais dynamiques et celui de joints en silicone au contact de l'eau doivent être tempérés par le choix d'aquariums en verre monoblocs, par exemple. Le récipient doit avoir des dimensions suffisantes pour permettre une croissance correcte dans l'enceinte témoin, le maintien de la concentration d'oxygène dissous (pour les espèces de petite taille, on utilisera, par exemple, un récipient d'une contenance de 7 L) et le respect du critère du taux de charge énoncé au paragraphe 19. Il est souhaitable de disposer les enceintes expérimentales selon un schéma aléatoire, de préférence par bloc, chaque traitement étant représenté dans chaque bloc, plutôt que de façon complètement aléatoire. Les enceintes expérimentales doivent être protégées de toute perturbation indésirable. Le système d'essai doit de préférence intégrer des concentrations du produit chimique testé qui permettent, sur une durée suffisamment longue, de démontrer la stabilité des concentrations d'exposition avant l'introduction des organismes expérimentaux.

Choix des espèces

10. Les espèces de poissons recommandées sont énumérées dans le tableau 1. Ceci n'exclut pas l'utilisation d'autres espèces, mais il se peut que la méthode d'essai nécessite d'être adaptée afin d'offrir des conditions d'essai convenables. Dans ce cas, il faut justifier le choix de l'espèce et exposer la méthode expérimentale.

Soin des poissons géniteurs

11. On pourra trouver à l'annexe 3 et dans les références citées (3) (4) (5) des détails sur la façon de maintenir les poissons géniteurs dans des conditions satisfaisantes.

Manipulation des œufs fécondés, des embryons et des larves

12. Au départ, les œufs fécondés, les embryons et les larves peuvent être exposés à l'intérieur de la cuve principale dans des récipients plus petits en verre ou en acier inoxydable pourvus de côtés ou d'extrémités en filet permettant à la solution d'essai de traverser le récipient. Il est possible d'induire un écoulement non turbulent à travers ces petits récipients en les suspendant à un bras disposé de façon à déplacer le récipient verticalement mais en gardant toujours les organismes submergés. Les œufs fécondés des salmonidés peuvent être posés sur des supports ou des grilles ayant des ouvertures suffisantes pour permettre aux larves de passer au travers après l'éclosion.

13. Quand on utilise des récipients, des grilles ou des filets pour maintenir les œufs à l'intérieur de la cuve principale, ces dispositifs doivent être enlevés après l'éclosion des larves, conformément aux instructions données à l'annexe 3, sauf si ces filets sont destinés à empêcher les larves de s'échapper. En cas de transfert nécessaire des larves, il ne faut ni les exposer à l'air ni utiliser de filet pour les faire sortir des récipients contenant les œufs. Le moment de ce transfert varie avec l'espèce et doit être signalé dans le rapport. Toutefois, le transfert n'est pas toujours nécessaire.

Eau

14. On utilise une eau dans laquelle l'espèce soumise à l'essai présente des taux adéquats de croissance et de survie à long terme (voir annexe 4). Sa qualité doit demeurer constante pendant toute la durée de l'essai. Pour s'assurer que l'eau de dilution ne puisse pas influencer sur le résultat de l'essai (par complexation du produit chimique testé, par exemple) ou avoir des effets néfastes sur la performance des poissons géniteurs, on prélèvera des échantillons à différents intervalles pour analyse. Le dosage des métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, etc.), des principaux anions et cations (Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄, etc.), de l'ammoniac, des pesticides organochlorés résiduels totaux, du carbone organique total et des solides en suspension sera effectué tous les six mois, par exemple, pour une eau de dilution dont on sait que sa qualité est relativement constante. Si l'on sait que la qualité de l'eau est variable, on augmentera la fréquence des dosages, qui dépendra de la variabilité de la qualité de l'eau. Certaines caractéristiques chimiques requises pour une eau de dilution acceptable sont énumérées à l'annexe 4.

Solutions d'essai

15. Les essais dynamiques requièrent un système qui délivre et dilue en continu une solution mère du produit chimique testé (par exemple une pompe doseuse, un diluteur proportionnel, un système de saturation) afin d'obtenir une série de concentrations dans les enceintes d'essai. Pendant l'essai, on doit vérifier à intervalles réguliers le débit des solutions-mères et de l'eau de dilution ; ceux-ci ne doivent pas varier de plus de 10 % pendant toute la durée de l'essai. Un débit équivalent à au moins cinq volumes d'enceintes expérimentales par 24 heures s'est avéré adéquat (3). Toutefois, si le taux de charge indiqué au paragraphe 18 est respecté, on peut tolérer un débit plus faible, équivalant à 2 ou 3 volumes d'enceintes expérimentales, pour empêcher l'évacuation trop rapide de la nourriture.

16. Des solutions d'essai sont ajustées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. La solution mère est, de préférence, préparée par simple mélange ou agitation du produit chimique testé dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (agitation et/ou ultrasons, par exemple). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) ou des méthodes de dosage passif (6) peuvent être utilisées pour réaliser une solution mère de concentration adéquate. L'emploi d'un solvant véhicule n'est pas recommandé mais

peut s'avérer nécessaire. Dans ce cas, il faut tester en parallèle une cuve témoin contenant la même concentration de solvant que les cuves contenant le produit chimique testé; en d'autres termes, il est préférable que la concentration de solvant des cuves contenant le produit chimique testé et celle de la cuve contenant le solvant soient identiques. Cela peut se révéler difficile techniquement avec certains systèmes de dilution ; dans ce cas, la concentration de solvant de la cuve contenant le témoin pour le solvant doit être égale à la concentration de solvant la plus élevée dans le groupe de traitement. Pour les substances difficiles à tester, le document d'orientation de l'OCDE No. 23 sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges « difficiles » devra être consulté (2). Si l'option du solvant est néanmoins retenue, le choix du solvant sera guidé par les propriétés chimiques du produit chimique testé concerné. Le document d'orientation de l'OCDE No. 23 recommande de ne pas dépasser une concentration de 100 µl/L. Pour éviter que le solvant puisse avoir une incidence sur les effets mesurés (7), il est recommandé de choisir une concentration aussi faible que possible.

17. Si l'on opte pour un essai semi-statique, on peut utiliser deux méthodes différentes de renouvellement du milieu. Soit on prépare de nouvelles solutions d'essai dans des récipients propres et on transfère avec précaution les œufs et les larves survivants dans les nouveaux récipients, soit on maintient les organismes d'essai dans les récipients expérimentaux tout en changeant une partie (au moins les deux tiers) de la solution d'essai / du témoin.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition

Durée

18. L'essai doit démarrer dès que possible après la fécondation des œufs, qui sont de préférence immergés dans les solutions d'essai avant que la division du blastodisque ne commence ou aussi tôt que possible après ce stade. La durée de l'essai dépendra de l'espèce utilisée. Certaines durées sont recommandées à l'annexe 2.

Charge

19. Le nombre d'œufs fécondés au début de l'essai doit être suffisant pour répondre aux critères statistiques. Les œufs doivent être répartis au hasard dans les différents groupes de traitement. Pour chaque concentration, on doit utiliser au moins 80 œufs, répartis de façon égale entre au moins quatre enceintes d'essai identiques. Le taux de charge (la biomasse par volume de solution d'essai) doit être suffisamment faible pour que la concentration d'oxygène dissous puisse être maintenue sans aération à au moins 60 % de la valeur de saturation en air durant les stades embryonnaire et larvaire. Dans le cas des essais dynamiques, un taux de charge n'excédant pas 0.5 g/L (poids humide) par 24 heures et ne dépassant pas 5 g/L de solution à tout moment a été recommandé (3).

Lumière et température

20. La photopériode et la température de l'eau doivent être adaptées à l'espèce testée (voir annexe 2).

Alimentation

21. La nourriture et l'alimentation sont des points critiques, et pour chaque stade de développement, il est primordial de fournir la nourriture appropriée à partir d'un moment déterminé et dans des quantités suffisantes pour que la croissance soit normale. L'alimentation doit être à peu près identique dans tous les réplicats à moins d'un ajustement tenant compte de la mortalité. Les aliments non consommés ainsi que les excréta doivent être retirés quand cela s'avère nécessaire afin d'éviter l'accumulation de déchets. Des

régimes alimentaires détaillés sont proposés à l'annexe 3 mais, avec l'expérience, la nourriture et les régimes alimentaires sont continuellement améliorés afin d'augmenter le taux de survie et d'optimiser la croissance. Les petits crustacés vivants enrichissent l'environnement et devraient donc remplacer la nourriture congelée ou déshydratée ou bien compléter ce régime alimentaire, à condition qu'ils conviennent à l'espèce et au stade de développement concernés.

Concentrations d'essai

22. Normalement, cinq concentrations du produit chimique testé (quatre réplicats minimum par concentration) espacées par un facteur constant ne dépassant pas 3.2 sont nécessaires. Les données disponibles sur la toxicité aiguë, obtenues de préférence à partir d'essais sur les mêmes espèces et/ou d'un essai de détermination de l'ordre de grandeur, devront être prises en considération (1) pour délimiter la gamme des concentrations d'essai. Cependant, toutes les sources d'informations devraient être prises en compte lors de la sélection des concentrations d'essai, y compris des données de substitution, des données issues d'essais de toxicité aiguës sur des embryons de poissons, etc. Un essai limite, ou un essai limite prolongé, impliquant moins de cinq concentrations comme l'essai proprement dit, peut être acceptable si l'on cherche à établir les CSEO de façon empirique uniquement. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. Il n'est pas nécessaire de tester les concentrations au-delà de la CL_{50} après 96 heures ou de 10 mg/L si la CL_{50} est supérieure à cette concentration.

Témoins

23. Outre la série de concentrations du produit chimique testé, on utilisera une cuve témoin contenant de l'eau de dilution et éventuellement, si nécessaire, une cuve témoin contenant uniquement le solvant véhiculé (voir paragraphe 16).

Fréquence des dosages analytiques et des mesures

24. Avant le début de la période d'exposition, le bon fonctionnement du système de distribution du produit chimique testé dans tous les réplicats doit être vérifié (par dosage des concentrations d'essai, par exemple). Les méthodes analytiques nécessaires doivent être établies, y compris une limite de quantification (LDQ) appropriée et des connaissances suffisantes sur la stabilité du produit chimique testé dans le système d'essai. Pendant l'essai, le dosage des concentrations du produit chimique testé est effectué à intervalles réguliers, l'objectif étant de caractériser l'exposition. Il est nécessaire de faire au moins cinq dosages. Si l'on utilise un système dynamique, on procède au moins une fois par semaine à des dosages analytiques du produit chimique testé à raison d'un réplicat par concentration, en changeant systématiquement d'échantillon. Le fait de procéder à des dosages analytiques supplémentaires permettra souvent d'améliorer la qualité des résultats. On pourra être amené à filtrer les échantillons (avec des pores de 0.45 μm , par exemple) ou à les centrifuger pour éliminer les particules en suspension et s'assurer que les dosages se réfèrent aux concentrations du produit chimique testé en solution vraie. Afin de réduire l'adsorption du produit chimique testé, les filtres doivent être saturés avant usage. Lorsque les concentrations ne sont pas maintenues dans un intervalle de 80-120 % de la concentration nominale, les concentrations avec effet doivent être dosées et exprimées par rapport à la moyenne arithmétique des concentrations dans le cas des essais dynamiques tandis qu'elles doivent être exprimées par rapport à la moyenne géométrique des concentrations mesurées dans le cas des essais semi-statiques ; pour de plus amples informations, voir le chapitre 5 du document d'orientation de l'OCDE No. 23 sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges « difficiles » (2).

25. Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le pH et la température doivent être mesurés dans toutes les cuves d'essai au moins une fois par semaine ; si nécessaire, la salinité et la dureté doivent quant à elles être mesurées au début et à la fin de l'essai. Il est préférable de surveiller la température en continu dans au

moins une cuve d'essai.

Observations

26. **Stade du développement embryonnaire** : on doit vérifier aussi précisément que possible le stade embryonnaire au début de l'exposition au produit chimique testé. Ceci peut se faire en utilisant un échantillon représentatif d'œufs convenablement conservés et rendus translucides.

27. **Éclosion et survie** : il faut observer et dénombrer les éclosions et les survivants au moins une fois par jour. Si l'on observe la présence d'œufs moisies au début du stade de développement embryonnaire (le 1^{er} ou le 2^e jour de l'essai, par exemple), il faut compter et retirer les œufs en question. Les embryons, larves et juvéniles morts doivent être enlevés dès qu'ils sont repérés, car ils peuvent se décomposer rapidement et être mis en morceaux par les autres poissons. En retirant les individus morts, il convient d'être extrêmement attentif à ne pas léser physiquement les œufs et les larves adjacents. Les signes de mort varient selon les espèces et les stades de développement. Par exemple :

- pour les œufs fécondés : en particulier au début de leur cycle, une diminution marquée de la transparence et un changement de coloration, dus à la coagulation et/ou à la précipitation de protéines et conduisant à un aspect blanc opaque ;
- pour les embryons, larves et juvéniles : immobilité et/ou absence de mouvement respiratoire et/ou absence de battement du cœur et/ou absence de réaction aux stimulations mécaniques.

28. **Apparence anormale** : on doit noter le nombre de larves et de juvéniles présentant une anomalie corporelle, à des intervalles de temps adéquats qui dépendent de la durée de l'essai et de la nature de l'anomalie décrite. Notons que, chez les larves et les juvéniles, l'anormalité est un phénomène naturel pouvant toucher de l'ordre de plusieurs pour cents des individus dans le(s) témoin(s) de certaines espèces. En cas de malformations et donc d'apparence anormale telles que l'organisme est en état de souffrance considérable et irréversible, l'organisme peut être retiré de l'essai. Les animaux concernés doivent être euthanasiés et comptabilisés comme morts aux fins de l'analyse statistique ultérieure. Le développement embryonnaire normal a été décrit pour la plupart des espèces recommandées dans la présente Ligne directrice (9) (10) (11) (12).

29. **Comportement anormal** : des anomalies telles qu'une hyperventilation, une nage mal coordonnée et une immobilité ou un comportement alimentaire atypiques doivent être notées à des intervalles de temps adéquats, qui dépendent de la durée de l'expérience (une fois par jour pour les poissons d'eaux chaudes, par exemple). Ces effets, bien que difficiles à chiffrer, peuvent, lorsqu'ils sont observés, contribuer à l'interprétation des résultats de mortalité.

30. **Poids** : à la fin de l'essai, tous les poissons ayant survécu dans chaque réplicat sont pesés (on note le nombre d'animaux présents dans le réplicat ainsi que le poids moyen par animal) ; il est préférable de noter le poids humide (poissons séchés par tamponnage), mais le poids sec peut également être consigné dans le rapport (13).

31. **Longueur** : à la fin de l'essai, les poissons sont mesurés. Il est recommandé de mesurer leur longueur totale, mais en cas de décomposition de la nageoire caudale ou d'érosion des nageoires, on peut utiliser la longueur standard. On utilisera la même méthode pour tous les poissons d'un essai donné. Les poissons peuvent être mesurés au moyen d'un pied à coulisse, d'un appareil photo numérique, d'un micromètre oculaire étalonné, etc. Les longueurs minimales types sont définies à l'Annexe 2.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

32. Il est recommandé de s'assurer que le protocole d'essai et le test statistique sélectionné aient une puissance suffisante (80 % minimum) pour permettre de déceler les changements d'importance biologique concernant les effets pour lesquels une CSEO doit être rapportée. Si une CE_x doit être rapportée, le protocole d'essai et le modèle de régression sélectionné doivent permettre l'estimation de la CE_x de telle sorte que (i) l'intervalle de confiance à 95 % rapporté pour la CE_x ne contienne pas zéro et ne soit pas trop large, (ii) l'intervalle de confiance à 95 % pour la moyenne prévue à la CE_x ne contienne pas la moyenne des témoins, (iii) le modèle de régression ne présente pas un manque d'ajustement significatif aux données. L'une ou l'autre démarche nécessitent d'identifier la variation en pourcentage de chaque effet qu'il importe de déceler ou d'estimer. Le protocole expérimental doit être conçu pour y parvenir. Lorsque les conditions de dosage de la CE_x décrites ci-dessus ne sont pas remplies, la démarche fondée sur la CSEO doit être utilisée. Il est peu probable que la même variation en pourcentage s'applique à tous les effets observés, et que l'on puisse concevoir une expérience réalisable qui remplisse ces critères pour tous les effets observés, aussi importe-t-il, lors de la conception de l'expérience, de se concentrer sur les effets à mesurer qui sont importants pour cette dernière. Des ordinogrammes d'analyse statistique et des orientations sur chaque démarche figurent aux annexes 5 et 6 ; ces outils aident au traitement des données et permettent de choisir le test ou modèle statistique le plus approprié.

33. Pour analyser les variations à l'intérieur de chaque ensemble de réplicats, il sera nécessaire d'utiliser l'analyse de la variance ou des méthodes avec tableau de contingence ainsi que des méthodes d'analyse statistique appropriées fondées sur cette analyse. Afin d'opérer des comparaisons multiples entre les résultats obtenus pour chaque concentration et ceux obtenus pour les témoins, le test de Jonckheere-Terpstra ou de Williams est recommandé pour les réponses continues ; un test de Cochran-Armitage appliqué de façon régressive est recommandé pour les réponses quantales (tout ou rien) qui correspondent à une relation concentration-réponse monotone et sans preuve de variance extra-binomiale (14). En cas de variance extra-binomiale avérée, il est recommandé d'utiliser le test de Cochran-Armitage modifié par Rao-Scott (15) (16), le test de Williams, le test de Dunnett (après transformation arc-sinus de la racine carrée) ou le test de Jonckheere-Terpstra appliqué à l'échelle des réplicats. Si les données ne correspondent pas à une relation concentration-réponse monotone, il pourra être utile de recourir au test de Dunnett, de Dunn ou de Mann pour les réponses continues et au test exact de Fisher pour les réponses quantales (14) (17) (18). La vigilance s'impose lorsqu'on applique une méthode ou un modèle statistique afin de s'assurer que les exigences liées à la méthode ou au modèle sont satisfaites (exemple : la variabilité d'une enceinte à l'autre est estimée et prise en compte dans le protocole d'essai ainsi que dans le test ou modèle utilisé). La normalité des données doit être évaluée ; l'annexe 5 indique quel traitement doit être réservé aux résidus d'une analyse de la variance (ANOVA). L'annexe 6 traite d'autres considérations relatives à la démarche de régression. Des transformations doivent être envisagées pour respecter les exigences d'un test statistique. Cependant, les transformations visant l'ajustement d'un modèle de régression demandent beaucoup de précaution, sachant que, par exemple, une modification de 25 % de la réponse non transformée ne correspond pas à une modification de 25 % d'une réponse transformée. Dans toutes les analyses, ce n'est pas le poisson mais l'enceinte d'essai qui est l'unité d'analyse et l'unité expérimentale, un fait que les tests paramétriques et la régression devraient faire apparaître (3) (14) (19) (20).

Rapport d'essai

34. Le rapport d'essai contient les informations suivantes :

Produit chimique testé:

Substance mono-constituant :

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

Substance multi-constituants, UVCBs et mélanges :

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

Espèce utilisée :

- nom scientifique, souche, origine, méthode de collecte des œufs fécondés et manipulations ultérieures.

Conditions d'essai :

- méthode utilisée : semi-statique ou dynamique, charge, etc. ;
- photopériode ;
- conception de l'essai : nombre d'enceintes d'essai et de réplicats, nombre d'œufs par réplicat, matériau et dimensions de l'enceinte d'essai (hauteur, largeur, volume), volume d'eau par enceinte d'essai, etc. ;
- méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (l'agent de solubilisation et sa concentration doivent être indiqués, le cas échéant) ;
- méthode de dosage du produit chimique testé: pompes doseuses, systèmes de dilution, etc. ;
- efficacité de récupération de la méthode et concentrations d'essai nominales, limite de quantification, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les cuves d'essai, méthode analytique utilisée et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations du produit chimique testé en solution vraie ;
- caractéristiques de l'eau de dilution : pH, dureté, température, concentration d'oxygène dissous, teneur en chlore résiduel (si mesurée), carbone organique total (si mesuré), solides en suspension (si mesurés), salinité du milieu d'essai (si mesurée) et toute autre mesure effectuée ;
- qualité de l'eau dans les cuves d'essai : pH, dureté, température et concentration d'oxygène dissous ;
- informations détaillées sur l'alimentation : type(s) d'aliment, provenance, quantité donnée, fréquence, etc.

Les résultats sont notés individuellement (ou pour chaque réplicat) sous forme de moyenne et de coefficient de variation, s'il y a lieu, pour les effets suivants :

- preuve que les témoins répondent à la norme d'acceptabilité relative à la survie globale de l'espèce (annexe 2) ;
- données sur la mortalité à chaque stade (embryonnaire, larvaire et juvénile) et la mortalité cumulée ;
- jours des éclosions, nombre quotidien d'œufs éclos, et fin des éclosions ;
- nombre de poissons sains à la fin de l'essai ;
- données sur la longueur (préciser s'il s'agit de la longueur standard ou totale) et le poids des animaux survivants ;
- fréquence et description et nombre d'anomalies morphologiques, s'il y a lieu ;
- fréquence et description et nombre d'effets sur le comportement, s'il y a lieu ;
- approche utilisée pour l'analyse statistique (analyse de régression ou analyse de la variance) et le

- traitement des données (test ou modèle statistique utilisé) ;
- concentration sans effet observé (CSEO) pour chacune des réponses étudiées ;
 - concentration minimale avec effet observé (à $p = 0.05$) (CMEO) pour chacune des réponses étudiées ;
 - CE_x pour chacune des réponses étudiées, le cas échéant, et intervalles de confiance (à 90 % ou 95 %), graphique du modèle ajusté utilisé pour calculer la CE_x , pente de la courbe concentration-réponse, formule du modèle de régression, estimation des paramètres du modèle et de leurs erreurs types.

Tout écart par rapport à la Ligne directrice.

Discussions des résultats, notamment concernant l'influence sur les résultats de l'essai d'un éventuel écart par rapport à la ligne directrice.

TABLEAU 1 : ESPÈCES DE POISSONS RECOMMANDÉES POUR LES ESSAIS

EAU DOUCE	HABITATS ESTUARIENS et MARINS
<u><i>Oncorhynchus mykiss</i></u> Truite arc-en-ciel	<u><i>Cyprinodon variegatus</i></u> Fondule tête de mouton
<u><i>Pimephales promelas</i></u> Tête-de-boule	<u><i>Menidia sp.</i></u> Capucette
<u><i>Danio rerio</i></u> Poisson-zèbre	
<u><i>Oryzias latipes</i></u> Medaka (japonais)	

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et l'évaluation, n° 171, OCDE, Paris.
- (2) OCDE (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et l'évaluation, n° 23, OCDE, Paris.
- (3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88, 26 pp.
- (4) Brauhn, J.L. et R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

- (5) Brungs, W.A. et B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (6) Adolfsson-Erici, *et al.* (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, *Chemosphere* 86, pp. 593-599.
- (7) Hutchinson, T.H. *et al.* (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, *Aquatic Toxicology*, 76, pp. 69-92.
- (8) OCDE (2012), *Daphnia magna*, essai de reproduction, Ligne directrice pour les essais de l'OCDE, No. 211, Section 2 : Effets sur les systèmes biologiques, DOI : 10.1787/9789264185470-fr, OCDE, Paris
- (9) Hansen, D.J. et P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (*Cyprindon variegatus*) for life-cycle toxicity tests, In *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (publié par F.L. Mayer et J.L. Hamelink), ASTM STP 634.
- (10) Kimmel, H. B.*et al.* (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203:253–310.
- (11) Gonzalez-Doncel, M. *et al.* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthyidae) *Journal of Applied Ichthyology*, 20:1–14.
- (12) Devlin, E.W. *et al.* (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C.
- (13) Oris, J.T., S.C. Belanger, et A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, *Environmental Toxicology and Chemistry* 31; 2, pp. 370-376.
- (14) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et l'évaluation, n° 54, OCDE, Paris.
- (15) Rao, J.N.K. et A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, 577-585.
- (16) Rao, J.N.K. et A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, pp. 1373-1385.
- (17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of American Statistical Association*, 50, pp. 1096-1121.
- (18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, pp. 482-491.
- (19) Rand, G.M. et S.R. Petrocelli (1985), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publication Corporation, New York.
- (20) McClave, J.T., J.H. Sullivan et J.G. Pearson (1980). *Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data*, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphie.

ANNEXE 1DÉFINITIONS

Longueur à la fourche (LF) : longueur mesurée de la pointe du museau à l'extrémité des rayons centraux de la nageoire caudale, utilisée pour les poissons dont il est difficile de dire où se termine la colonne vertébrale (www.fishbase.org).

Longueur standard (LS) : longueur mesurée de la pointe du museau à l'extrémité postérieure de la dernière vertèbre ou à l'extrémité postérieure de la partie médio-latérale de la plaque hypurale. Autrement dit, cette mesure ne prend pas en compte la longueur de la nageoire caudale (www.fishbase.org).

Longueur totale (LE) : longueur de l'extrémité du museau à l'extrémité du lobe le plus long de la nageoire caudale, généralement mesurée après avoir comprimé les lobes le long de la ligne médiane. La mesure se fait en ligne droite, sans suivre la courbe du corps (www.fishbase.org).

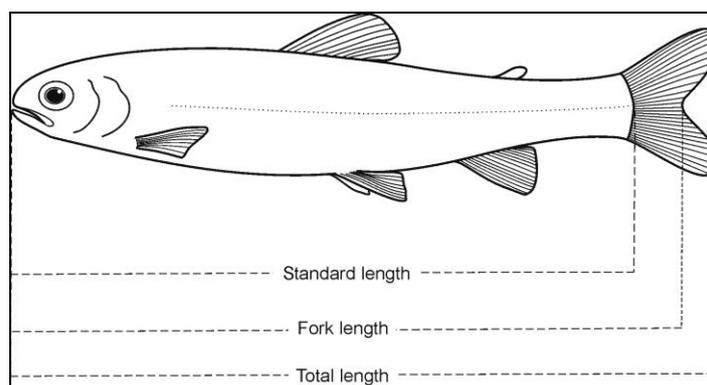


Figure 1 : Description des différentes longueurs utilisées

CE_x (concentration efficace à x %) : concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'essai durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, une CE₅₀ est une concentration estimée produire un effet sur un paramètre évalué de l'essai dans 50 % d'une population exposée durant une période d'exposition déterminée.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO) : concentration la plus basse d'un produit chimique testé à laquelle on observe un effet statistiquement significatif (à $p < 0.05$) par rapport au témoin. Néanmoins, toutes les concentrations supérieures à la CMEO devraient avoir un effet néfaste supérieur ou égal à ceux observés 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. Les annexes 5 et 6 donnent des indications à ce sujet.

Concentration (maximale) sans effet observé (CSEO) : concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO qui, comparée au témoin, n'a pas d'effet statistiquement significatif (à $p < 0.05$), durant une période d'exposition définie.

UVCB : substances de composition inconnue ou variable, produits de réactions complexes ou matériels biologiques.

SMILES : Spécification d'écriture moléculaire linéaire simplifiée

IUPAC : Union internationale pour la chimie pure et appliquée.

ANNEXE 2

CONDITIONS ET DURÉE DE L'ESSAI ET CRITÈRES DE SURVIE POUR LES ESPÈCES RECOMMANDÉES

ESPÈCE	CONDITIONS D'ESSAI			DURÉE D'ESSAI RECOMMANDÉE	Longueur totale moyenne minimale type des poissons témoins à la fin de l'essai (mm) ⁽¹⁾	TAUX DE SURVIE DES TÉMOINS (% minimum)	
	Température (°C)	Salinité (‰)	Photopériode (hrs.)			à l'éclosion	après l'éclosion
Eau douce :							
<u>Oncorhynchus mykiss</u> Truite arc-en-ciel	10 ± 1.5 ⁽²⁾		(3)	2 semaines après alimentation <i>ad libitum</i> des témoins (ou 60 jours après l'éclosion)	40	75%	75%
<u>Pimephales promelas</u> Tête-de-boule	25 ± 1.5		16	32 jours à compter du début de l'essai (ou 28 jours après l'éclosion)	18	70%	75%
<u>Danio rerio</u> Poisson-zèbre	26 ± 1.5		12 - 16 ⁽⁴⁾	30 jours après l'éclosion	11	70%	75 %
<u>Orvzias latipes</u> Medaka (japonais)	25 ± 2		12 - 16 ⁽⁴⁾	30 jours après l'éclosion	17	80%	80%
Habitats estuariens et marins							
<u>Cyprinodon variegatus</u> Fondule tête de mouton	25 ± 1.5	15 - 35 ⁽⁵⁾	12 - 16 ⁽⁴⁾	32 jours à compter du début de l'essai (ou 28 jours après l'éclosion)	17	75%	80%
<u>Menidia sp.</u> Capucette	22 - 25	15-35 ⁽⁵⁾	13	28 jours	20	80%	60%

- (1) La longueur totale moyenne minimale type ne constitue pas un critère de validité, mais les résultats inférieurs au chiffre indiqué doivent être examinés soigneusement par rapport à la sensibilité de l'essai. La longueur totale moyenne minimale est obtenue à partir d'une sélection de données disponibles à l'heure actuelle.
- (2) La souche particulière de truite arc-en-ciel étudiée peut nécessiter l'utilisation d'autres températures. Les poissons géniteurs doivent être maintenus à la même température que celle devant être utilisée pour les œufs. Après réception d'œufs du commerce, une adaptation de courte durée (1- 2 h, par exemple) à la température d'essai est nécessaire après leur arrivée.
- (3) Obscurité pour les larves jusqu'à une semaine après l'éclosion sauf lors de leur inspection, puis éclairage tamisé pendant toute la durée de l'essai (photopériode de 12-16 heures)⁽⁴⁾.
- (4) Quelles que soient les conditions d'essai, les conditions d'éclairage doivent être constantes.
- (5) Quel que soit l'essai, elle ne doit pas varier de plus de ± 2 ‰.

**ORIENTATIONS EN MATIÈRE D'ALIMENTATION ET DE MANIPULATION DES POISSONS-GÉNITEURS ET DES POISSONS D'ESSAI ISSUS DES
ESPÈCES RECOMMANDÉES**

ESPÈCE	NOURRITURE*				MOMENT DU TRANSFERT APRÈS L'ÉCLOSION	MOMENT DE LA PREMIÈRE PRISE DE NOURRITURE
	Poissons-géniteurs	Larves nouvellement écloses	Juvéniles			
			Type	Fréquence		
Eau douce :						
<u><i>Oncorhynchus mykiss</i></u> Truite arc-en-ciel	Nourriture pour truites	Aucune ^(a)	Nourriture de base pour truites NA	2-4 fois par jour	14-16 jours après l'éclosion ou à la remontée (facultatif)	19 jours après l'éclosion ou à la remontée
<u><i>Pimephales promelas</i></u> Tête-de-boule	NA, flocons AC	NA	NA48, flocons	2-3 fois par jour	À partir de 90 % d'éclosion	2 jours après l'éclosion
<u><i>Danio rerio</i></u> Poisson-zèbre	NA, flocons	Larves disponibles dans le commerce, protozoaires ^(b) , protéines ^(c)	NA48, flocons	NA une fois par jour ; flocons deux fois par jour	À partir de 90 % d'éclosion	2 jours après l'éclosion
<u><i>Oryzias latipes</i></u> Medaka (japonais)	flocons	NA, flocons (ou protozoaires ou rotifères)	NA48, flocons (ou rotifères)	NA une fois par jour ; flocons deux fois par jour <u>ou</u> flocons et rotifères une fois par jour	Sans objet	6-7 jours après le frai
Habitats estuariens et marins :						
<u><i>Cyprinodon variegatus</i></u> Fondule tête de mouton	NA, flocons, AC	NA	NA48	2-3 fois par jour	Sans objet	1 jour après l'éclosion /la remontée
<u><i>Menidia sp.</i></u> Menidia	NA48, flocons	NA	NA48	2-3 fois par jour	Sans objet	1 jour après l'éclosion /la remontée

*La nourriture doit être donnée à satiété. Le surplus et les excréta doivent être retirés quand cela s'avère nécessaire pour éviter l'accumulation de déchets.

AC artémies congelées ; adultes du genre *Artemia*

NA nauplies d'artémies ; fraîchement écloses

NA48 nauplies d'artémies ; âgées de 48 h

(a) les larves avec leur vitellus n'ont pas besoin de nourriture

(b) filtrés à partir de cultures mélangées

(c) granules provenant d'un processus de fermentation

ANNEXE 4QUELQUES CARACTERISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION
ADMISSIBLE

Substance	Concentration maximale
Particules	5 mg/L
Carbone organique total	2 mg/L
Ammoniac non ionisé	1 µg/L
Chlore résiduel	10 µg/L
Pesticides organophosphorés totaux	50 ng/L
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	50 ng/L
Chlore organique total	25 ng/L
Aluminium	1 µg/L
Arsenic	1 µg/L
Chrome	1 µg/L
Cobalt	1 µg/L
Cuivre	1 µg/L
Fer	1 µg/L
Plomb	1 µg/L
Nickel	1 µg/L
Zinc	1 µg/L
Cadmium	100 ng/L
Mercure	100 ng/L
Argent	100 ng/L

ANNEXE 5**GUIDE D'ORIENTATION POUR L'ANALYSE STATISTIQUE DE LA DÉTERMINATION DE LA CSEO****Généralités**

L'unité d'analyse est une série de réplicats. Ainsi, pour des mesures en continu telles que la taille, on calcule la moyenne ou la médiane des réplicats et les valeurs obtenues constituent les données destinées à l'analyse. La puissance des tests utilisés doit être démontrée, de préférence à partir d'une base de données historiques adéquate pour chaque laboratoire. L'ampleur de l'effet pouvant être détecté avec une puissance de 75-80 % doit être prévue pour chaque paramètre par le test statistique à utiliser.

Les bases de données disponibles au moment de l'élaboration de la présente ligne directrice établissent la puissance possible selon les procédures statistiques recommandées. Le laboratoire doit démontrer sa capacité à répondre à cette exigence de puissance, soit en procédant à sa propre analyse de puissance, soit en démontrant que le coefficient de variation (CV) pour chaque réponse ne dépasse pas le 90^e percentile des CV utilisés pour développer la LD. Le tableau 1 présente ces CV. Si l'on ne dispose que des moyennes et des médianes des réplicats, le CV intra-réplicats peut être ignoré.

Tableau 1: CV au 90^e percentile pour les espèces d'eau douce sélectionnées

Espèce	Réponse	CV_inter-réplicats	CV_intra-réplicats
Truite arc-en-ciel	Longueur	17.4	9.8
	Poids	10.1	28
Tête-de-boule	Longueur	16.9	13.5
	Poids	11.7	38.7
Poisson-zèbre	Longueur	43.7	11.7
	Poids	11.9	32.8

Pour la quasi-totalité des tests statistiques utilisés pour évaluer les études toxicologiques en laboratoire, les comparaisons intéressantes concernent les groupes de traitement par rapport aux témoins. Ainsi, il n'y a pas lieu d'exiger un test F ANOVA statistiquement significatif avant d'utiliser le test de Dunnett ou de Williams, ou un test statistiquement significatif de Kruskal-Wallis avant d'utiliser le test de Jonckheere-Terpstra, de Mann-Whitney ou de Dunn (Hochberg et Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al.* 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Le test de Dunnett permet des comparaisons multiples, et le fait d'utiliser le test F comme référence affecte négativement les taux de faux positifs et de faux négatifs. De même, le test de Williams et celui de Jonckheere-Terpstra utilisant un niveau de significativité de 0.05 à chaque étape conservent un taux global de faux positifs de 5 %, et ce taux ainsi que la puissance des tests sont affectés négativement par l'utilisation du test F ou du test de Kruskal-Wallis comme référence. Le test de Mann-Whitney et le test de Dunn doivent être corrigés aux fins de comparaison multiple et il est conseillé de leur appliquer une correction de Bonferroni-Holm.

On trouvera dans OCDE (2006) un examen approfondi de la plupart des recommandations sur les tests paramétriques et la vérification des hypothèses sous-jacentes à ces tests, ainsi qu'une bibliographie détaillée.

Traitement des témoins en cas d'utilisation d'un solvant

Si l'on utilise un solvant, on doit prévoir un témoin-eau et un témoin-solvant. Les deux témoins doivent être comparés pour chaque réponse et combinés en vue de l'analyse statistique s'ils ne présentent aucune différence significative. Sinon, on doit utiliser le témoin-solvant pour le dosage de la CSEO ou l'estimation de la CE_x et ne pas utiliser le témoin-eau. Voir la restriction applicable aux critères de validité (paragraphe 6).

En ce qui concerne la longueur, le poids, la proportion d'œufs éclos, le taux de mortalité larvaire ou la proportion de larves anormales, et le premier ou le dernier jour de frai ou de remontée, un test T ou un test de Mann-Whitney doit être utilisé pour comparer les témoins au niveau de significativité de 0.05, en ignorant tous les groupes de traitement. Les résultats de ces tests doivent être notés dans le rapport.

Observations morphologiques (longueur et poids)

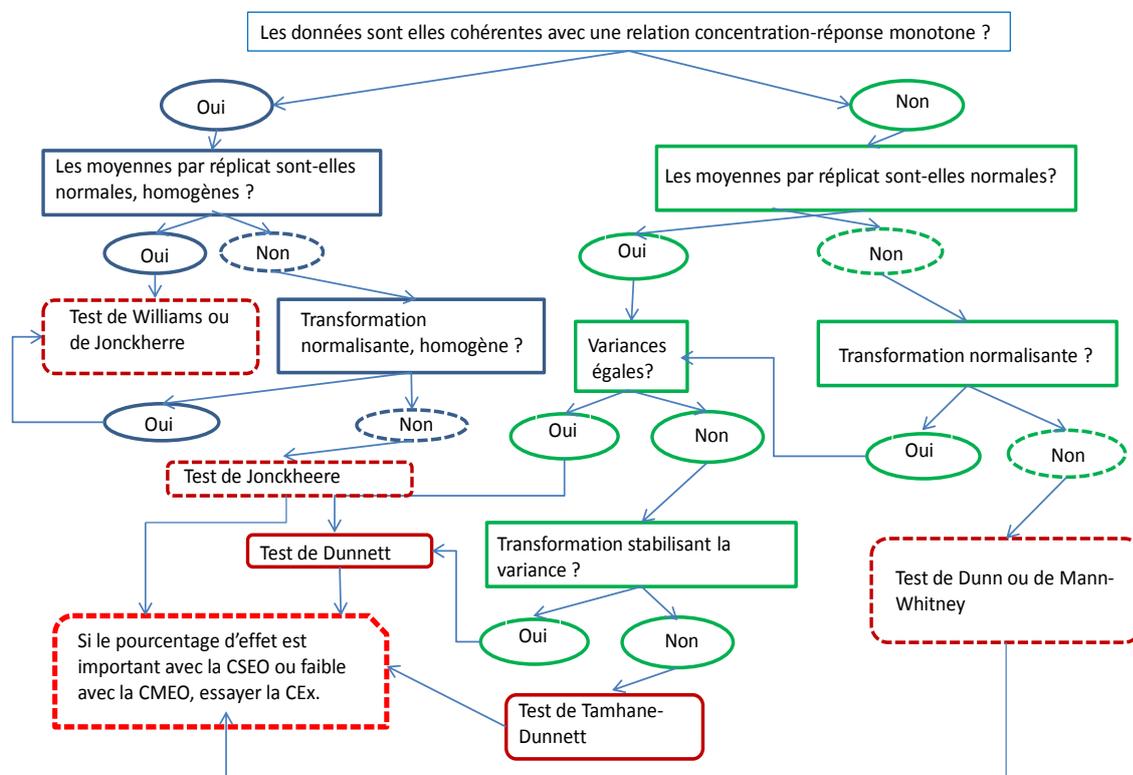
La longueur et le poids des poissons peuvent être distribués selon une loi normale ou log normale. Dans les deux cas, les valeurs moyennes par réplikat ont tendance à être normalement distribuées en vertu du théorème de la limite centrale et confirmées par les données provenant de plus d'une centaine d'études relatives aux stades de vie précoce de trois espèces d'eau douce. Par ailleurs, si les données ou les bases de données historiques font apparaître une distribution log normale en ce qui concerne les valeurs relatives à la taille des poissons, le logarithme des valeurs moyennes par réplikat peut être calculé, et les données pour l'analyse peuvent alors être les anti-logarithmes de ces logarithmes de moyennes par réplikat.

L'évaluation doit porter sur la compatibilité des données avec une distribution normale et une homogénéité de la variance. A cet effet, on utilisera les résidus d'un modèle ANOVA où la concentration est la seule variable explicative. On peut avoir recours à la représentation sous forme de nuages de points et d'histogrammes ou bien de diagrammes à tiges et à feuilles. Sinon, on peut utiliser un test formel comme celui de Shapiro-Wilk ou d'Anderson-Darling. Il est possible d'évaluer la compatibilité des données avec l'homogénéité de la variance par un examen visuel du même nuage de points ou formellement grâce au test de Levene. L'évaluation de la normalité et de l'homogénéité de la variance est obligatoire uniquement pour les tests paramétriques (Williams, Dunnett, etc.).

Une attention particulière doit être accordée aux éventuelles valeurs aberrantes et à leurs effets sur l'analyse. On peut avoir recours au test de Tukey et procéder à l'inspection visuelle des mêmes points de résidus décrits ci-dessus. Il convient de rappeler que les observations sont des réplikats entiers, de sorte que l'omission d'une aberration de l'analyse ne doit être effectuée qu'après un examen attentif.

Les tests statistiques qui font appel aux caractéristiques du protocole expérimental et de l'attente biologique sont des tests de tendance régressifs comme le test de Williams ou celui de Jonckheere-Terpstra. Ces tests supposent une relation concentration-réponse est monotone, et il faut vérifier que les données sont compatibles avec cette hypothèse. Cela peut être fait visuellement à partir d'un nuage de points des moyennes par réplikat par rapport à la concentration d'essai. Il sera utile de superposer ce nuage de points avec un diagramme linéaire reliant les concentrations moyennes pondérées par la taille d'échantillonnage dans le réplikat. Un écart important de ce diagramme linéaire par rapport à la monotonie indiquerait qu'il faut peut-être avoir recours à des tests non paramétriques. Par ailleurs, il est possible d'avoir recours aux tests formels. Un test formel simple consiste à calculer les contrastes linéaires et quadratiques des moyennes de concentrations. Si le contraste quadratique est significatif et que le contraste linéaire ne l'est pas, cela indique qu'il peut y avoir un problème avec la monotonie, qui devra alors être évaluée à partir des points. S'il peut y avoir un problème avec la normalité ou l'homogénéité de la variance, ces contrastes pourront être construits à partir de données hiérarchisées. Il est possible d'utiliser d'autres tests, tels que le test de Bartholomew (pour la monotonie), mais ces tests accroissent la complexité.

Les figures en pointillés correspondent aux procédures à suivre pour le 1^{er} jour et le dernier jour d'éclosion ou de remontée* ou les larves anormales



* Ces réponses ne corroborent jamais les hypothèses en cas de modèles ou d'analyses paramétriques

Figure 2: Logigramme pour la CSEO - observations morphologiques (longueur et poids)

À moins que les données ne soient pas conformes aux exigences des tests de Williams et de Jonckheere-Terpstra, on utilise ces tests pour déterminer la CSEO. On trouvera dans OCDE (2006) des informations détaillées sur ces procédures. Si les données sont non conformes aux exigences d'un test de tendance régressif, on peut utiliser le test de Dunnett ou celui de Tamhane-Dunnett (T3), qui permettent tous deux des comparaisons multiples. Ces tests supposent la normalité et, dans le cas du test de Dunnett, l'homogénéité de la variance. Si ces conditions ne sont pas remplies, on peut utiliser le test non paramétrique de Dunn. On trouvera dans OCDE (2006) des informations détaillées sur l'ensemble de ces tests. La figure 2 donne une vue d'ensemble permettant de choisir le test approprié.

Éclosion des oeufs et survie des larves

Les données à analyser sont les proportions d'œufs qui éclosent ou de larves qui survivent dans chaque réplicat. Ces proportions doivent être évaluées sous l'angle de la variance extra-binomiale, qui est fréquente mais pas universelle pour ces mesures. L'organigramme de la figure 3 donne des indications pour le choix du test approprié ; le texte apporte des explications détaillées.

Deux tests sont couramment utilisés : celui de la $C(\alpha)$ de Tarone (Tarone, 1979) et des tests du χ^2 , chacun étant appliqué séparément à chaque concentration d'essai. En cas d'observation d'une variance extra-binomiale, même dans une seule concentration d'essai, les méthodes qui s'en accommodent doivent être utilisées.

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^m \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1 - \hat{p})} - \sum_{j=1}^m n_j}{\{2 \sum_{j=1}^m n_j (n_j - 1)\}^{1/2}}$$

Formule 1 : test de la C(α) de Tarone (Tarone, 1979)

\hat{p} : proportion moyenne pour une concentration donnée ; m : nombre de réplicats ; n_j : nombre de sujets présents dans le réplicat j ; x_j : nombre de sujets répondants dans le réplicat j (non éclos ou morts, par exemple). Ce test est appliqué à chaque concentration séparément. Il peut être considéré comme un test du Chi² corrigé, mais les simulations de faible puissance effectuées par Tarone ont montré qu'il était plus puissant qu'un test du Chi².

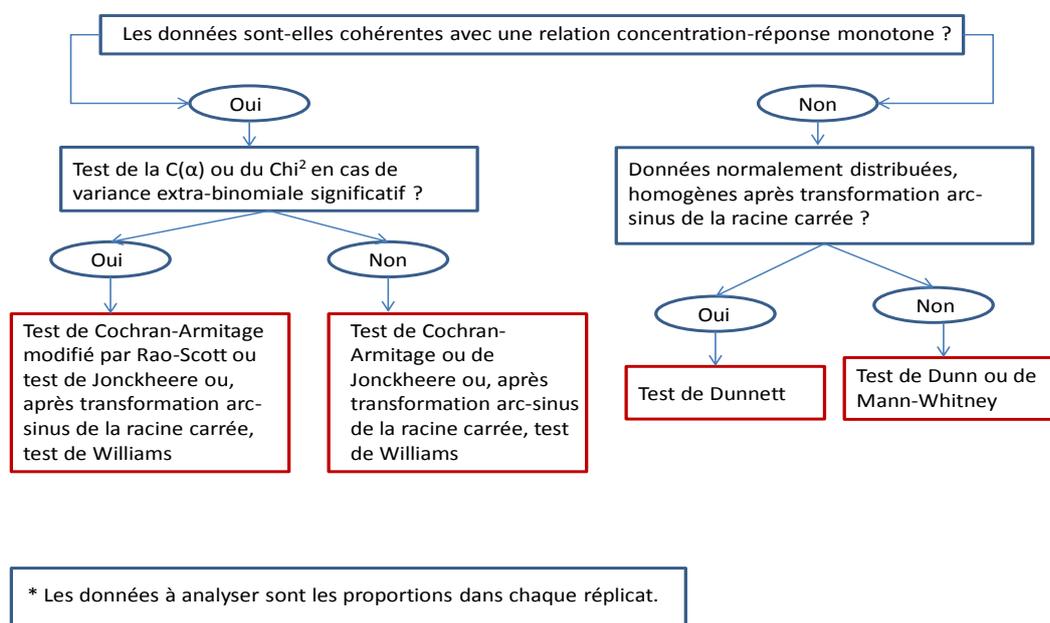


Figure 3 : Logigramme pour la CSEO –éclosion des œufs et mortalité larvaire

En l'absence de preuve significative de la variance extra-binomiale, on peut utiliser le test de Cochran-Armitage. Ce test ne tenant pas compte des réplicats, il est recommandé d'utiliser l'ajustement Rao-Scott du test de Cochran-Armitage (RSCA), qui prend en compte les répétitions, la taille des réplicats et la variance extra-binomiale, s'il existe des preuves de cette dernière. On peut également utiliser le test de Williams, le test de Jonckheere-Terpstra ou le test de Dunnett, tels que décrits pour les observations morphologiques. Ces tests s'appliquent qu'il y ait ou non variance extra-binomiale, mais ont une puissance un peu plus faible (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao et Scott, 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

Premier ou dernier jour d'éclosion ou de remontée

La réponse est un nombre entier, indiquant le jour où l'observation indiquée est faite pour un réplicat donné. La plage de valeurs est généralement très limitée, et il y a souvent de fortes proportions de données liées ; (par exemple, le premier jour d'éclosion est identique dans tous les témoins et éventuellement pour une ou

deux faibles concentrations d'essai). Des tests paramétriques tels que le test de Williams et le test de Dunnett ne conviennent pas pour ce type de données. Sauf preuve sérieuse de non-monotonie, le test de Jonckheere-Terpstra est très puissant pour détecter les effets du produit chimique testé. Sinon, on peut utiliser le test de Dunn.

Malformations larvaires

La réponse est le nombre de larves plus ou moins atteintes de malformations. Cette réponse est souvent de faible incidence et pose certains des mêmes problèmes que le premier jour d'éclosion, avec une relation concentration-réponse parfois erratique. Si les données font apparaître une relation concentration-réponse globalement monotone, le test de Jonckheere-Terpstra est puissant pour détecter les effets. Sinon, on peut utiliser le test de Dunn.

Références

- Agresti, A. (2002), *Categorical Data Analysis*, second edition, Wiley, Hoboken.
- Dunnett C. W. (1955), A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, *J. American Statistical Association* 50, pp. 1096-1121.
- Dunn O. J. (1964), Multiple Comparisons Using Rank Sums, *Technometrics* 6, pp. 241-252.
- Dunnett C. W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics* 20, pp. 482-491.
- Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao et A.J. Scott (1994), Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, *Risk Analysis* 14, pp. 639-648.
- Fung, K.Y., D. Krewski et R.T. Smythe (1996), A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, *Canadian Journal of Statistics* 24, pp. 431-454.
- Hochberg, Y. et A. C. Tamhane (1987), *Multiple Comparison Procedures*, Wiley, New York.
- Hsu, J.C. (1996), *Multiple Comparisons: Theory and Methods*; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.
- Jonckheere A. R. (1954), A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, *Biometrika* 41, p. 133.
- Morgan, B.J.T. (1992), *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, Londres.
- OCDE (2006), *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*, Série de l'OCDE sur les essais et évaluations, n° 54, OCDE, Paris.
- Rao, J.N.K. et A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, pp. 577-585.
- Rao, J.N.K. et A.J. Scott. (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, pp. 1373-1385.
- Robertson, T., F.T. Wright et R.L. Dykstra (1988), *Order restricted statistical inference*, Wiley.
- Tarone, R.E. (1979), Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, *Biometrika* 66, pp. 585-590.

- Williams D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics* 27, pp. 103-117.
- Williams D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics* 28, pp. 519-531.
- Williams D. A. (1975), The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratology, *Biometrics* 31, pp. 949-952.
- Williams D.A. (1977), Some inference procedures for monotonically ordered normal means, *Biometrika* 64, pp. 9-14.

ANNEXE 6**GUIDE D'ORIENTATION POUR L'ANALYSE STATISTIQUE DES ESTIMATIONS PAR RÉGRESSION****Généralités**

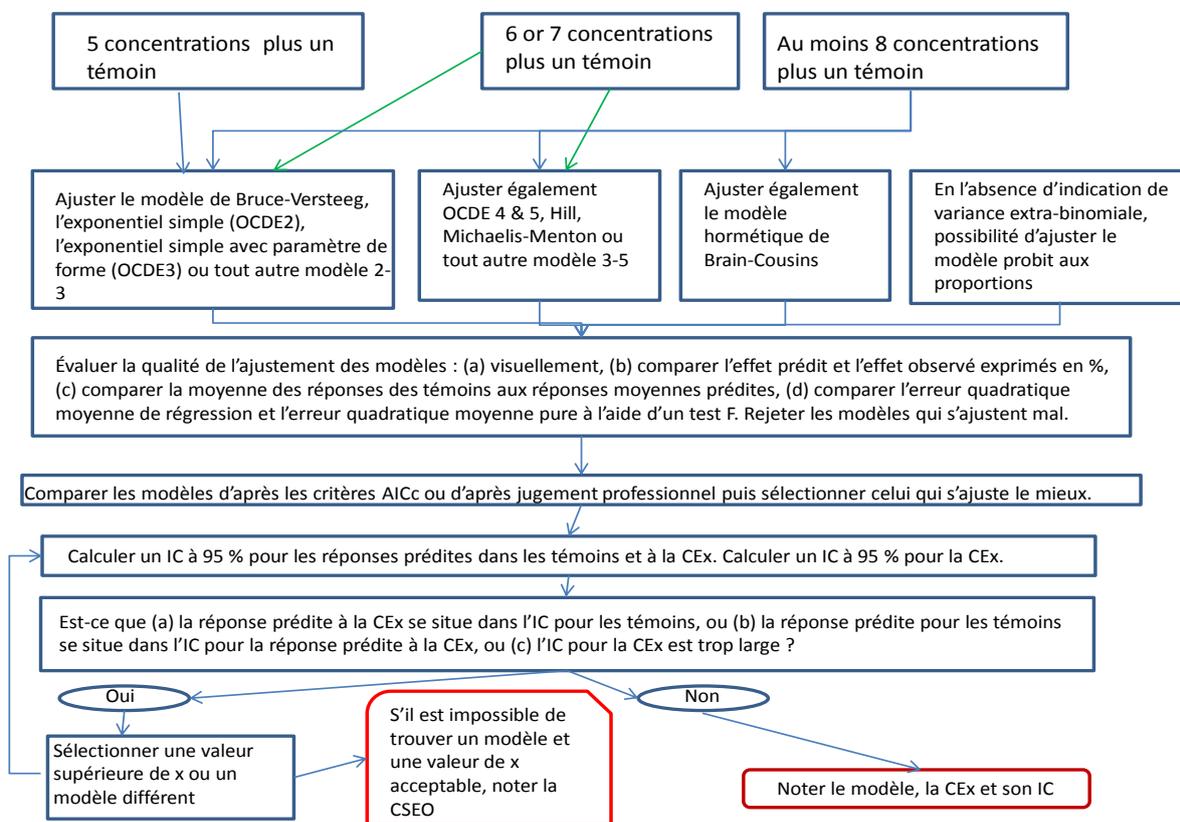
Les observations utilisées pour ajuster un modèle sont les moyennes par réplicat (longueur et poids) ou les proportions d'œufs éclos et de larves mortes dans chaque réplicat (OCDE 2006).

Il est généralement conseillé de procéder à une régression pondérée en utilisant pour ce faire la taille des échantillons réplicats. D'autres systèmes de pondération sont possibles (pondération en fonction de la réponse moyenne prédite ou bien combinaison de ce type de pondération et d'une pondération en fonction de la taille des échantillons réplicats, par exemple). En ce qui concerne les concentrations, la pondération en fonction de l'inverse de la variance dans l'échantillon à une concentration donnée n'est pas recommandée (Bunke *et al.* 1999, Seber et Wild 2003, Motulsky et Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Toute transformation des réponses avant l'analyse doit préserver l'indépendance des observations ; la CE_x et les limites de son intervalle de confiance doivent être exprimées dans les unités de mesure d'origine, plutôt que dans les unités transformées. Par exemple, une variation de 20 % du logarithme de la longueur n'équivaut pas à une variation de 20 % de la longueur (Lyles *et al.* 2008, Draper et Smith, 1999).

Le logigramme de la figure 4 donne un aperçu des estimations de la CE_x . Le texte y apporte des explications détaillées.

Figure 4 : Logigramme pour l'estimation de la CEx pour la longueur, le poids, la proportion d'œufs éclos ou la mortalité larvaire moyennes par réplicat ; consulter le texte pour de plus amples informations.



Considérations relatives aux éclosions et à la mortalité larvaire

En ce qui concerne les éclosions et la mortalité larvaire, il est généralement préférable d'ajuster un modèle décroissant, à moins d'ajuster un modèle probit comme décrit ci-dessous. Il convient donc de modéliser la proportion d'œufs qui n'éclosent pas ou de larves qui meurent. En effet la CEx renvoie à une concentration à laquelle la variation est égale à x % de la réponse moyenne des témoins. Si 5 % des œufs témoins ne parviennent pas à éclore et que l'on modélise l'incapacité à éclore, la CE₂₀ désigne une concentration à laquelle il se produit une variation égale à 20 % des 5 % d'œufs témoins non éclos, soit une variation de 0.2*0.05 = 0.01 autrement dit d'1 point de pourcentage qui se traduit par un taux d'œufs non éclos de 6 %. Une variation aussi faible ne peut pas être estimée de façon significative à partir des données disponibles et n'est pas biologiquement importante. En revanche, si l'on modélisait la proportion d'œufs qui éclosent, la proportion parmi les témoins serait de 95 % dans notre exemple, et une réduction de 20 % par rapport à la moyenne des réponses des témoins se traduirait par une réduction de 0.95*0.2 = 0.18, soit un taux d'éclosion passant de 95 % à 77 % (= 95-18) ; la concentration produisant cet effet peut être estimée et revêt sans doute un plus grand intérêt. Le problème ne se pose pas avec les mesurages se rapportant à la morphologie, bien que les conséquences négatives sur la morphologie correspondent généralement à une diminution de la taille.

Modèles concernant la morphologie (longueur ou poids) et le taux d'éclosion des œufs ou le taux de survie larvaire

Hormis le modèle hormétique de Brain-Cousins, tous ces modèles sont décrits et préconisés dans OCDE (2006). Les modèles OCDE 2-5 sont également discutés pour des expériences d'écotoxicité dans Slob (2002). Il existe bien entendu beaucoup d'autres modèles qui pourraient être utiles. Bunke *et al.* (1999) énumère de nombreux modèles ne figurant pas ici, et les références à d'autres modèles sont abondantes. Les modèles énumérés ci-dessous sont jugés particulièrement adaptés aux expériences d'écotoxicité et sont largement utilisés.

Avec 5 concentrations d'essai plus un témoin

- Bruce-Versteeg
- exponentiel simple (OCDE 2)
- exponentiel avec paramètre de forme (OCDE 3)
- exponentiel simple avec limite inférieure (OCDE 4)

Avec minimum 6 concentrations d'essai plus un témoin

- exponentiel avec paramètre de forme et limite inférieure (OCDE 5)
- Michaelis-Menton
- Hill

Lorsqu'il existe une preuve visuelle de l'hormèse (peu probable en cas de d'éclosion des œufs ou de survie larvaire, mais parfois observée sur le plan morphologique)

- modèle hormétique de Brain-Cousins ; Brain et Cousens (1989)

Autres modèles pour les œufs non éclos et la mortalité larvaire

- De plus en plus de modèles applicables à ces réponses peuvent être adaptés par des modèles probit (ou logistiques) en l'absence de preuve de variance extra-binomiale ; l'incidence du témoin est estimée dans l'ajustement du modèle. Cette méthode n'est pas à privilégier, car elle prend l'individu, et non le réplicat, comme unité d'analyse (Morgan 1992, O'Hara Hines et Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Qualité de l'ajustement d'un modèle unique

- Comparer visuellement la diminution observée et la diminution prédite exprimées en pourcentage à chaque concentration d'essai (Motulsky et Christopoulos 2004, Draper et Smith, 1999).
- Comparer l'erreur quadratique moyenne de régression et l'erreur quadratique moyenne pure à l'aide d'un test F (Draper et Smith, 1999).
- Vérifier que chaque terme du modèle est significativement différent de zéro (autrement dit déterminer si tous les termes du modèle sont importants) (Motulsky et Christopoulos 2004).
- Points de résidus de la régression par rapport à la concentration d'essai, éventuellement sur une échelle log(conc). Il ne doit y avoir aucun modèle pour ce graphique ; les points doivent être dispersés au hasard sur une ligne horizontale à la hauteur zéro.
- Les données doivent être évaluées du point de vue de la normalité et de l'homogénéité de la variance comme indiqué à l'annexe 5.
- En outre, la normalité des résidus du modèle de régression doit être évaluée selon les mêmes méthodes indiquées à l'annexe 5 pour les résidus de l'ANOVA.

Comparaison des modèles

- Utiliser les critères AICc d'Akiaki. Des valeurs AICc plus petites traduisent un meilleur ajustement, et si $AICc(B) - AICc(A) \geq 10$, le modèle A est presque certainement meilleur que le modèle B (Motulsky et Christopoulos 2004).
- Comparer visuellement les deux modèles pour voir comment ils répondent aux critères du modèle unique ci-dessus.
- Le principe de parcimonie est conseillé, principe selon lequel on utilise le modèle le plus simple qui ajuste raisonnablement bien les données (Ratkowsky 1993, Lyles *et al.* 2008).

Qualité de l'estimation de la CE_x

L'intervalle de confiance (IC) de la CE_x ne doit pas être trop large. Le jugement statistique est nécessaire pour décider de la largeur de l'intervalle de confiance et de l'utilité que peut encore voir la CE_x . Les simulations de modèles de régression ajustés aux données relatives à l'éclosion des œufs et aux données morphologiques montrent que 75 % environ des intervalles de confiance pour la CE_x ($x = 10, 20$ ou 30) ne portent pas sur plus de deux concentrations d'essai. Cela donne une idée de ce qui est acceptable et réalisable. De nombreux auteurs affirment qu'il faut indiquer les intervalles de confiance pour tous les paramètres du modèle et que lorsque les intervalles de confiance des paramètres du modèle sont grands, cela signifie que les modèles sont inacceptables (Ott et Longnecker 2008, Alvord et Rossio 1993, Motulsky et Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber et Wild 2003, Bunke *et al.* 1999, Environnement Canada, 2005).

L'intervalle de confiance de la CE_x (ou de tout autre paramètre du modèle) ne doit pas contenir zéro (Motulsky et Christopoulos 2004). Les estimations des paramètres sont-elles scientifiquement plausibles ? Par exemple, si l'intervalle de confiance pour y_0 est $\pm 20\%$, aucune estimation de la CE_{10} n'est plausible. Si le modèle prédit un effet de 20 % à une concentration C et si l'effet maximal observé à la concentration C et aux concentrations en-deçà est de 10 %, alors la CE_{20} n'est pas plausible (Motulsky et Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environnement Canada, 2005).

La CE_x ne doit pas être extrapolée en dehors de la plage de concentrations positives (Draper et Smith 1999, OCDE 2006). Par exemple, un guide général pourrait être que la CE_x ne doit pas être inférieure de plus de 25 % environ à la concentration d'essai la plus faible ou supérieure de plus de 25 % à la concentration d'essai la plus élevée.

L'intervalle de confiance pour l'effet à la CE_x ne doit pas contenir zéro. Il s'agit de la régression équivalente à la différence significative minimale qui est souvent citée dans les méthodes de vérification des hypothèses (Wang *et al.* 2000, par exemple). Il correspond également à l'intervalle de confiance pour que les réponses moyennes à la CMEO ne contiennent par la moyenne des réponses des témoins.

Références

Alvord, W.G. et J.L. Rossio (1993), Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, *Journal of Immunological Methods* 157, pp. 155-163.

Brain P. et R. Cousens (1989), An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed res.* 29:93-96.

Bunke, O., B. Droge et J. Polzehl (1999), Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, pp. 197-240.

Collett, D. (2002), *Modelling Binary Data*, 2^{nde} édition, Chapman and Hall, Londres.

Collett, D. (2003), *Modelling Survival Data in Medical Research*, second edition, Chapman and Hall, Londres.

Draper, N.R. et H. Smith (1999), *Applied Regression Analysis*, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environnement Canada (2005), Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité, SPE1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat et E. Jolivet (2003), *Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples*, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown et C.R. Cooper (2008), Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. Novembre 2008 ; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992), *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, Londres.

Motulsky, H. et A. Christopoulos (2004), *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. et J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OCDE (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application, Série de l'OCDE sur les essais et évaluations, n° 54, pp. 1-147, [ENV/JM/MONO\(2006\)18](#), OCDE, Paris.

Ott, R.L. et M.T. Longnecker (2008), *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*, 6^{ème} édition, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993), Principles of nonlinear regression, *Journal of Industrial Microbiology* 12, pp. 195-199.

Seber, G.A.F. et C.J. Wild (2003), *Nonlinear Regression*, Wiley

Slob W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66, pp. 298-312

Wang, Q., D.L. Denton et R. Shukla (2000), Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 19, pp. 113–117, 2000.