

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

### **Poisson, essai sur la croissance des juvéniles**

#### **INTRODUCTION**

1. La présente Ligne directrice vise à évaluer les effets d'une exposition prolongée à des produits chimiques sur la croissance des poissons au stade juvénile. Elle s'appuie sur une méthode mise au point et soumise à des essais tournants (1)(2) dans l'Union européenne, qui a pour objet d'évaluer les effets de substances chimiques sur la croissance de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) au stade juvénile dans des conditions dynamiques, ainsi que sur les débats d'une réunion d'experts de l'OCDE tenue à Medmenham (Royaume-Uni) en décembre 1991. D'autres espèces bien étudiées peuvent aussi être utilisées. On possède par exemple une certaine expérience des essais de croissance sur le danio (*Danio rerio*<sup>1</sup>) (3)(4) et sur le medaka (*Oryzias latipes*) (5)(6)(7).

#### **PRINCIPE DE L'ESSAI**

2. Des juvéniles en phase de croissance exponentielle sont pesés puis placés dans des enceintes d'essai où ils sont exposés à une gamme de concentrations sublétales de la substance d'essai dissoute dans l'eau, si possible selon une méthode dynamique ou, à défaut, selon une méthode semi-statique (renouvellement discontinu) adéquate. L'essai dure 28 jours ou plus. Les poissons sont nourris quotidiennement. La ration alimentaire est déterminée en fonction du poids initial des poissons et peut être recalculée après 14 jours. On pèse à nouveau les poissons à la fin de l'essai. Les effets sur le taux de croissance sont analysés à l'aide d'un modèle de régression, afin d'estimer la concentration qui entraînerait une variation de x pour cent du taux de croissance, soit  $CE_x$  ( $CE_{10}$ ,  $CE_{20}$  ou  $CE_{30}$ , par exemple). Les résultats peuvent aussi être comparés aux valeurs des témoins pour déterminer la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et, de là, la concentration (maximale) sans effet observé (CSEO). Les définitions figurent à l'Annexe 1.

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

3. Il faudrait disposer des résultats d'un essai de toxicité aiguë (voir la Ligne directrice 203 (8)), conduit de préférence sur l'espèce choisie pour le présent essai. Cela implique que la solubilité dans l'eau et

---

<sup>1</sup> Meyer, A., Bierman, C.H. et Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

pression de vapeur de la substance d'essai soient connues et qu'il existe une méthode d'analyse fiable pour déterminer la quantité de substance dans les solutions d'essai avec une précision et une limite de détection connues.

4. Il est utile de connaître la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité dans l'eau et à la lumière, le  $pK_a$ , le  $P_{oc}$  et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir Ligne directrice 301 (8)).

### **CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI**

5. Afin qu'un essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies :

- la mortalité dans le(s) groupe(s) témoin(s) ne doit pas dépasser 10 pour cent à la fin de l'essai ;
- le poids moyen des poissons du (des) groupe(s) témoin(s) doit avoir augmenté suffisamment pour que la variation minimale du taux de croissance qui est jugée significative soit détectable. Un essai tournant (2) a montré que, dans le cas de la truite arc-en-ciel, le poids moyen des témoins doit s'être accru d'au moins la moitié (soit 50 pour cent) de leur poids initial moyen sur 28 jours ; si, par exemple, le poids initial s'élève à 1 g/poisson (= 100 pour cent), le poids final après 28 jours est  $\geq 1.5$  g/poisson ( $\geq 150$  pour cent) ;
- la concentration de l'oxygène dissous doit être maintenue à au moins 60 pour cent de la valeur de la saturation en air tout au long de l'essai ;
- à aucun moment, durant l'essai, la température de l'eau ne doit différer de plus de  $\pm 1^\circ\text{C}$  entre les enceintes expérimentales et doit demeurer à l'intérieur d'un intervalle de  $2^\circ\text{C}$ , compris dans la gamme de température indiquée pour l'espèce étudiée (Annexe 2).

### **DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**

#### **Appareillage**

6. On utilise du matériel courant de laboratoire et en particulier :

- (a) un pH-mètre et un appareil à mesurer l'oxygène ;
- (b) un instrument pour mesurer la dureté et l'alcalinité de l'eau ;
- (c) un dispositif adéquat de régulation de la température, avec, de préférence, une surveillance en continu ;
- (d) des cuves en un matériau chimiquement inerte et d'une capacité adaptée à la charge et à la densité de peuplement recommandées (voir paragraphe 38 et Annexe 2) ;
- (e) une balance suffisamment précise (précision de  $\pm 0.5$  pour cent).

#### **Eau**

7. On utilisera une eau dans laquelle l'espèce testée présente des taux de croissance et de survie à long terme adéquates. Sa qualité doit demeurer constante pendant la durée de l'essai. Le pH de l'eau sera compris entre 6.5 et 8.5, sans varier de plus de  $\pm 0.5$  unité de pH au cours d'un même essai. Une dureté supérieure à 140 mg/l (en  $\text{CaCO}_3$ ) est recommandée. Pour s'assurer que l'eau de dilution ne déformera pas le résultat de l'essai (notamment par complexation de la substance d'essai), on prélèvera des échantillons à différents intervalles pour analyse. Le dosage des métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple), des principaux anions et cations (Ca, Mg, Na, K, Cl,  $\text{SO}_4$ , par exemple), des pesticides (total des pesticides

organophosphorés et organochlorés, par exemple), du carbone organique total et des solides en suspension devrait être effectué tous les trois mois, par exemple, pour une eau de dilution dont on sait que la qualité est relativement constante. Si la qualité de l'eau s'est révélée constante durant au moins un an, on pourra espacer les mesures (par exemple tous les six mois). Certaines caractéristiques chimiques requises pour une eau de dilution acceptable sont énumérées à l'Annexe 3.

### **Solutions de la substance d'essai**

8. Des solutions d'essai sont ajustées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. La solution mère devrait, de préférence, être préparée par simple mélange ou agitation de la substance d'essai dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (secouement ou ultrasons, par exemple). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) peuvent être utilisées pour raliser une solution mère de concentration adéquate. L'emploi de solvants ou de dispersants (solubilisants) sera indiqué dans certains cas pour obtenir une solution mère de concentration appropriée. L'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthylsulfoxyde, le diméthylformamide et le triéthylèneglycol conviendront comme solvants. Parmi les dispersants appropriés, citons le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0.01 pour cent et le HCO-40. La prudence s'impose avec l'emploi d'agents facilement biodégradables (comme l'acétone) ou de composés très volatils, car ils peuvent entraîner une accumulation de bactéries dans les essais dynamiques. Lorsqu'on utilise un solubilisant, il ne doit pas avoir d'effet significatif sur la croissance des poissons ni d'effets nocifs visibles sur les juvéniles ; un témoin ne comprenant que le solvant permettra de s'en assurer.

9. Les essais dynamiques requièrent un système qui délivre et dilue en continu une solution mère de la substance d'essai (par exemple une pompe doseuse, un diluteur proportionnel, un système de saturation) pour appliquer une série de concentrations dans les enceintes d'essai. Les débits des solutions mères et de l'eau de dilution doivent être vérifiés périodiquement, de préférence tous les jours, au cours de l'essai et ne devraient pas varier de plus de 10 pour cent tout au long de celui-ci. Un essai tournant (2) a montré que, pour la truite arc-en-ciel, une fréquence de renouvellement de l'eau de 6 litres/g de poisson/jour était acceptable (voir paragraphe 28).

10. Dans les essais semi-statiques (essais avec renouvellement), la fréquence de renouvellement du milieu dépendra de la stabilité de la substance d'essai, mais on recommande de renouveler l'eau quotidiennement. Si des essais de stabilité préliminaires (voir paragraphes 3 et 4) révèlent que la concentration de la substance d'essai est instable (c'est-à-dire qu'elle déborde d'un intervalle de 80 à 120 pour cent de la valeur nominale ou qu'elle tombe en dessous de 80 pour cent de la concentration initiale mesurée) sur la période de renouvellement, il faudra envisager un essai dynamique.

### **Sélection de l'espèce**

11. La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est recommandée dans cet essai puisque c'est à son sujet qu'on a accumulé la plus grande expérience au cours d'essais tournants (1)(2). D'autres espèces bien étudiées peuvent cependant être utilisées, mais le mode opératoire devra être adapté afin que l'essai se déroule dans les conditions appropriées. On dispose également d'une certaine expérience à propos du danio (*Danio rerio*) (3)(4) et du medaka (*Oryzias latipes*) (5)(6)(7). Le choix de l'espèce et de la méthode expérimentale doivent être justifiés dans ce cas.

### **Élevage des poissons**

12. Les poissons d'essai seront sélectionnés au sein d'une même population, issue de préférence du même frai, qui aura été maintenue pendant au moins deux semaines avant l'essai dans des conditions d'illumination et de qualité de l'eau similaires à celles de l'essai. Leur ration alimentaire quotidienne devrait atteindre au moins 2 pour cent de leur poids corporel et de préférence 4 pour cent pendant toute la durée de la mise en condition et de l'essai.

13. Après une période d'acclimatation de 48 heures, on mesure la mortalité et on applique les critères suivants :

- mortalité supérieure à 10 pour cent de la population en sept jours : le lot entier est rejeté ;
- mortalité comprise entre 5 et 10 pour cent de la population : période d'acclimatation prolongée de sept jours ; si la mortalité dépasse 5 pour cent durant la deuxième période de 7 jours : le lot entier est rejeté ;
- mortalité inférieure à 5 pour cent de la population en sept jours : le lot est accepté.

14. Les poissons ne devraient pas recevoir un traitement pour une maladie durant les deux semaines précédant l'essai ou pendant l'essai.

### **CONCEPTION DE L'ESSAI**

15. Par "conception de l'essai", on entend le choix du nombre et de l'espacement des concentrations d'essai, le nombre de cuves par concentration et le nombre de poissons par cuve. Idéalement, l'essai devrait être conçu en fonction de :

- (a) l'objectif de l'étude ;
- (b) la méthode d'analyse statistique qui sera utilisée ;
- (c) la disponibilité et le coût des ressources expérimentales.

16. L'exposé de l'objectif devrait, si possible, spécifier la puissance statistique que requiert une différence donnée (dans le taux de croissance, par exemple) pour être détectée ou bien la précision avec laquelle la CEx doit être fournie (avec  $x = 10, 20$  ou  $30$ , par exemple et de préférence pas au-dessous de 10) pour être estimée. Faute de quoi il est impossible de donner une indication précise de l'échelle de l'étude.

17. Il importe de reconnaître qu'une conception qui est optimale (c'est-à-dire qui utilise au mieux les ressources) si on recourt à une certaine méthode d'analyse statistique ne l'est pas forcément avec une autre méthode. La conception recommandée pour l'estimation d'une CMEO/CSEO ne sera donc pas identique à celle recommandée pour une analyse par régression.

18. Dans la plupart des cas, l'analyse par régression est préférable à l'analyse de la variance, pour des raisons exposées par Stephan et Rogers (9). Toutefois, si on ne trouve aucun modèle de régression approprié ( $r^2 < 0.9$ ), il faut recourir à la CMEO/CSEO.

### **Conception pour l'analyse par régression**

19. Les considérations importantes pour la conception d'un essai à analyser par régression sont les suivantes :

- (i) La concentration qui produit un effet (par exemple  $CE_{10,20,30}$ ), et la gamme de concentrations dans laquelle la substance d'essai produit un effet intéressant doivent nécessairement être couvertes par les concentrations d'essai. La précision avec laquelle les concentrations produisant un effet peuvent être estimées sera la meilleure lorsque la concentration produisant un effet se situe au milieu de la gamme des concentrations testées. Un test préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur peut être utile pour sélectionner les concentrations d'essai appropriées.
- (ii) Afin de répondre aux exigences de la modélisation statistique, l'essai doit comporter au moins une cuve témoin et cinq autres à différentes concentrations. Lorsqu'on utilise un solubilisant, il faudrait tester un groupe témoin contenant l'agent solubilisant à la

concentration d'essai la plus élevée en plus des groupes d'essai (voir les paragraphes 33-34).

- (iii) Une série géométrique ou logarithmique appropriée (10) (voir Annexe 4) peut être utilisée. Un espacement logarithmique entre les concentrations d'essai est préférable.
- (iv) Si on dispose de plus de six cuves, les cuves supplémentaires devraient servir de répliques ou contenir des concentrations intermédiaires réparties dans la gamme couverte de manière à diminuer l'écart entre les concentrations. Ces deux options sont aussi valables l'une que l'autre.

### **Conception pour l'estimation de la CSEO/CME0 à l'aide de l'analyse de la variance**

20. Il serait préférable d'avoir plusieurs cuves pour chaque concentration, et de conduire l'analyse statistique à l'échelon de la cuve (11). Sans cuves répliques, il est impossible de prendre en compte la variabilité entre les cuves, en plus de celle qui existe entre les poissons. L'expérience a cependant montré (12) que la variabilité entre les cuves est très inférieure à celle qui règne au sein de chaque cuve dans le cas examiné. C'est pourquoi il existe une autre solution relativement acceptable qui consiste à pratiquer l'analyse statistique au niveau des poissons.

21. On applique en principe au moins cinq concentrations d'essai selon une série géométrique obéissant à un facteur qui ne dépasse de préférence pas 3.2.

22. Généralement, lorsque les essais sont conduits avec plusieurs cuves à chaque concentration, le nombre de cuves témoins, et par conséquent le nombre de poissons, devrait être le double du nombre choisi à chaque concentration d'essai, qui devrait être constant (13)(14)(15). A contrario, si on ne dispose que d'une seule cuve par concentration, le nombre de poissons dans le groupe témoin devrait être le même que dans chaque concentration d'essai.

23. Si l'analyse de la variance est menée au niveau des cuves plutôt qu'à celui des poissons (ce qui exigerait un marquage individuel des poissons ou l'utilisation de taux de croissance "pseudo-spécifiques" - voir paragraphe 51), il faut prévoir un nombre suffisant de cuves répliques pour pouvoir déterminer l'écart-type entre les cuves de même concentration. Cela implique que l'erreur dans l'analyse de la variance ait au moins cinq degrés de liberté (11). Si seuls les témoins existent en plusieurs exemplaires, la variabilité de l'erreur risque d'être déformée puisqu'elle est susceptible de s'accroître avec la valeur moyenne du taux de croissance en question. Comme le taux de croissance a des chances de diminuer lorsque la concentration augmente, on tendra à surestimer la variabilité.

### **DÉROULEMENT DE L'ESSAI**

#### **Sélection et pesée des poissons d'essai**

24. Il importe de veiller à ce que le poids des poissons varie le moins possible au début de l'essai. L'Annexe 2 indique les gammes de poids qui conviennent aux différentes espèces recommandées pour cet essai. Idéalement, au début de l'essai, la gamme des poids de l'ensemble des poissons utilisés dans cet essai ne devrait pas sortir d'un intervalle de  $\pm 10$  pour cent de la moyenne arithmétique et en aucun cas excéder 25 pour cent de variation. On recommande de peser un sous-échantillon de poissons avant l'essai afin d'estimer le poids moyen.

25. Les poissons doivent être privés de nourriture pendant les 24 heures qui précèdent le début de l'essai. Il sont ensuite choisis au hasard. Les poissons doivent être pesés individuellement en poids humide (séchés par tamponnage) avec la précision stipulée dans l'Annexe 2, à l'aide d'un anesthésique général (par

exemple une solution aqueuse de 100 mg/l de méthanesulphonate de tricaine (MS 222) neutralisée avec deux parts de bicarbonate de sodium par part de MS 222). Les poissons dont le poids se situe à l'intérieur de l'intervalle visé seront retenus et répartis au hasard entre les cuves. On notera le poids frais total des poissons dans chaque cuve. L'utilisation d'anesthésiques de même que la manipulation des poissons (y compris le séchage et la pesée) peuvent perturber et blesser les jeunes poissons, en particulier ceux de petite taille. Les jeunes poissons doivent donc être manipulés avec une extrême précaution ceci afin d'éviter de stresser ou de blesser les animaux.

26. Les poissons seront pesés à nouveau le 28<sup>ème</sup> jour de l'essai (voir paragraphe 41). Si toutefois on juge nécessaire de recalculer la ration alimentaire, on pèsera à nouveau les poissons au quatorzième jour de l'essai (voir paragraphe 29). Une autre méthode telle que la technique photographique peut être utilisée pour évaluer les variations de taille des poissons, partir de quoi la ration alimentaire pourra être ajustée.

### **Conditions d'exposition**

#### **Durée**

27. La durée de l'essai est  $\geq 28$  jours.

#### **Taux de charge et densité de peuplement**

28. Il importe que le taux de charge et la densité de peuplement (voir les définitions à l'Annexe 1) soient adaptés à l'espèce testée (voir Annexe 2). Si la densité de peuplement est trop élevée, la pression engendrée par la surpopulation diminuera les taux de croissance et risque d'engendrer des maladies. Si cette densité est trop faible, elle peut induire un comportement territorial susceptible d'affecter également la croissance. En tout état de cause, le taux de charge doit être suffisamment bas pour que la concentration de l'oxygène dissous puisse être maintenue à au moins 60 pour cent de la valeur de saturation en air, sans aération. Un essai tournant (2) a montré que dans le cas de la truite arc-en-ciel, un taux de charge de 16 truites de 3 à 5 grammes dans un volume de 40 litres était acceptable. La fréquence de renouvellement de l'eau recommandée durant l'essai est de 6 litres/g de poisson/jour.

#### **Alimentation**

29. Les poissons doivent recevoir la nourriture qui leur convient (Annexe 2) en quantité suffisante pour présenter un taux de croissance acceptable. Il faut veiller à prévenir la prolifération de micro-organismes et la turbidité de l'eau. S'agissant de la truite arc-en-ciel, une ration quotidienne de 4 pour cent de son poids corporel devrait remplir ces conditions (2)(16)(17)(18). La ration quotidienne peut être divisée en deux parts égales administrées à au moins cinq heures d'intervalle. La ration est proportionnelle au poids total initial des poissons dans chaque cuve d'essai. Si les poissons sont pesés à nouveau le quatorzième jour, on recalcule la ration. Les poissons doivent être privés de nourriture pendant les 24 heures qui précèdent leur pesée.

30. Les aliments non consommés et les matières fécales doivent être enlevés quotidiennement des cuves d'essai par un nettoyage soigneux du fond de chaque cuve à l'aide d'un suceur.

#### **Lumière et température**

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

### **Concentrations d'essai**

32. On applique normalement cinq concentrations de la substance d'essai, quelle que soit la conception de l'essai (voir paragraphes 21 et 22). Une connaissance préalable de la toxicité de la substance d'essai (tirée par exemple d'un essai de toxicité aiguë ou d'études de détermination de l'ordre de grandeur) devrait faciliter

le choix des concentrations d'essai appropriées. Il y a lieu de justifier l'emploi d'un nombre inférieur de concentrations. La concentration d'essai la plus élevée ne doit pas dépasser la limite de solubilité de la substance dans l'eau.

33. Si un solubilisant est utilisé dans la préparation de la solution mère, sa concentration finale ne devrait pas excéder 0.1 ml/l et, de préférence, être identique dans toutes les cuves d'essai (voir paragraphe 8). L'utilisation de ce genre de produit devrait cependant être évitée dans toute la mesure du possible.

### **Témoins**

34. Le nombre de cuves témoins contenant l'eau de dilution dépend de la conception de l'essai (voir paragraphes 15-23). En cas d'utilisation d'un solubilisant, on mettra en place le même nombre de témoins pour l'eau de dilution que pour le solubilisant.

### **Fréquence des dosages analytiques et des mesures**

35. Pendant l'essai, les concentrations de la substance d'essai sont déterminées à intervalles réguliers (voir paragraphes 36 et 37).

36. Dans les essais dynamiques on vérifiera périodiquement, de préférence chaque jour, les débits du diluant et de la solution mère de substance toxique. Ceux-ci ne devraient pas varier de plus de 10 pour cent pendant l'essai. Lorsqu'on s'attend à ce que les concentrations de la substance d'essai ne s'écartent pas de plus de 20 pour cent des valeurs nominales (autrement dit qu'elles restent comprises entre 80 et 120 pour cent, voir paragraphes 7 et 10), il est recommandé d'analyser au moins la plus faible et la plus forte des concentrations d'essai au début de l'essai et à intervalles hebdomadaires par la suite. Si on prévoit que la concentration de la substance d'essai s'écartera de plus de 20 pour cent des valeurs nominales (d'après les données sur la stabilité de la substance d'essai), il est nécessaire d'analyser toutes les concentrations d'essai, et ce selon le même régime.

37. Dans les essais semi-statiques (essais avec renouvellement) où la concentration de la substance d'essai ne devrait pas s'écartier de plus de 20 pour cent des valeurs nominales, il est recommandé d'analyser au moins la plus faible et la plus forte des concentrations d'essai juste après leur préparation, juste avant le renouvellement au début de l'essai et à intervalles hebdomadaires par la suite. Si on prévoit que la concentration de la substance s'écartera de plus de 20 pour cent des valeurs nominales, il faut analyser toutes les concentrations d'essai selon le même régime que pour les substances plus stables.

38. On recommande de fonder les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si les données disponibles démontrent que la concentration de la substance d'essai en solution a été correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de  $\pm 20$  pour cent autour de la concentration nominale ou de la concentration mesurée au départ, les résultats peuvent être calculés à partir des valeurs nominales ou mesurées.

39. Il faudra peut-être filtrer (avec par exemple des pores de 0.45  $\mu$ m) ou centrifuger les échantillons. La centrifugation est la procédure recommandée. Cependant, si le milieu d'essai ne s'adsorbe pas sur le filtre, la filtration est également acceptable.

40. Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le pH et la température doivent être mesurés dans toutes les cuves d'essai. La dureté totale, l'alcalinité et la salinité (s'il y a lieu) doivent être mesurées dans les cuves témoins et dans celle qui contient la concentration la plus forte. La concentration de l'oxygène dissous et la salinité (s'il y a lieu) doivent être mesurées au moins trois fois : au début, au milieu et à la fin de l'essai. Dans les essais semi-statiques, on recommande de mesurer l'oxygène dissous plus souvent, de préférence avant et après chaque renouvellement de l'eau ou au moins une fois par semaine. Il faut mesurer le pH au début et à la fin de chaque renouvellement de l'eau dans les essais à renouvellement statique et au moins une fois par

semaine dans les essais dynamiques. La dureté et l'alcalinité devraient être mesurées une fois au cours de chaque essai. Il est préférable de surveiller la température en continu dans au moins une cuve d'essai.

### **Observations**

41. Poids : à la fin de l'essai, tous les poissons survivants sont pesés en poids humide (séchés par tamponnage) soit en groupes par récipient d'essai soit individuellement. Il est préférable de peser les animaux par récipient d'essai plutôt qu'individuellement, la pesée individuelle obligeant à marquer chaque poisson. Si on mesure le taux de croissance de chaque poisson, la technique de marquage devra être choisie de façon à perturber le moins possible les animaux (il peut se justifier d'utiliser une technique différente du cryo-marquage, par exemple un mince fil de pêche coloré).

42. Il convient d'examiner les poissons quotidiennement durant l'essai et de relever toutes les anomalies externes éventuelles (hémorragie, décoloration, par exemple) et les comportements anormaux. Les décès doivent être comptés et les poissons morts retirés de la cuve dès que possible. Les poissons morts ne seront pas remplacés, le taux de charge et la densité de peuplement étant suffisamment élevés pour éviter que la modification du nombre de poissons par cuve ait des retombées sur la croissance. Cependant, la ration alimentaire devra être adaptée.

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### **Traitement des résultats**

43. Il est recommandé de faire appel à un statisticien pour la conception et l'analyse de l'essai, car cette Ligne directrice autorise une grande liberté dans le choix des conditions expérimentales, s'agissant notamment du nombre d'enceintes d'essai, de concentrations d'essai, de poissons, etc. Compte tenu de la souplesse de la conception, aucune orientation ou méthode statistique précise n'est proposée ici.

44. Il n'y a pas lieu de calculer les taux de croissance dans les cuves d'essai où la mortalité dépasse 10 pour cent. La mortalité doit cependant être spécifiée pour toutes les concentrations d'essai.

45. Quelle que soit la méthode appliquée pour analyser les données, le paramètre déterminant est le taux de croissance spécifique  $r$  enregistré entre l'instant  $t_1$  et l'instant  $t_2$ . Il peut être défini de diverses manières, selon que les poissons ont été ou non marqués individuellement ou selon qu'on recherche une moyenne par cuve.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\overline{\log_e W_2} - \overline{\log_e W_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \overline{\log_e W_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

où :

$r_1$  = taux de croissance spécifique de chaque poisson



$r_2$  = taux de croissance spécifique moyen par cuve

$r_3$  = taux de croissance "pseudo"-spécifique

$w_1, w_2$  = poids d'un poisson donné aux instants  $t_1$  et  $t_2$

$\log_e w_1$  = logarithme du poids d'un poisson donné au début de la période d'étude.

$\log_e w_2$  = logarithme du poids d'un poisson donné à la fin de la période d'étude.

$\overline{\log_e w_1}$  = moyenne des logarithmes des valeurs  $w_1$  des poissons de la cuve au début de la période d'étude.

$\overline{\log_e w_2}$  = moyenne des logarithmes des valeurs  $w_2$  des poissons de la cuve à la fin de la période d'étude.

$t_1, t_2$  = moments (jours) du début et de la fin de la période d'étude.

$r_1, r_2, r_3$  sont calculés pour la période comprise entre le jour 0 et le jour 28 et, s'il y a lieu (c'est-à-dire lorsqu'une mesure a été effectuée au jour 14) pour les périodes couvrant les jours 0-14 et 14-28.

### **Analyse des résultats par régression (modélisation concentration-effet)**

46. Cette méthode d'analyse établit une relation mathématique appropriée entre le taux de croissance spécifique et la concentration, ce qui permet d'estimer la  $CE_x$ , c'est-à-dire toute valeur de CE requise. En utilisant cette méthode, il n'est pas nécessaire de calculer  $r$  pour chaque poisson ( $r_1$ ) et l'analyse peut s'appuyer en lieu et place sur la valeur moyenne de  $r$  pour la cuve ( $r_2$ ). Cette dernière méthode est préférable. En outre, elle se prête mieux à l'emploi d'espèces plus petites.

47. Pour étudier la relation concentration-effet, on porte sur un graphique les taux de croissance spécifiques moyens par cuve ( $r_2$ ) en fonction de la concentration.

48. Afin d'exprimer la relation entre  $r_2$  et la concentration, il convient de choisir un modèle adéquat et d'étayer ce choix par un raisonnement pertinent.

49. Si le nombre de poissons survivants varie suivant les cuves, le processus d'ajustement du modèle, qu'il soit simple ou non linéaire, doit être pondéré pour tenir compte de la taille inégale des groupes.

50. La méthode d'ajustement du modèle doit permettre d'estimer, par exemple, la  $CE_{20}$  et de calculer sa dispersion (écart-type ou intervalle de confiance). Le graphique du modèle ajusté doit être présenté en regard des données pour permettre d'apprécier l'adéquation de l'ajustement du modèle (9)(19)(20)(21).

### **Analyse des résultats en vue d'estimer la CME0**

51. S'il y a plusieurs cuves d'essai pour toutes les concentrations, l'estimation de la CME0 pourrait s'appuyer sur une analyse de la variance du taux de croissance spécifique moyen de chaque cuve (voir paragraphe 45), suivie de l'application d'une méthode pertinente (par exemple un test de Dunnett ou de Williams (13)(14)(15)(22)) de comparaison de la moyenne  $r$  à chaque concentration avec la moyenne  $r$  des témoins, afin de déterminer la concentration minimale à laquelle cette différence est significative avec un seuil de probabilité de 0.05. Si les hypothèses requises concernant les méthodes paramétriques ne sont pas remplies - distribution non normale (par exemple test de Shapiro-Wilk) ou variance hétérogène (test de Bartlett), il faudra envisager de transformer les données pour homogénéiser les variances avant l'analyse de la variance ou de conduire une analyse pondérée de la variance.

52. Si l'essai ne porte que sur une seule cuve par concentration, l'analyse de la variance reposant sur les cuves sera insensible ou impossible. Dans ces circonstances, on peut parvenir à un compromis acceptable en fondant l'analyse de la variance sur le taux de croissance "pseudo"-spécifique  $r_3$  de chaque poisson.

53. La moyenne  $r_3$  pour chaque concentration d'essai peut ensuite être comparée à la moyenne  $r_3$  des témoins, ce qui permet alors de déterminer la CMEO comme précédemment. Il faut admettre que cette méthode ne tient pas compte de la variabilité entre les cuves, en dehors de celle imputable à la variabilité entre les poissons, et n'offre aucune protection à cet égard. L'expérience a cependant montré (9) que la variabilité entre les cuves était très faible par rapport à celle qui règne dans les cuves (c'est-à-dire entre les poissons). Si l'analyse n'intègre pas les données concernant chaque poisson, il convient d'indiquer la méthode d'identification des valeurs nettement divergentes et de justifier son emploi.

### **Interprétation des résultats**

54. Les résultats doivent être interprétés avec prudence lorsque les concentrations mesurées de substance toxique dans les solutions d'essai se situent près de la limite de détection de la méthode d'analyse ou, dans les essais semi-statiques, lorsque la concentration de la substance d'essai diminue entre le moment où la solution vient d'être préparée et le moment qui précède le renouvellement.

### **Rapport d'essai**

55. Le rapport d'essai doit fournir les informations suivantes :

Substance d'essai :

- état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes ;
- données relatives à l'identification chimique, dont la pureté et la méthode analytique de dosage de la substance d'essai s'il y a lieu.

Espèce testée :

- nom scientifique, souche éventuelle, taille, fournisseur, traitement préalable éventuel, etc.

Conditions d'essai :

- méthode utilisée (par exemple semi-statique/avec renouvellement, dynamique, charge, densité de peuplement, etc.) ;
- conception de l'essai (par exemple nombre de cuves d'essai, de concentrations d'essai et de répliques, nombre de poissons par cuve) ;
- méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (le solubilisant et sa concentration doivent être indiqués, le cas échéant) ;
- concentrations d'essai nominales, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les cuves d'essai, méthode de calcul de ces paramètres et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations de la substance d'essai en solution vraie ;
- caractéristiques de l'eau de dilution : pH, dureté, alcalinité, température, concentration de l'oxygène dissous, teneurs résiduelles en chlore (si mesurées), carbone organique total, solides en suspension, 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 de l'oxygène dissous ;
- informations détaillées sur l'alimentation (par exemple le type d'aliments, la source, la quantité donnée et la fréquence).

## Résultats :

- données montrant que les témoins remplissent les critères de validité concernant la survie, et données sur la mortalité à toutes les concentrations d'essai ;
- techniques d'analyse statistique appliquées, statistiques fondées sur les répliques ou les poissons, traitement des données et justification des méthodes utilisées ;
- tableaux donnant les poids individuels et moyens des poissons aux jours 0, 14 (si mesurés) et 28, valeurs des moyennes par cuve ou taux de croissance pseudo-spécifiques (s'il y a lieu) pour les périodes 0-28, ou éventuellement 0-14 et 14-28 ;
- résultats de l'analyse statistique (analyse par régression ou analyse de la variance) fournis de préférence sous forme de tableau ou de graphique, CME0 (p = 0.05) et CSEO ou ECx avec leurs écarts-types si possible ;
- fréquence de toute réaction inhabituelle des poissons et de tout effet visible produit par la substance d'essai.

**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Solbe J.F de L G (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Rest of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.
- (2) Ashley S., Mallett M.J. et Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
- (3) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. *Chemosphere*, 14, pp. 1855-1870.
- (4) Nagel R., Bresch H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. et Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloraniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. *Ecotox. Environ. Safety*, 21, pp. 157-164.
- (5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokyo, Japon.
- (6) Holcombe, G.W., Benoit, D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. et Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Conta. Toxicol.* 28, pp. 287-297.
- (7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. et Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.
- (8) OCDE (1993). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Paris.
- (9) Stephan C.E. et Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium*, ASTM STP 891, R C Bahner et D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphie, pp. 328-338.

- (10) Environnement Canada. (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.
- (11) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.
- (12) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Document de séance n°4, Réunion ad hoc d'experts de l'OCDE sur la toxicologie aquatique, WRc Medmenham, Royaume-Uni, 10-12 décembre 1991.
- (13) Dunnett C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, pp. 1096-1121.
- (14) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, pp. 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, pp. 103-117.
- (16) Johnston, W.L., Atkinson, J.L. et Glanville, N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured foods to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. *Aquaculture*, 120, pp. 123-133.
- (17) Quinton, J.C. et Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 37, pp. 33-41
- (18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in *Textbook of Fish Health*. T.F.H. Publications, Inc., Neptune City, New Jersey, USA. 288 p.
- (19) Bruce, R.D. et Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11, pp. 1485-1494.
- (20) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. et McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test: intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.
- (21) Norbert-King, T.J. (1998). An interpolation estimate for chronic toxicity : the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assessment Center. Sept. 1998. 12pp.
- (22) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28, pp. 510-531.

ANNEXE 1DÉFINITIONS

Concentration minimale avec effet observé (CMEO) : la plus faible concentration de la substance d'essai à laquelle on observe un effet significatif (à  $p < 0.05$ ) par rapport au témoin. Cependant, pour toute concentration supérieure à la CMEO, l'effet nocif doit être égal ou supérieur à celui observé à la CMEO.

Concentration sans effet observé (CSEO) : la concentration d'essai juste en dessous de la CMEO.

CE<sub>x</sub> : dans la présente Ligne directrice, la concentration de la substance d'essai qui provoque une variation de x pour cent du taux de croissance des poissons par rapport aux témoins.

Taux de charge : le poids frais des poissons par unité de volume d'eau.

Densité de peuplement : le nombre de poissons par unité de volume d'eau.

Taux de croissance spécifique de chaque poisson : le taux de croissance d'un individu par rapport à son poids initial.

Taux de croissance spécifique moyen par cuve : le taux de croissance moyen de la population d'une cuve à une concentration donnée.

Taux de croissance pseudo-spécifique : le taux de croissance individuel comparé au poids initial moyen de la population de la cuve.

ANNEXE 2ESPÈCES DE POISSONS POUR L'ESSAI ET CONDITIONS D'ESSAI APPROPRIÉES

Espèce	Gamme de températures recommandée (°C)	Photopériode (heures)	Gamme recommandée pour le poids initial des poissons (g)	Précision requise de la mesure	Taux de charge (g/l)	Densité de peuplement (par litre)	Alimentation	Durée de l'essai (jours)
<b>Espèce recommandée :</b>								
<u>Oncorhynchus mykiss</u> truite arc-en-ciel	12.5 - 16.0	12 - 16	1 - 5	à 100 mg près	1.2 - 2.0	4	spécialité alimentaire sèche pour frai de salmonidé	≥28
<b>Autres espèces bien étudiées:</b>								
<u>Danio rerio</u> danio	21 - 25	12 - 16	0.050 - 0.100	à 1 mg près	0.2 - 1	5 - 10	nourriture vivante ( <i>Brachionus</i> , <i>Artemia</i> )	≥28
<u>Oryzias latipes</u> medaka	21 - 25	12 - 16	0.050 - 0.100	à 1 mg près	0.2 - 1.0	5 - 20	nourriture vivante ( <i>Branchionus</i> , <i>Artemia</i> )	≥28

ANNEXE 3QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

SUBSTANCE	CONCENTRATIONS
Particules	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 •g/l
Chlore résiduel	< 10 •g/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

ANNEXE 4SÉRIE LOGARITHMIQUE DE CONCENTRATIONS CONVENANT À UN  
ESSAI DE TOXICITÉ (1)

Colonne (Nombre de concentrations entre 100 et 10 ou entre 10 et 1)*						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3.2	10	18	25	32	37	42
1.0	4.6	10	16	22	27	32
	2.2	5.6	10	15	19	24
	1.0	3.2	6.3	10	14	18
		1.8	4.0	6.8	10	13
		1.0	2.5	4.6	7.2	10
			1.6	3.2	5.2	7.5
			1.0	2.2	3.7	5.6
				1.5	2.7	4.2
				1.0	1.9	3.2
					1.4	2.4
					1.0	1.8
						1.3
						1.0

\* Une série de cinq concentrations successives (ou plus) peut être choisie dans une colonne. Les points intermédiaires entre les concentrations d'une colonne (x) se trouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées sous forme de pourcentage en volume ou en poids (mg/l ou µg/l). Les valeurs peuvent être multipliées ou divisées par la puissance de 10 adéquate. On pourra utiliser la première colonne si le degré de toxicité est très incertain.

- (1) Environnement Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or Atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.