

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

Essai de toxicité sur le cycle de vie des chironomes dans un système eau-sédiment chargé ou eau chargée-sédiment

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice est conçue pour évaluer les effets d'une exposition vie entière à des produits chimiques chez *Chironomus* sp., un diptère d'eau douce, en couvrant toute la durée de vie de la première génération (génération P) et la première partie de la vie de la deuxième génération (génération F1). Elle prolonge les lignes directrices n° 218 et 219 existantes, dans lesquelles l'exposition s'effectue respectivement à l'aide d'un système eau chargée-sédiment (1) ou d'un système eau-sédiment chargé (15). Cette Ligne directrice s'appuie sur des protocoles d'essais de toxicité sur *Chironomus riparius* et *Chironomus dilutus* [anciennement dénommé *C. tentans* (2)], mis au point en Europe et en Amérique du Nord (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) puis soumis à des essais interlaboratoires (1) (7) (10) (11) (12). Il est également possible d'utiliser d'autres espèces de chironomes pour lesquelles il existe une littérature conséquente, telles que *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). La durée totale d'exposition est d'environ 44 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, et d'environ 100 jours pour *C. dilutus*.

2. La présente Ligne directrice décrit des scénarios d'exposition dans l'eau et le sédiment respectivement. Le choix du mode d'exposition dépend de la finalité de l'essai. Le mode d'exposition qui consiste à charger la colonne d'eau vise à simuler des pertes par dispersion lors de l'épandage de pesticides et couvre le pic de concentration initial dans les eaux de surface. Le chargement de la colonne d'eau s'applique également à d'autres types d'exposition (notamment déversements de produits chimiques), mais non aux processus d'accumulation dans le sédiment d'une durée supérieure à celle de l'essai. Dans ce dernier cas, mais aussi lorsque le ruissellement est la principale voie d'entrée des pesticides dans les masses d'eau, il peut être préférable de charger le sédiment. Si d'autres modes d'exposition sont envisagés, le protocole d'essai peut facilement être adapté. Par exemple, si la répartition de la substance d'essai entre la phase aqueuse et la couche de sédiment ne présente pas d'intérêt, et qu'il est nécessaire de limiter au maximum l'adsorption sur le sédiment, on peut envisager d'avoir recours à un sédiment de substitution artificiel (tel que du sable quartzique).

3. En général, les substances à tester sur des organismes vivant dans les sédiments subsistent longtemps dans le sédiment. Ces organismes peuvent être exposés par diverses voies. L'importance relative de chaque voie d'exposition et le temps pris par chacune d'entre elles pour contribuer à l'effet toxique global dépendent des propriétés physico-chimiques de la substance. Dans le cas de substances fortement adsorbantes ou de substances liées par covalence au sédiment, l'ingestion d'aliments contaminés peut se révéler une voie d'exposition significative. Afin de ne pas sous-estimer la toxicité des substances fortement lipophiles, on envisagera d'ajouter de la nourriture au sédiment avant l'application de la substance d'essai (voir paragraphe 31). Il est donc possible d'inclure toutes les voies d'exposition et tous les stades du cycle de vie.

© OCDE, (2010).

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

4. Les effets mesurés sont le nombre total d'adultes émergés (pour la 1^{ère} et la 2^{ème} génération), la vitesse de développement (pour la 1^{ère} et la 2^{ème} génération), le sex-ratio des adultes totalement émergés et vivants (pour la 1^{ère} et la 2^{ème} génération), le nombre d'amas cylindriques d'œufs par femelle (1^{ère} génération uniquement) et le taux de fertilité des amas d'œufs (1^{ère} génération uniquement).

5. L'utilisation d'un sédiment reconstitué est vivement recommandée en raison de ses avantages par rapport aux sédiments naturels:

- la variabilité expérimentale est réduite car le sédiment reconstitué forme une « matrice normalisée » reproductible; en outre, il n'est plus nécessaire de trouver des sources de sédiments non contaminés et non pollués;
- les essais peuvent être effectués à n'importe quel moment de l'année, la variabilité saisonnière n'intervenant plus, et il n'est pas nécessaire de traiter préalablement le sédiment pour éliminer la faune indigène;
- le coût est réduit par rapport à la collecte sur le terrain d'une quantité suffisante de sédiments pour les essais en routine;
- les sédiments reconstitués permettent de comparer la toxicité des substances entre les différentes études (3).

6. Les définitions utilisées figurent à l'annexe 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des chironomes au premier stade larvaire sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dans un système sédiment-eau. L'essai débute par l'introduction de larves du premier stade (1^{ère} génération) dans des béciers expérimentaux contenant du sédiment chargé. Il est également possible d'injecter la substance d'essai dans l'eau après l'introduction des larves. L'émergence des chironomes, le délai d'émergence et le sex-ratio des moucheron complètement émergés et vivants sont évalués. Les adultes émergés sont transférés dans des cages d'élevage pour faciliter l'essaimage, l'accouplement et la ponte. Le nombre d'amas d'œufs et leur fertilité sont évalués. Ces amas d'œufs produisent les larves du premier stade de la 2^{ème} génération. Ces larves sont placées dans des béciers expérimentaux fraîchement préparés (les récipients sont chargés de la même façon que pour la 1^{ère} génération) afin de déterminer la viabilité de la 2^{ème} génération *via* l'évaluation de l'émergence des chironomes, du délai d'émergence et du sex-ratio des moucheron complètement émergés et vivants (on trouvera à l'annexe 5 une présentation schématique de l'essai sur le cycle de vie). Toutes les données sont analysées, soit en utilisant un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x % de l'effet mesuré, soit en ayant recours à un test d'hypothèse pour déterminer une concentration sans effet observé (CSEO). Cette dernière méthode nécessite une comparaison des réponses au traitement avec les réponses témoins adéquates à l'aide de tests statistiques.

Il convient de noter que dans le système eau chargée, en cas d'utilisation de substances se dégradant rapidement, les dernières phases du cycle de vie de chaque génération (par exemple la phase pupale) peuvent être exposées à un niveau de concentration bien plus faible dans l'eau sus-jacente que les larves du premier stade. Si cela pose problème et qu'un niveau d'exposition similaire est nécessaire pour chaque phase du cycle de vie, on peut alors envisager de modifier la méthode d'essai comme suit :

- expériences parallèles avec chargement du système à différentes phases du cycle de vie, ou
- chargement répété (ou renouvellement de l'eau sus-jacente) du système expérimental au cours des deux phases de l'essai (1^{ère} et 2^{ème} génération), les intervalles de chargement (renouvellement) devant être ajustés en fonction des caractéristiques du devenir de la substance d'essai.

De telles modifications sont envisageables uniquement dans le système eau chargée, et non dans le système sédiment chargé.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

8. Il est nécessaire de connaître l'hydrosolubilité de la substance d'essai, sa pression de vapeur et son $\log K_{oc}$, son coefficient de partage mesuré ou calculé dans le sédiment, et sa stabilité dans l'eau et le sédiment. Il convient de disposer, pour quantifier la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, l'eau interstitielle et le sédiment, d'une méthode d'analyse fiable dont la précision et le seuil de détection sont connus. Il est également utile de connaître la formule structurale et la pureté de la substance d'essai ainsi que son devenir chimique (par exemple dissipation, dégradation abiotique et biotique, etc.). Des conseils pour tester les substances se prêtant difficilement à l'essai en raison de leurs propriétés physico-chimiques sont fournis à la référence (16).

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

9. Il est possible de tester régulièrement des substances de référence afin de s'assurer que la sensibilité de la population du laboratoire n'a pas évolué. Comme pour les daphnies, il est suffisant d'effectuer un test de toxicité aiguë de 48 heures (tel que celui décrit dans la référence (17)). Toutefois, dans l'attente qu'une Ligne directrice validée soit disponible pour la toxicité aiguë, il peut être envisagé de réaliser un essai de toxicité chronique selon la Ligne directrice n°219 de l'OCDE. Parmi les toxiques de référence ayant fait leurs preuves dans des essais interlaboratoires et des études de validation, citons le lindane, la trifluraline, le pentachlorophénol, le chlorure de cadmium et le chlorure de potassium. (1) (3) (6) (7) (18).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. Pour que l'essai soit valable, les conditions suivantes doivent être remplies:
- l'émergence moyenne dans le système témoin est d'au moins 70 % à la fin de la période d'exposition pour les deux générations (1) (7);
 - pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, 85 % du total des moucheron adultes émergés du système témoin pour les deux générations doivent apparaître entre 12 et 23 jours après l'introduction des larves de premier stade dans les récipients; pour *C. dilutus*, une période de 20 à 65 jours est acceptable ;
 - le sex-ratio moyen des adultes totalement émergés et vivants (proportion de femelles ou de mâles) dans le système témoin pour les deux générations est d'au moins 0.4, mais ne dépasse pas 0.6;
 - pour chaque cage d'élevage, le nombre d'amas d'œufs dans les cultures témoin de la 1^{ère} génération est d'au moins 0.6 par femelle introduite dans la cage d'élevage;
 - la fraction des amas d'œufs fertiles dans chaque cage d'élevage des témoins de la 1^{ère} génération est d'au moins 0.6;
 - à l'issue de la période d'exposition pour les deux générations, le pH et la concentration d'oxygène dissous sont mesurés dans chaque récipient. La concentration d'oxygène doit atteindre au moins 60 % de la valeur de saturation en air (VSA¹), et le pH de l'eau sus-jacente doit être compris entre 6 et 9 dans tous les récipients expérimentaux;
 - la température de l'eau ne varie pas de plus de $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$.

¹ À 20°C et à la pression atmosphérique standard, la VSA de l'eau douce est de 9.1 mg/L (60 % représentant 5.46 mg/L)

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Réipients expérimentaux et cages d'élevage

11. Les larves sont exposées dans des béciers en verre de 600 ml, mesurant environ 8.5 cm de diamètre (voir annexe 5). D'autres réipients peuvent être utilisés à condition que la profondeur de l'eau sus-jacente et celle du sédiment puissent être suffisantes. Le sédiment doit offrir une superficie de 2 à 3 cm² par larve. Le rapport de l'épaisseur de la couche de sédiment à celle de la couche d'eau sus-jacente doit être à peu près égal à 1/4. Il convient d'utiliser des cages d'élevage (de 30 cm minimum pour chacune des trois dimensions) dont le dessus et au moins un côté sont recouverts d'une gaze (maillage d'environ 1 mm) (voir annexe 5). Dans chaque cage, on dispose pour la ponte un cristalliseur de 21 contenant un système expérimental eau-sédiment. Pour le cristalliseur également, le rapport de l'épaisseur de la couche de sédiment à celle de l'eau sus-jacente doit être à peu près égal à 1/4. Après avoir collecté les amas d'œufs dans le cristalliseur, on les transfère sur une plaque de microtitration à 12 puits (un amas par puits contenant au moins 2.5 ml d'eau prélevée dans le cristalliseur chargé), sur laquelle on place ensuite un couvercle afin d'éviter une trop forte évaporation. D'autres réipients peuvent également convenir pour recevoir les amas d'œufs. À l'exception des plaques de microtitration, tous les réipients et les autres appareils qui entreront en contact avec le système d'essai doivent être composés uniquement de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte (Téflon, par exemple).

Sélection des espèces

12. *Chironomus riparius* est l'espèce qui convient le mieux. *C. yoshimatsui* convient également. *C. dilutus* peut aussi être utilisé, mais il est plus difficile à manipuler et nécessite une période d'essai plus longue. La méthode de culture de *C. riparius* est détaillée à l'annexe 2. On dispose également d'informations sur les conditions de culture de *C. dilutus* (5) et *C. yoshimatsui* (14). L'identification des espèces est à confirmer avant l'essai, mais n'est pas requise avant chaque essai si les organismes ont été cultivés sur place.

Sédiment

13. Il est préférable d'employer un sédiment reconstitué (également dénommé sédiment artificiel ou synthétique). Néanmoins, si l'on opte pour un sédiment naturel, il convient de le caractériser, au moins quant au pH et à la teneur en carbone organique (la détermination d'autres paramètres, tels que le rapport C/N et la granulométrie est aussi recommandée), et de s'assurer qu'il n'est pas contaminé et n'abrite pas d'autres organismes qui pourraient entrer en compétition avec les larves de chironomes ou les consommer. Avant d'utiliser un sédiment naturel dans un essai, il est également recommandé de le maintenir durant sept jours dans des conditions identiques à celles de l'essai.

Il est recommandé d'utiliser le sédiment reconstitué suivant, tel que décrit en (1) (1) (20) (21):

- (a) 4-5 % (poids sec) de tourbe, avec un pH aussi proche que possible de 5.5 à 6.0; il importe d'utiliser une tourbe en poudre, finement broyée (dimension des particules ≤ 1 mm) et séchée uniquement à l'air;
- (b) 20 % (poids sec) d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %);
- (c) 75-76 % (poids sec) de sable quartzique (composé en majorité de sable fin, plus de 50 % des particules mesurant entre 50 et 200 μ m);
- (d) Ajouter de l'eau désionisée jusqu'à ce que la teneur en humidité du mélange final soit comprise entre 30 et 50 %;

- (e) Ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure (CaCO_3) afin d'ajuster le pH du mélange final de sédiments à 7.0 ± 0.5 ;
- (f) Il convient d'obtenir 2% ($\pm 0.5\%$) de carbone organique dans le mélange final en y ajoutant les quantités appropriées de tourbe et de sable, comme indiqué en (a) et en (c).

14. Les sources de tourbe, d'argile kaolinique et de sable doivent être connues. On vérifiera que les composants du sédiment ne sont pas contaminés par des substances chimiques (métaux lourds, composés organochlorés, composés organophosphorés, etc.). Un exemple de préparation de sédiment reconstitué est décrit à l'annexe 3. Les composants du sédiment peuvent aussi être mélangés à l'état sec, à condition de démontrer qu'ils ne se séparent pas après l'ajout de l'eau sus-jacente (flottement de particules de tourbe, par exemple) et que la tourbe ou le sédiment sont suffisamment conditionnés.

Eau

15. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable selon les critères spécifiés aux annexes 2 et 4 convient à l'essai. Toute eau appropriée, naturelle (eau superficielle ou souterraine), reconstituée (voir annexe 2) ou eau du robinet déchlorée, est acceptable comme eau de culture et d'essai, si les chironomes y survivent sur toute la durée de la culture et de l'essai sans manifester de signes de stress. Au début de l'essai, le pH de l'eau d'essai se situera entre 6 et 9 et sa dureté totale ne dépassera pas 400 mg/l en CaCO_3 . Néanmoins, si l'on suspecte une interaction entre les ions de dureté et la substance d'essai, il faut utiliser une eau moins dure (auquel cas le milieu Elendt M4 ne pourra pas être utilisé). Le même type d'eau doit être utilisé tout au long de l'étude. Les caractéristiques de qualité de l'eau énumérées à l'annexe 4 sont à mesurer au moins deux fois par an ou chaque fois qu'elles sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées.

Solutions-mères – eau chargée

16a. Les concentrations expérimentales sont calculées en fonction des concentrations dans la colonne d'eau surmontant le sédiment. Les solutions d'essai sont généralement préparées aux concentrations choisies par dilution d'une solution-mère. Il est préférable de préparer les solutions-mères en dissolvant la substance d'essai dans l'eau d'essai. Dans certains cas, il sera nécessaire d'utiliser des solvants ou des dispersants pour obtenir une solution-mère à la concentration voulue. Parmi les solvants appropriés, on peut citer l'acétone, l'éther monométhyle d'éthylène-glycol, l'éther diméthyle d'éthylène-glycol, le diméthylformamide et le triéthylène-glycol. Parmi les dispersants appropriés, citons le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0.01 % et le HCO-40. La concentration de l'agent solubilisant dans le milieu d'essai final doit être minimale (0.1 ml/l) et identique dans tous les traitements. En cas d'utilisation d'un agent solubilisant, celui-ci ne doit avoir aucun effet significatif sur la survie des chironomes, ce qui pourra être démontré par la comparaison d'un témoin solvant avec un témoin négatif (eau). Il faut cependant s'efforcer, dans toute la mesure du possible, d'éviter d'utiliser ces produits.

Solutions-mères – sédiment chargé

16b. On prépare généralement les sédiments chargés à la concentration souhaitée en ajoutant directement une solution de la substance d'essai au sédiment. Une solution-mère de la substance d'essai dissoute dans de l'eau désionisée est mélangée au sédiment reconstitué à l'aide d'un laminoir, d'un mélangeur d'aliments ou mélangée à la main. Si la substance d'essai est peu soluble dans l'eau, elle peut être dissoute dans un volume aussi faible que possible d'un solvant organique adéquat (hexane, acétone ou chloroforme, par exemple). Cette solution est ensuite mélangée à 10 g de sable quartzique fin par récipient expérimental. Il faut attendre que le solvant s'évapore jusqu'à être totalement éliminé du sable; le sable est ensuite mélangé avec la quantité appropriée de sédiment. Seuls des agents très volatils peuvent être utilisés

pour solubiliser, disperser ou émulsifier la substance d'essai. On n'oubliera pas de tenir compte de la quantité de sable apportée avec le mélange de substance d'essai et de sable lors de la préparation du sédiment (ce dernier sera préparé avec moins de sable). Il faudra veiller à mélanger complètement la substance d'essai au sédiment et à l'y répartir uniformément. Si nécessaire, on analysera des sous-échantillons afin de déterminer le degré d'homogénéité.

PROTOCOLE D'ESSAI

17. Le protocole d'essai définit le nombre et l'espacement des concentrations expérimentales, le nombre de récipients par concentration, le nombre de larves par récipient, et le nombre de cristallisoirs et de cages d'élevage. La marche à suivre pour établir la CE_x et la CSEO et pour réaliser un essai limite est décrite ci-dessous.

Conduite d'une analyse de régression

18. L'essai doit couvrir la concentration efficace (CE_x) et la gamme de concentrations auxquelles la substance d'essai produit un effet intéressant, de façon à ce que l'effet observé ne soit pas extrapolé hors des limites des données générées. On évitera d'extrapoler des résultats très en dessous de la concentration la plus faible ou au-dessus de la concentration la plus forte. Il pourra être utile de réaliser un essai préliminaire de détermination des concentrations d'essai, conformément aux lignes directrices 218 ou 219 de l'OCDE, de façon à définir la gamme des concentrations à utiliser.

19. Pour estimer la CE_x , un minimum de cinq concentrations et huit réplicats par concentration sont nécessaires. Pour chaque concentration, deux cages d'élevage seront utilisées (A et B). Les huit réplicats sont scindés en deux groupes de quatre réplicats (un groupe par cage). Ce regroupement des réplicats est nécessaire en raison du nombre de moucheron à atteindre dans les cages pour obtenir des évaluations fiables de leur reproduction. La 2^{ème} génération compte aussi huit réplicats, obtenus à partir des populations exposées dans les cages d'élevage. Le facteur séparant les concentrations ne doit pas excéder deux (une exception peut être faite si la courbe dose-effet présente une pente faible). Le nombre de réplicats par traitement peut être ramené à six (trois pour chaque cage d'élevage) si le nombre de concentrations expérimentales entraînant différents effets est augmenté. L'augmentation du nombre d'expériences identiques ou la diminution des écarts entre les concentrations expérimentales tend à réduire les intervalles de confiance autour de la CE_x .

Procédure d'estimation d'une CSEO

20. Pour estimer la CSEO, cinq concentrations expérimentales et au moins huit réplicats par concentration (quatre pour chaque cage d'élevage, A et B) seront nécessaires, le facteur séparant les concentrations n'excédant pas deux. Le nombre de réplicats doit être suffisant pour fournir une puissance statistique permettant de détecter une différence de 20 % avec le témoin, au seuil de signification statistique de 5 % ($\alpha = 0.05$). Pour la vitesse de développement, la fécondité et la fertilité, il est généralement utile d'effectuer une analyse de variance (ANOVA), suivie d'un test de Dunnett ou d'un test de Williams (22-25). S'agissant du taux d'émergence et du sex-ratio, le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haentzel peuvent être appropriés.

Essai limite

21. La conduite d'un essai limite peut être envisagée (sur une concentration expérimentale et un ou plusieurs témoins) si l'essai préliminaire facultatif de détermination des concentrations d'essai n'a permis d'observer aucun effet à une concentration maximale. L'essai limite a pour objet d'indiquer si des effets toxiques de la substance d'essai sont décelés à des niveaux supérieurs aux concentrations limites étudiées.

Les quantités recommandées sont 100 mg/l pour l'eau et 1 000 mg/kg (poids sec) pour le sédiment. Huit réplicats au moins sont généralement nécessaires pour le traitement et le témoin. Une puissance statistique suffisante pour détecter une différence de 20 % avec le témoin au seuil de signification statistique de 5 % ($\alpha = 0.05$) devrait être démontrée. Pour les mesures métriques (par exemple, la vitesse de développement), le test t constitue une méthode statistique appropriée si les données répondent aux critères de ce test (normalité, variances homogènes). Un test t de variance inégale ou bien un test non paramétrique tel que le test de Wilcoxon-Mann-Whitney peuvent être employés lorsque ces conditions ne sont pas satisfaites. S'agissant du taux d'émergence, le test exact de Fisher est approprié.

PROCÉDURE

Conditions d'exposition

Préparation du système eau-sédiment (eau chargée)

22a. Un sédiment reconstitué (voir paragraphes 13-14 et annexe 3) est introduit dans chaque récipient expérimental et dans le cristallisateur de façon à former une couche d'au moins 1.5 cm (qui peut être un peu moins épaisse dans le cristallisateur) et d'au plus 3 cm. L'eau (voir paragraphe 15) est ensuite versée de manière à ce que le rapport de l'épaisseur de la couche de sédiment à celle de la couche d'eau ne dépasse pas 1/4. Une fois la préparation des récipients expérimentaux achevée, le système sédiment-eau doit être soumis à une légère aération pendant environ sept jours avant l'introduction des chironomes au premier stade larvaire de la 1^{ère} ou de la 2^{ème} génération (voir paragraphe 14 et annexe 3). Le système sédiment-eau des cristallisateurs n'est pas aéré au cours de l'essai, car il n'a pas à assurer la survie des larves (avant l'éclosion, les amas d'œufs sont déjà collectés). Afin d'éviter la séparation des ingrédients du sédiment et la remise en suspension des particules fines lors du remplissage de la colonne d'eau, on peut recouvrir le sédiment d'un disque en plastique durant cette opération et retirer le disque juste après. D'autres dispositifs peuvent aussi convenir.

Préparation du système eau-sédiment (sédiment chargé)

22b. On dépose les sédiments chargés, préparés comme indiqué au paragraphe 16b, au fond des récipients et du cristallisateur avant d'y verser l'eau sus-jacente, de façon à obtenir un rapport volumique sédiment-eau de 1/4. La profondeur de la couche de sédiment doit être comprise entre 1.5 et 3 cm (elle peut être légèrement inférieure dans le cristallisateur). Afin d'éviter la séparation des ingrédients du sédiment et la remise en suspension des particules fines lors du remplissage de la colonne d'eau, on peut recouvrir le sédiment d'un disque en plastique durant cette opération et retirer le disque juste après. D'autres dispositifs peuvent aussi convenir. Une fois préparé le sédiment chargé surmonté d'une couche d'eau, il est souhaitable de laisser la substance d'essai se répartir entre la phase aqueuse et le sédiment (4) (5) (7) (18), de préférence dans les mêmes conditions de température et d'aération que durant l'essai. La durée d'équilibrage appropriée dépend du sédiment et de la substance chimique ; elle peut être de l'ordre de quelques heures à quelques jours, et dans de rares cas atteindre cinq semaines. Il ne faut pas attendre que l'équilibre soit atteint car de nombreuses substances auraient le temps de se dégrader, mais une période d'équilibrage de 48 heures est recommandée. Toutefois, s'il est connu que la demi-vie du composé dans le sédiment est longue (voir paragraphe 8), la durée d'équilibrage peut être allongée. Au terme de cette période d'équilibrage, on mesure la concentration de la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, l'eau interstitielle et le sédiment, au moins pour la concentration la plus élevée et une concentration plus faible (voir paragraphe 38). Ces déterminations analytiques de la substance d'essai permettent de calculer le bilan massique et d'exprimer les résultats en fonction des concentrations mesurées.

23. Les récipients expérimentaux sont couverts (par des plaques de verre, par exemple). Si nécessaire, on remplace les volumes d'eau évaporée durant l'étude avec de l'eau distillée ou déionisée afin

d'empêcher l'accumulation de sels. Les cristallisoirs placés dans les cages d'élevage ne sont pas couverts. Il est possible, mais pas indispensable, de remplacer l'eau perdue au cours de la durée de l'essai, puisque les amas d'œufs n'y sont en contact avec l'eau que pendant un jour environ, et que les cristallisoirs ne sont utilisés que pendant une courte phase de l'essai.

Introduction des organismes expérimentaux

24. Quatre à cinq jours avant l'introduction des larves du premier stade de la 1^{ère} génération, les amas d'œufs sont prélevés dans la culture et placés dans de petits récipients contenant du milieu de culture. Il est possible d'utiliser un milieu plus ancien issu de la culture-mère ou un milieu fraîchement préparé. Dans les deux cas, on ajoutera au milieu de culture une petite quantité de nourriture, par exemple quelques gouttelettes de filtrat d'une suspension de paillettes pour poissons finement broyées (voir annexe 2). Seuls des amas d'œufs fraîchement pondus peuvent être utilisés. Normalement, les larves commencent à éclore quelques jours après la ponte (2 à 3 jours pour *C. riparius* à 20°C, et 1 à 4 jours pour *C. dilutus* à 23°C et *C. yoshimatsui* à 25°C) et le développement des larves se déroule en quatre stades, chacun d'une durée de 4 à 8 jours. L'essai doit être réalisé avec des chironomes au premier stade larvaire (maximum 48 h après éclosion). Il est possible de vérifier le stade de développement des larves d'après la largeur de la capsule céphalique (7).

25. Vingt larves du premier stade de la première génération, choisies au hasard, sont déposées à l'aide d'une pipette émoussée dans chaque récipient contenant le système sédiment-eau. L'aération de l'eau est interrompue pendant 24 heures à compter de l'introduction des larves de premier stade dans les récipients expérimentaux (voir paragraphe 32). Selon le protocole expérimental suivi (voir paragraphes 19 et 20), le nombre de larves utilisées par concentration est d'au moins 120 (6 réplicats par concentration) pour la détermination de la CE_x et 160 pour la détermination de la CSEO (8 réplicats par concentration). Dans le protocole d'essai avec sédiment chargé, l'exposition débute lors de l'introduction des larves.

Chargement de l'eau sus-jacente

26. Vingt-quatre heures après l'introduction des chironomes au premier stade larvaire de la 1^{ère} génération dans les récipients expérimentaux, la substance d'essai est ajoutée à la colonne d'eau sus-jacente qui est de nouveau soumise à une légère aération (pour les modifications possibles du protocole d'essai, voir paragraphe 7). De faibles volumes des solutions-mères de la substance d'essai sont injectés à l'aide d'une pipette sous la surface de l'eau. Puis on mélange doucement l'eau sus-jacente en prenant soin de ne pas remuer le sédiment. Dans le protocole d'essai avec eau chargée, l'exposition débute avec l'ajout de la substance dans l'eau (c'est à dire un jour après l'introduction des larves).

Collecte des adultes émergés

27. Les moucherons émergés de la 1^{ère} génération sont collectés au moins une fois, mais de préférence deux fois, par jour (voir paragraphe 36) dans les récipients expérimentaux à l'aide d'un aspirateur, d'un extracteur ou d'un autre dispositif similaire (voir annexe 5). Il convient de prendre toutes les précautions nécessaires pour ne pas endommager les adultes. Les moucherons prélevés dans les quatre récipients expérimentaux ayant reçu le même traitement sont transférés dans la cage d'élevage qui leur a été attribuée préalablement. Le jour où apparaissent les premiers moucherons (mâles), on charge les cristallisoirs en injectant à l'aide d'une pipette un faible volume de la solution-mère de substance d'essai sous la surface de l'eau (protocole avec eau chargée). Ensuite, on mélange doucement l'eau sus-jacente en prenant soin de ne pas remuer le sédiment. La valeur nominale de la concentration de substance d'essai est la même dans le cristallisoir que dans les récipients de traitement associés à cette cage d'élevage précise. Dans le protocole avec sédiment chargé, les cristallisoirs sont préparés vers le 11^{ème} jour après le début de

l'exposition (c'est-à-dire à compter de l'introduction de la 1^{ère} génération de larves), de façon à ce que l'équilibrage soit achevée environ 48 heures avant la ponte des premiers amas d'œufs.

28. Les amas d'œufs sont collectés dans les cristallisoirs de la cage d'élevage à l'aide de pinces ou d'une pipette émuée. Chaque amas est placé dans un récipient contenant un milieu de culture provenant du cristallisoir d'origine de l'amas (par exemple l'un des 12 puits d'une plaque de microtitration avec au moins 2.5 ml de milieu). Les récipients contenant les amas sont fermés par un couvercle afin d'éviter une évaporation importante. Les amas sont gardés en observation pendant 6 jours au minimum après la ponte, afin que l'on puisse les classer comme fertiles ou stériles.

Pour démarrer la 2^e génération, on choisit dans chaque cage d'élevage trois amas d'œufs fertiles au minimum, mais de préférence six, que l'on laisse éclore en présence d'un peu de nourriture. Ces amas devront avoir été produits lors du pic de ponte, qui intervient normalement autour du 19^{ème} jour d'essai dans les récipients témoins. Dans l'idéal, tous les traitements sur la 2^{ème} génération démarrent le même jour, mais en raison des effets liés aux substances d'essai sur le développement des larves, cela n'est pas toujours possible. Dans ce cas, mieux vaut lancer les traitements aux concentrations plus élevées après les traitements plus faibles et le témoin (solvant).

29a. Dans le protocole avec eau chargée, le système sédiment-eau destiné à la 2^{ème} génération se prépare en ajoutant la substance d'essai dans la colonne d'eau sus-jacente environ 1 heure avant d'introduire les larves de premier stade dans les récipients expérimentaux. De faibles volumes des solutions contenant la substance d'essai sont injectés sous la surface de la colonne d'eau à l'aide d'une pipette. Ensuite, on mélange doucement l'eau sus-jacente en prenant soin de ne pas remuer le sédiment. Une fois la substance ajoutée, on procède à une légère aération.

29b. Dans le protocole avec sédiment chargé, les récipients d'exposition contenant le système sédiment-eau pour la 2^{ème} génération sont préparés de la même façon que ceux de la 1^{ère} génération.

30. Vingt larves de premier stade (48 heures maximum après éclosion) de la 2^{ème} génération, choisies au hasard, sont déposées à l'aide d'une pipette émuée dans chaque récipient expérimental contenant le système eau-sédiment chargé. L'aération de l'eau doit être interrompue pendant au moins 24 heures à compter de l'introduction des larves de premier stade dans les récipients expérimentaux. Selon le protocole expérimental suivi (voir paragraphes 19 et 20), le nombre de larves utilisées par concentration sera d'au moins 120 (6 réplicats par concentration) pour la détermination de la CE_x et 160 pour la CSEO (8 réplicats par concentration).

Nourriture

31. Les larves ont besoin d'être nourries dans les récipients expérimentaux, de préférence quotidiennement ou au moins trois fois par semaine. Durant les dix premiers jours, chaque jeune larve reçoit quotidiennement 0.25 à 0.5 mg (0.35-0.5 mg pour *C. yoshimatsui*) de nourriture pour poissons (en suspension dans l'eau ou finement broyée, par exemple Tetra-Min ou Tetra-phyll; voir les détails à l'annexe 2). Il peut être nécessaire d'augmenter légèrement cette quantité pour les larves plus âgées: 0.5-1 mg par larve et par jour devrait suffire pour le reste de l'essai. On diminue la ration alimentaire de tous les organismes traités et témoins si l'on constate le développement de champignons ou en cas de mortalité parmi les organismes témoins. Si la croissance fongique ne peut être enrayée, l'essai est à recommencer.

La pertinence toxicologique de l'exposition par ingestion est généralement plus grande pour les substances possédant une forte affinité pour le carbone organique ou les substances formant des liaisons de covalence avec le sédiment. Ainsi, lors d'essais sur des substances présentant de telles propriétés, la quantité de nourriture nécessaire à la survie et à la croissance naturelle des larves peut être incorporée au sédiment reconstitué avant la période de stabilisation, en fonction de la réglementation imposée. Afin d'éviter de détériorer la qualité de l'eau, la nourriture pour poissons est remplacée par une ration végétale, par

exemple 0.5 % (poids sec) de feuilles finement broyées d'ortie (*Urtica dioeca*), de mûrier (*Morus alba*), de trèfle blanc (*Trifolium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*) ou d'un autre matériel végétal (*Cerophyl* ou alpha-cellulose). Incorporer toute la ration alimentaire d'origine organique au sédiment avant d'ajouter la substance d'essai n'est pas sans conséquence sur la qualité et les performances biologiques de l'eau (21), et ne constitue pas non plus une méthode normalisée; toutefois de récentes études indiquent que cette méthode fonctionne (19) (26). Les moucheron adultes de la cage d'élevage n'ont en principe pas besoin d'être nourris, mais la fécondité et la fertilité augmentent si l'on propose aux adultes émergés un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucrose saturée (34).

Conditions d'incubation

32. L'eau sus-jacente des récipients expérimentaux est soumise à une légère aération, mise en route 24 heures après l'introduction des larves du premier stade des deux générations, et maintenue jusqu'à la fin de l'essai (il faut veiller à ce que la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas en dessous de 60 % de la VSA). L'air est insufflé à l'aide d'une pipette Pasteur en verre dont l'extrémité est fixée 2 à 3 cm au-dessus de la couche de sédiment et délivre quelques bulles par seconde. Si la substance d'essai est volatile, on pourra éventuellement supprimer l'aération du système sédiment-eau, à condition de respecter le critère de validité de 60 % de la VSA (voir paragraphe 10). D'autres indications sont données à la référence (16).

33. L'essai sur *C. riparius* est mené à une température constante de 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Pour *C. dilutus* et *C. yoshimatsui*, les températures recommandées sont respectivement de 23°C et 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). La photopériode est de 16 heures et l'intensité lumineuse comprise entre 500 et 1 000 lux. Une phase supplémentaire d'une heure récréant l'aube et le crépuscule peut être prévue pour les cages d'élevage.

Temps d'exposition

34. Protocole avec eau chargée: la période d'exposition de la 1^{ère} génération commence lorsque la substance d'essai est injectée dans l'eau sus-jacente des récipients expérimentaux (c'est-à-dire un jour après l'introduction des larves; voir au paragraphe 7 les modifications possibles du protocole d'exposition). L'exposition de la 2^{ème} génération de larves débute immédiatement, car elles sont introduites dans un système sédiment-eau déjà chargé. Pour *C. riparius* et *C. yoshimatui*, le temps d'exposition maximal est de 27 jours pour la 1^{ère} génération, et de 28 jours pour la 2^{ème} génération (les larves de la 1^{ère} génération passent une journée dans les récipients sans exposition). Compte tenu du chevauchement des deux expositions, la durée totale de l'essai est d'environ 44 jours. Pour *C. dilutus*, les durées maximales d'exposition sont de 64 et 65 jours respectivement pour la 1^{ère} et la 2^{ème} génération. Au total, l'essai dure environ 100 jours.

Protocole avec sédiment chargé: l'exposition débute avec l'introduction des larves et dure au maximum 28 jours pour les deux générations de *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, et 65 jours au maximum pour les deux générations de *C. dilutus*.

Observations

Émergence

35. La durée du développement et le nombre total de moucheron mâles et femelles adultes totalement émergés et vivants sont à déterminer pour les deux générations. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses et leur corps fin.

36. Au moins trois fois par semaine, on vérifie que les larves des récipients expérimentaux des deux générations ne manifestent aucun comportement anormal (sortie du sédiment, nage inhabituelle, par exemple) par rapport aux témoins. Au cours de la période d'émergence, qui débute environ 12 jours après

l'introduction des larves pour *C. riparius* et *C. yoshimatus* (20 jours après pour *C. dilutus*), les moucheron émergés sont dénombrés et leur sexe est identifié au moins une fois, mais de préférence deux fois par jour (tôt le matin et en fin d'après-midi). Une fois identifiés, les moucheron de la première génération sont retirés avec soin des récipients et transférés dans une cage d'élevage. Les moucheron de la deuxième génération sont retirés et tués après identification. Les amas d'œufs déposés dans les récipients expérimentaux de la 1^{ère} génération doivent être collectés individuellement et transférés avec au moins 2.5 ml d'eau de formation dans des plaques de microtitration à 12 puits (ou tout autre récipient adapté) fermées par un couvercle afin d'éviter une évaporation importante. Le nombre de larves mortes et de pupes visibles n'ayant pas émergé doit également être consigné. L'annexe 5 présente des exemples de cage d'élevage, de récipient expérimental et d'extracteur.

Reproduction

37. On évalue les effets sur la reproduction en déterminant le nombre d'amas d'œufs produits par la première génération de moucheron et la fertilité de ces amas. Une fois par jour, les amas d'œufs sont collectés dans le cristalliseur de chaque cage d'élevage, et transférés avec au moins 2.5 ml d'eau de formation dans des plaques de microtitration à 12 puits (un amas par puits) ou d'autres récipients adaptés, fermés d'un couvercle afin d'éviter une évaporation importante. Les caractéristiques suivantes doivent être consignées par écrit pour chaque amas d'œufs: jour de ponte, taille (normale, soit 1.0 ± 0.3 cm, ou petite, généralement ≤ 0.5 cm), structure (normale = en forme de croissant avec cordon d'œufs spiralé, ou anormale, par exemple avec cordon non spiralé) et fertilité (fertile ou stérile). Sur une période de six jours après sa ponte, la fertilité de chaque amas d'œufs est évaluée. Un amas est considéré comme fertile lorsqu'au moins un tiers des œufs éclot. Le nombre total de femelles transférées dans la cage d'élevage sert à calculer le nombre d'amas d'œufs par femelle, et le nombre d'amas fertiles par femelle. Si nécessaire, le nombre d'œufs par amas peut être estimé de manière non destructive par la méthode des anneaux (expliquée dans les références 32 et 33).

Mesures analytiques

Concentration de la substance d'essai

38. Il est recommandé d'analyser, au minimum, des échantillons de l'eau sus-jacente, de l'eau interstitielle et du sédiment au début de l'exposition (en cas d'eau chargée, de préférence une heure après l'application) et à la fin de l'essai, et ce pour la concentration la plus élevée et pour une concentration plus faible. Cette recommandation s'applique aux récipients des deux générations. Dans les cristalliseurs de la cage d'élevage, seule l'eau sus-jacente est analysée, car c'est avec elle que les amas d'œufs entrent en contact (pour le protocole avec sédiment chargé, une confirmation analytique de la concentration sédimentaire peut être envisagée). Si cela est jugé nécessaire, d'autres mesures concernant le sédiment, l'eau interstitielle et l'eau sus-jacente peuvent être effectuées au cours de l'essai. La concentration de la substance d'essai nous renseigne sur le comportement et la répartition de la substance d'essai dans le système eau-sédiment. Des échantillons de sédiment et d'eau interstitielle devant être prélevés au début et au cours de l'essai (voir paragraphe 39), on prévoira des récipients expérimentaux supplémentaires afin de réaliser les déterminations analytiques. Il n'est pas forcément nécessaire d'analyser le sédiment dans le protocole avec eau chargée si la répartition de la substance d'essai entre l'eau et le sédiment a été clairement déterminée par une étude eau/sédiment menée dans des conditions comparables (par exemple, rapport sédiment/eau, type d'application, teneur en carbone organique du sédiment), ou si les concentrations mesurées dans l'eau sus-jacente restent comprises entre 80 et 120 % des valeurs nominales ou mesurées initialement.

39. Lorsqu'on effectue des mesures intermédiaires (par exemple au 7^{ème} et/ou 14^{ème} jour) et si l'analyse requiert des échantillons volumineux qui ne peuvent être prélevés des récipients sans influencer le

système expérimental, les analyses seront pratiquées sur des échantillons provenant de récipients expérimentaux supplémentaires traités de la même façon (y compris par la présence des organismes d'expérience), mais non utilisés pour les observations biologiques.

40. Pour isoler l'eau interstitielle, il est recommandé de centrifuger les échantillons à 10 000 g et à 4°C durant 30 minutes. Cependant, s'il est démontré que la substance d'essai n'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Avec des échantillons trop petits, il arrive que les concentrations dans l'eau interstitielle soient impossibles à analyser.

Paramètres physico-chimiques

41. Le pH, l'oxygène dissous dans l'eau d'essai et la température de l'eau dans les récipients expérimentaux et les cristallisoirs sont mesurés de façon appropriée (voir paragraphe 10). La dureté de l'eau et sa teneur en ammoniac sont mesurées dans les récipients témoins ainsi que dans un récipient d'essai et un cristallisoir à la concentration la plus élevée, au début et à la fin de l'essai.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

42. Cet essai sur le cycle de vie a pour objet de déterminer l'effet de la substance d'essai sur la reproduction et, pour deux générations, sur la vitesse de développement et le nombre total de mouches mâles et femelles vivants complètement émergés. Pour déterminer le taux d'émergence, il faut rassembler les données concernant les mâles et les femelles. S'il n'existe pas de différence de sensibilité statistiquement significative entre les deux sexes en matière de vitesse de développement, les résultats mâles et femelles pourront être mis en commun à des fins d'analyse statistique.

43. Il est d'usage de calculer les concentrations efficaces, exprimées en concentrations dans l'eau sus-jacente (pour l'eau chargée) ou dans le sédiment (pour le sédiment chargé), en fonction des concentrations mesurées au début de l'exposition (voir paragraphe 38). Ainsi, en ce qui concerne l'eau chargée, on effectue habituellement pour chaque traitement une moyenne des concentrations initialement mesurées dans l'eau sus-jacente des récipients des deux générations et de celles des cristallisoirs. En ce qui concerne les sédiments chargés, on effectue habituellement pour chaque traitement une moyenne des concentrations initialement mesurées dans les sédiments des récipients des deux générations (et éventuellement de celles des cristallisoirs).

44. Pour calculer une estimation ponctuelle, c'est-à-dire une CE_x , les statistiques par récipient et par cage d'élevage peuvent être utilisées comme répliquats vrais. Pour calculer un intervalle de confiance pour une CE_x quelconque, il faut tenir compte de la variabilité entre les récipients, ou démontrer que celle-ci est négligeable. Si le modèle est ajusté par la méthode des moindres carrés, il convient de transformer les statistiques par récipient afin d'accroître l'homogénéité de la variance. Toutefois, les valeurs de la CE_x sont à calculer après que les résultats ont été transformés à nouveau de façon à recouvrer la valeur d'origine (31).

45. Si l'analyse statistique vise à déterminer la CSEO par un test d'hypothèse, il est nécessaire de prendre en compte la variabilité entre les récipients, ce que garantissent les méthodes d'analyse de la variance (procédures de Williams et Dunnett par exemple). Le test de Williams est approprié lorsque la relation dose-effet est supposée être monotone en théorie, tandis que le test de Dunnett convient si l'hypothèse de la monotonie ne tient pas. En revanche, des tests plus robustes (27) peuvent être utilisés au cas où les hypothèses habituelles de l'analyse de variance (ANOVA) ne se vérifient pas (31).

Taux d'émergence

46. Les données relatives au taux d'émergence sont des données quantales, qui peuvent être analysées par le test de Cochran-Armitage appliqué de façon régressive si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Dans le cas contraire, un test exact de Fisher ou un test de Mantel-Haentz avec des valeurs de p corrigées selon Bonferroni-Holm peuvent être employés. S'il s'avère que la variabilité entre réplicats à la même concentration est supérieure à ce qu'une distribution binomiale indiquerait (variation souvent qualifiée d'« extra-binomiale »), on appliquera un test plus robuste (Cochran-Armitage ou test exact de Fisher) comme proposé à la référence (27).

La somme des mouchérons (mâles et femelles) vivants émergés par récipient, n_e , est déterminée et divisée par le nombre de larves introduites, n_a :

$$TE = \frac{n_e}{n_a}$$

Où :

TE	=	taux d'émergence
n_e	=	nombre de mouchérons vivants émergés par récipient
n_a	=	nombre de larves introduites par récipient (normalement 20)

Lorsque n_e est supérieur à n_a (c'est-à-dire lorsqu'involontairement, un nombre de larves plus important que prévu a été introduit), n_a doit être augmenté pour être égal à n_e .

47. Une autre approche plus appropriée aux échantillons de grande taille, lorsque la variance est extra-binomiale, consiste à traiter le taux d'émergence comme une réponse continue et à appliquer une méthode cohérente avec ces données du TE . On considère ici qu'un échantillon est de grande taille lorsque le nombre de mouchérons émergés et le nombre de chironomes non émergés sont tous deux supérieurs à cinq par (récipient de) réplicat.

48. Avant d'appliquer l'analyse de variance (ANOVA), il faut d'abord transformer les valeurs du TE par arcsinus-racine carrée ou selon Tukey-Freeman, afin d'obtenir une distribution proche de la normale et d'égaliser les variances. Le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haentz peuvent être employés lorsqu'on utilise les fréquences absolues. La transformation arcsinus-racine carrée consiste à calculer le sinus inverse (\sin^{-1}) de la racine carrée du TE .

49. Pour les taux d'émergence, les valeurs de la CE_x sont calculées au moyen d'une analyse de régression [modèles probit, logit ou Weibull (28), par exemple]. Si l'analyse de régression échoue (par exemple, lorsqu'il y a moins de deux réponses partielles), on fait appel à d'autres méthodes non paramétriques telles que la moyenne mobile ou l'interpolation simple.

Vitesse de développement

50. La période moyenne de développement correspond au temps moyen écoulé entre l'introduction des larves (jour 0 de l'essai) et l'émergence de la cohorte expérimentale de mouchérons (pour calculer la période réelle de développement, il faut tenir compte de l'âge des larves au moment de l'introduction). La vitesse de développement est l'inverse de la période de développement (unité: 1/jour) et correspond à la

portion de développement larvaire qui s'effectue par jour. Pour évaluer la toxicité dans les sédiments, il est préférable de choisir la vitesse de développement car sa variance est plus faible et ses valeurs sont plus homogènes et plus proches d'une distribution normale, en comparaison avec la période de développement. C'est pourquoi des tests paramétriques plus puissants conviennent mieux à la vitesse de développement qu'à la période de développement. Si la vitesse de développement est traitée comme une réponse continue, les valeurs de la CE_x peuvent être estimées par une analyse de régression (voir (29) (30)). Les méthodes d'analyse de la variance (ANOVA), telles que les essais de Williams ou Dunnett, permettent de déterminer une CSEO pour la vitesse moyenne de développement. Les mouchérons mâles émergent plus tôt que les femelles, et présentant donc une vitesse de développement plus rapide, il est pertinent de calculer la vitesse de développement de chacun des sexes, en plus de celle de l'ensemble des mouchérons.

51. Pour les tests statistiques, les mouchérons observés le jour x sont considérés comme ayant émergé au milieu de l'intervalle de temps compris entre le jour x et le jour $x-1$ ($1 =$ longueur de l'intervalle d'observation, habituellement 1 jour). La vitesse de développement moyenne par récipient (\bar{x}) est calculée comme suit :

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

où :

- \bar{x} : vitesse de développement moyenne par récipient
- i : indice de l'intervalle d'observation
- m : nombre maximal d'intervalles d'observation
- f_i : nombre de mouchérons émergés durant l'intervalle d'observation i
- n_e : nombre total de mouchérons émergés à la fin de l'expérience ($= \sum f_i$)
- x_i : vitesse de développement des mouchérons émergés durant l'intervalle i

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{jour}_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

où :

- jour_i : jour d'observation (nombre de jours depuis l'introduction des larves)
- l_i : longueur de l'intervalle d'observation i (exprimée en jours, habituellement 1 jour)

Sex-ratio

52. Les données relatives au sex-ratio sont des données quantales qui doivent donc être évaluées au moyen d'un test exact de Fisher ou d'autres méthodes appropriées. Le sex-ratio naturel de *C. riparius* est de un, c'est-à-dire que le nombre de mâles est égal au nombre de femelles. Le sex-ratio doit être calculé de la même manière pour les deux générations. Le nombre maximum de mouchérons par récipient (soit 20) étant trop faible pour permettre des analyses statistiques significatives, on additionnera le nombre total de mouchérons complètement émergés et vivants de chaque sexe dans tous les récipients d'un même traitement. Ces données brutes sont comparées au témoin (solvant) ou aux résultats des témoins groupés dans un tableau à double entrée (2 x 2).

Reproduction

53. La reproduction, tout comme la fécondité, est calculée comme le nombre d'amas d'œufs par femelle. Plus précisément, le nombre total d'amas d'œufs produits dans une cage d'élevage est divisé par le nombre total de femelles vivantes et en bonne santé introduites dans cette cage. Il est possible de déterminer une CSEO pour la fécondité en utilisant des méthodes d'analyse de variance (ANOVA) telles que le test de Williams ou de Dunnett.

54. La fertilité des amas d'œufs sert à quantifier le nombre d'amas fertiles par femelle. Le nombre total d'amas fertiles produits dans une cage d'élevage est divisé par le nombre total de femelles vivantes et en bonne santé introduites dans cette cage. Il est possible de déterminer une CSEO pour la fertilité en utilisant des méthodes d'analyse de variance (ANOVA) telles que le test de Williams ou de Dunnett.

Rapport d'essai

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

Substance d'essai:

- état physique et propriétés physico-chimiques [par exemple, hydrosolubilité, pression de vapeur, $\log K_{oc}$, coefficient de partage dans le sol (ou dans le sédiment s'il est connu), stabilité dans l'eau et dans le sédiment, etc.];
- identification chimique (nom courant, nom chimique, formule structurale, numéro CAS, etc.), pureté et méthode analytique de dosage de la substance d'essai.

Espèces d'essai:

- organismes utilisés pour l'essai: espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage;
- informations sur la manipulation des amas d'œufs et des larves;
- informations sur la manipulation des adultes émergés de la 1^{ère} génération à l'aide d'un extracteur ou autre appareil (voir annexe 5);
- âge des organismes d'essai au moment de leur introduction dans les récipients expérimentaux de la 1^{ère} et de la 2^{ème} génération.

Conditions de l'essai:

- sédiment utilisé, c'est-à-dire naturel ou reconstitué (artificiel);
- pour les sédiments naturels : localisation et description du site de prélèvement avec, si possible, son historique de contamination ; caractéristiques du sédiment : pH, teneur en carbone organique, rapport C/N et granulométrie (s'il y a lieu);
- pour les sédiments reconstitués : préparation, ingrédients et caractéristiques (teneur en carbone organique, pH, humidité, etc. mesurés au début de l'essai);
- préparation de l'eau d'essai (si l'eau est reconstituée) et caractéristiques (concentration d'oxygène, pH, dureté, etc. mesurés au début de l'essai);
- profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente dans les récipients expérimentaux et les cristallisoirs;
- volume d'eau sus-jacente et d'eau interstitielle ; poids du sédiment humide avec et sans eau interstitielle dans les récipients expérimentaux et les cristallisoirs;
- récipients expérimentaux (matériau et dimension);
- cristallisoirs (matériau et dimension);

- cages d'élevage (matériau et dimension);
- méthode de préparation des solutions-mères et concentrations d'essai pour les récipients expérimentaux et les cristallisoirs;
- application de la substance d'essai dans les récipients d'essai et les cristallisoirs: concentrations d'essai, nombre de réplicats et solvants, si nécessaire;
- conditions d'incubation des récipients d'essai : température, cycle et intensité de lumière, aération (nombre de bulles par seconde);
- conditions d'incubation pour les cages d'élevage et les cristallisoirs : température, cycle et intensité de lumière;
- conditions d'incubation pour les amas d'œufs dans les plaques de microtitration (ou autres récipients) : température, cycle et intensité de lumière;
- informations détaillées sur la nourriture, notamment: type, préparation, quantité et régime d'administration.

Résultats:

- concentrations d'essai nominales, concentrations d'essai mesurées et résultats de toutes les analyses conduites pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans les récipients expérimentaux et les cristallisoirs;
- qualité de l'eau dans les récipients expérimentaux et les cristallisoirs : pH, température, oxygène dissous, dureté et teneur en ammoniac;
- remplacement de l'eau d'essai évaporée dans les récipients expérimentaux, le cas échéant;
- nombre de moucheron mâles et femelles émergés par récipient et par jour pour la 1^{ère} et la 2^{ème} génération;
- sex-ratio des moucheron entièrement émergés et vivants par traitement pour la 1^{ère} et la 2^{ème} génération;
- nombre de larves non émergées sous la forme de moucheron par récipient pour la 1^{ère} et la 2^{ème} génération;
- pourcentage/fraction d'émergence par réplicat et concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucheron mâles et femelles) pour la 1^{ère} et la 2^{ème} génération;
- vitesse moyenne de développement des moucheron entièrement émergés et vivants par réplicat et par concentration d'essai (résultats séparés pour les moucheron mâles et femelles, ainsi que résultats regroupés) pour la 1^{ère} et la 2^{ème} génération;
- nombre d'amas d'œufs déposés dans les cristallisoirs par cage d'élevage et par jour ;
- caractéristiques de chaque amas d'œufs (taille, forme et fertilité);
- fécondité – nombre total d'amas d'œufs sur nombre total de femelles introduites dans la cage d'élevage;
- fertilité – nombre total d'amas fertiles sur nombre total de femelles introduites dans la cage d'élevage;
- estimation des effets toxiques observés, par exemple CE_x (et intervalles de confiance associés), CSEO et méthodes statistiques employées pour la déterminer;
- discussion des résultats, notamment influence éventuelle sur les résultats de l'essai d'écarts par rapport à cette Ligne directrice.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2004), *Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau chargée-sédiment*, Ligne directrice No. 219, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- (2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. et M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus (Camptochironomus) tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae), *Entomologica Scandinavica*, 30 : 311–322.
- (3) Fleming, R. *et al.* (1994), *Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances*, Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738, Août 1994, WRc, Royaume-Uni.
- (4) SETAC (1993), *Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments*, Document de l'atelier sur l'évaluation de la toxicité des sédiments (WOSTA) tenu aux Pays-Bas.
- (5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: *Annual Book of ASTM Standards. Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology*, ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (6) Environnement Canada (1997), *Essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (Chironomus tentans ou Chironomus riparius) dans les sédiments, Méthode d'essai biologique*, Rapport SPE 1/RM/32, Décembre 1997.
- (7) US-EPA (2000), *Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates*. Deuxième édition, EPA 600/R-99/064. Mars 2000, Révision de la première édition (datant de juin 1994).
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), *Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates*.
- (9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), *Chironomid Sediment toxicity Test*.
- (10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. et R.S. Kirby (1996), *Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (Hyalella azteca) and midge larvae (Chironomus riparius)*, Technical Report, Environnement Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.
- (11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. et C.D. Rowland (2006), *Interlaboratory evaluation of Hyalella azteca and Chironomus tentans short-term and long-term sediment toxicity tests*, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 2662-2674.
- (12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. et L. Weltje (2007), *Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides*, *Ecotoxicology*, 16: 221-230.
- (13) Sugaya, Y. (1997), *Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in Chironomus yoshimatsui*, *Jp. J. Sanit. Zool.*, 48: 345-350.

- (14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), *Jp. J. Sanit. Zool.*, 37: 47-57.
- (15) OCDE (2004), *Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau - sédiment chargé*, Ligne directrice n° 218, Lignes directrices pour le essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- (16) OCDE (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Publications de l'OCDE sur l'environnement, la santé et la sécurité, Série de l'OCDE sur les essais et évaluations n° 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OCDE, Paris.
- (17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. et M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, *Integr. Environ. Assess. Management*.
- (18) Environnement Canada. (1995), Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité au moyen de sédiments de contrôle dopés avec un produit toxique de référence. Rapport SPE 1/RM/30, Septembre 1995.
- (19) Oetken, M., Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. et J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 353-361.
- (20) Suedel, B.C. et J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1163-1175.
- (21) Naylor, C. et C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere*, 31: 3291-3303.
- (22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *J. Amer. Statis. Assoc.*, 50: 1096-1121.
- (23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, 20: 482-491.
- (24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, 27: 103-117.
- (25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, 28: 510-531.
- (26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. et H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition, *J Soils Sediments*, 9: 94-102.
- (27) Rao, J.N.K. et A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics*, 48: 577-585.

- (28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, *Water Res.*, 18: 213-221.
- (29) Bruce, R.D. et D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 1485-1494.
- (30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints, *Toxicol. Sci.*, 66: 298-312.
- (31) 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 évaluations, Document d'orientation de l'OCDE n°54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OCDE, Paris.
- (32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. et G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1165-1176.
- (33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. et J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) – baseline experiments for future multi-generation studies, *J. Environ. Sci. Health Part A*, 42: 1-9.
- (34) OECD (2010), *Validation report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

ANNEXE 1

DÉFINITIONS

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente Ligne directrice :

Un sédiment reconstitué, artificiel ou synthétique désigne un mélange de matériaux utilisés pour reproduire au mieux les composants physiques d'un sédiment naturel.

L'eau sus-jacente est l'eau surmontant le sédiment dans le récipient expérimental.

L'eau interstitielle, ou eau des pores, est l'eau qui occupe l'espace entre le sédiment et les particules de sol.

L'eau chargée est l'eau d'essai à laquelle a été ajoutée la substance d'essai.

ANNEXE 2

RECOMMANDATIONS POUR LA CULTURE DE *CHIRONOMUS RIPARIUS*

1. Les larves de *Chironomus* peuvent être élevées dans des cristallisoirs ou de grands récipients. Du sable quartzique fin est déposé en couche mince (environ 5 à 10 mm d'épaisseur) au fond du récipient. Le Kieselguhr (par exemple l'art. 8117 de Merck) convient aussi comme substrat (une couche encore plus mince de quelques millimètres à peine suffit). Une eau de qualité appropriée, profonde de plusieurs centimètres, vient ensuite recouvrir le substrat. En cas d'évaporation, le niveau d'eau doit toujours être ramené à sa hauteur initiale, afin de prévenir toute dessiccation. L'eau peut être remplacée si nécessaire. Une légère aération est fournie. Les récipients d'élevage des larves doivent être placés dans des cages appropriées, afin d'empêcher la fuite des adultes émergeant. La cage sera suffisamment grande pour permettre aux adultes émergés d'essaimer, sans quoi la copulation risque de ne pas avoir lieu (dimensions minimales : 30 x 30 x 30 cm).

2. Les cages sont gardées à température ambiante, ou à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ si elles sont placées dans une chambre à ambiance constante, avec une photopériode de 16 heures de lumière (intensité : environ 1 000 lux) et 8 heures d'obscurité. Une humidité relative de l'air inférieure à 60 % serait susceptible d'empêcher la reproduction.

Eau de dilution

3. Toute eau naturelle ou reconstituée appropriée peut être utilisée. De l'eau de puits, de l'eau du robinet déchlorée et un milieu artificiel (Elendt « M4 » ou « M7 », voir ci-après) sont souvent utilisés. L'eau est aérée avant l'emploi. Si nécessaire, on peut renouveler l'eau de culture en versant ou en siphonnant soigneusement l'eau usée des récipients expérimentaux, sans détruire les tubes larvaires.

Alimentation des larves

4. Les larves de *Chironomus* reçoivent des paillettes pour poissons (Tetra Min[®], Tetra Phyll[®] ou une autre marque déposée équivalente), à raison d'environ 250 mg par récipient et par jour. Cette nourriture peut être administrée sous la forme d'une poudre moulue à sec ou d'une suspension dans l'eau: 1.0 g de paillettes ajoutées à 20 ml d'eau de dilution et agitées de façon à obtenir un mélange homogène. Cette préparation peut être administrée à raison d'environ 5 ml par récipient et par jour (agiter avant emploi). Les larves plus âgées peuvent en recevoir plus.

5. La nourriture est ajustée en fonction de la qualité de l'eau. Si le milieu de culture devient trouble, il convient de réduire la ration. Les quantités de nourriture données sont soigneusement notées. Une insuffisance de nourriture fera émigrer les larves vers la colonne d'eau, tandis qu'un excès de nourriture intensifiera l'activité microbienne et abaissera la concentration d'oxygène. Ces deux conditions sont susceptibles de ralentir la croissance des organismes.

6. Certaines cellules d'algues vertes (*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*, par exemple) peuvent aussi être ajoutées lors de la préparation de nouveaux récipients de culture.

Alimentation des adultes émergents

7. Certains expérimentateurs ont suggéré de nourrir les adultes émergés au moyen d'un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucrose saturée.

Émergence

8. À $20 \pm 2^\circ\text{C}$, les adultes commencent à émerger des récipients d'élevage des larves après environ 13 à 15 jours. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses et leur corps fin.

Amas d'œufs

9. Dès que des adultes sont présents dans la cage d'élevage, il faut vérifier trois fois par semaine, dans tous les récipients d'élevage de larves, si des amas d'œufs gélatineux ont été déposés. Si tel est le cas, les amas d'œufs doivent être soigneusement enlevés et transférés dans un petit récipient contenant un échantillon de l'eau d'élevage. Les amas d'œufs servent à préparer un nouveau récipient de culture (2 à 4 amas d'œufs par récipient, par exemple) ou à pratiquer des essais de toxicité.

10. Les larves du premier stade devraient éclore après 2-3 jours.

Préparation de nouveaux récipients de culture

11. Une fois que les cultures ont été lancées, il devrait être possible de préparer un nouveau récipient de culture de larves, une fois par semaine ou moins souvent, suivant les besoins de l'essai, et de retirer les récipients plus anciens après l'émergence des moucheron adultes. Ce système permet d'obtenir régulièrement un contingent d'adultes, avec une organisation minimale.

Préparation des solutions d'essai « M4 » et « M7 »

12. Elendt (1990) a décrit le milieu « M4 ». Le milieu « M7 » est préparé comme le milieu « M4 », sauf pour les substances indiquées au tableau 1, dont les concentrations sont quatre fois plus faibles dans le milieu « M7 » que dans le milieu « M4 ». La solution d'essai ne doit pas être préparée selon les instructions d'Elendt et Bias (1990), car les concentrations de $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 et K_2HPO_4 indiquées pour la préparation des solutions-mères ne conviennent pas.

Préparation du milieu « M7 »

13. Chaque solution-mère (I) est préparée séparément et une solution-mère combinée (II) est préparée à partir de ces solutions-mères (I) (voir tableau 1). Cinquante millilitres de la solution-mère combinée (II), additionnés de la quantité de chaque solution-mère de macronutriments indiquée au tableau 2, sont amenés à 1 litre avec de l'eau désionisée pour composer le milieu « M7 ». On prépare une solution-mère de vitamines en ajoutant trois vitamines à de l'eau désionisée, comme indiqué au tableau 3, et l'on verse 0.1 ml de la solution-mère combinée de vitamines au milieu « M7 » final, peu avant l'emploi (la solution-mère de vitamines est stockée congelée par petites aliquotes). Le milieu est aéré et stabilisé.

Tableau 1 : Solutions-mères d'éléments en traces pour les milieux M4 et M7

Solutions-mères (I)	Quantité (mg) pour former une solution de 1 litre avec de l'eau désionisée	Pour préparer la solution-mère combinée (II) : mélanger les quantités suivantes (ml) de solutions-mères (I) et compléter à un litre avec de l'eau désionisée		Concentrations finales dans les solutions expérimentales (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H ₃ BO ₃ ⁽¹⁾	57 190	1.0	0.25	2.86	0.715
MnCl ₂ · 4H ₂ O ⁽¹⁾	7 210	1.0	0.25	0.361	0.090
LiCl ⁽¹⁾	6 120	1.0	0.25	0.306	0.077
RbCl ⁽¹⁾	1 420	1.0	0.25	0.071	0.018
SrCl ₂ · 6H ₂ O ⁽¹⁾	3 040	1.0	0.25	0.152	0.038
NaBr ⁽¹⁾	320	1.0	0.25	0.016	0.004
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O ⁽¹⁾	1 260	1.0	0.25	0.063	0.016
CuCl ₂ · 2H ₂ O ⁽¹⁾	335	1.0	0.25	0.017	0.004
ZnCl ₂	260	1.0	1.0	0.013	0.013
CaCl ₂ · 6H ₂ O	200	1.0	1.0	0.010	0.010
KI	65	1.0	1.0	0.0033	0.0033
Na ₂ SeO ₃	43.8	1.0	1.0	0.0022	0.0022
NH ₄ VO ₃	11.5	1.0	1.0	0.00058	0.00058
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O ⁽¹⁾⁽²⁾	5 000	20.0	5.0	2.5	0.625
FeSO ₄ · 7H ₂ O ⁽¹⁾⁽²⁾	1 991	20.0	5.0	1.0	0.249

(1) Ces substances sont dosées différemment dans M4 et M7, comme indiqué plus haut.

(2) Ces solutions sont préparées séparément, puis mélangées et autoclavées immédiatement après.

Tableau 2 : Solutions-mères de macronutriments pour les milieux M4 et M7

	Quantité (mg) pour former une solution de 1 litre avec de l'eau désionisée	Quantités de solutions-mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions expérimentales M4 et M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1.0	293.8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246 600	0.5	123.3
KCl	58 000	0.1	5.8
NaHCO ₃	64 800	1.0	64.8
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	0.2	10.0
NaNO ₃	2 740	0.1	0.274
KH ₂ PO ₄	1 430	0.1	0.143
K ₂ HPO ₄	1 840	0.1	0.184

Tableau 3 : Solution-mère de vitamines pour les milieux M4 et M7

Les trois solutions de vitamines sont mélangées de façon à former une solution-mère de vitamines.

	Quantité pour former une solution de 1 litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantité de solution-mère de vitamines ajoutée pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions d'essai M4 et M7 (mg/l)
Hydrochlorure de thiamine	750	0.1	0.075
Cyanocobalamine (B12)	10	0.1	0.0010
Biotine	7.5	0.1	0.00075

Références

- BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Édité par M. Strelake et H. Köpp. Berlin.
- Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, *Protoplasma*, 154: 25-33.
- Elendt, B.P. et W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, *Water Research*, 24: 1157-1167.

ANNEXE 3

PRÉPARATION DU SÉDIMENT RECONSTITUÉ**Composition du sédiment**

Le sédiment est reconstitué comme suit :

Ingrédient	Caractéristiques	% du sédiment poids sec
Tourbe	Tourbe à sphaigne, pH aussi proche que possible de 5.5-6.0, pas de résidus de plantes visibles, finement broyée (particules ≤ 1 mm) et séchée à l'air	4 - 5
Sable quartzique	Granulométrie: plus de 50 % des particules mesurent entre 50 et 200 μm	75 - 76
Argile kaolinique	Taux de kaolinite $\geq 30\%$	20
Carbone organique	Ajusté par l'addition de tourbe et de sable	2 (± 0.5)
Carbonate de calcium	CaCO_3 , pulvérisé, chimiquement pur	0.05 - 0.1
Eau	Conductivité $\leq 10 \mu\text{S/cm}$	30 - 50

Préparation

La tourbe est séchée à l'air et broyée en poudre fine. Une suspension de la quantité requise de poudre de tourbe dans de l'eau désionisée est préparée à l'aide d'un homogénéisateur à haute performance. Le pH de cette suspension est ajusté à 5.5 ± 0.5 avec du CaCO_3 . On conditionne la suspension durant au moins deux jours en l'agitant doucement à $20 \pm 2^\circ\text{C}$, afin de stabiliser le pH et d'établir une flore microbienne stable. On vérifie à nouveau le pH, qui doit atteindre 6.0 ± 0.5 . Puis la suspension de tourbe est mélangée avec les autres ingrédients (sable et argile kaolinique) et de l'eau désionisée pour former un sédiment homogène dont la teneur en eau est comprise entre 30 et 50 % du poids sec du sédiment. Le pH du mélange final est à nouveau mesuré et ajusté à 6.5-7.5 avec du CaCO_3 , si nécessaire. On prélève des échantillons de sédiment afin de déterminer le poids sec et la teneur en carbone organique. Il est ensuite recommandé, avant d'utiliser le sédiment reconstitué dans l'essai de toxicité sur les chironomes, de le conditionner durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui régneront durant l'essai subséquent.

Stockage

Les ingrédients secs destinés à la préparation du sédiment artificiel peuvent être entreposés dans un endroit sec et frais, à température ambiante. Le sédiment reconstitué (humide) n'est pas stocké avant son utilisation dans l'essai. Il est utilisé immédiatement après la période de conditionnement de sept jours qui achève sa préparation.

Références

OCDE (1984), *Ver de terre, essais de toxicité aiguë*, Ligne directrice No. 207, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. et B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, *Ecotox. Environ. Safety*, 39: 10-20.

ANNEXE 4

CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

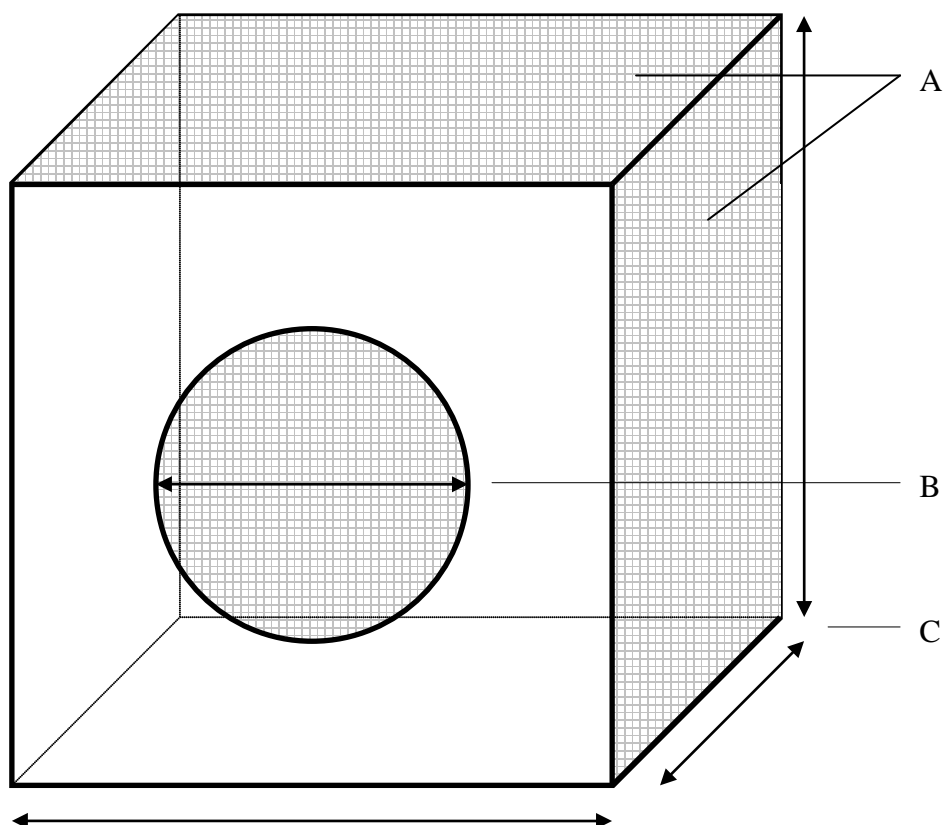
SUBSTANCE	CONCENTRATIONS
Particules	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Dureté en CaCO ₃	< 400 mg/l*
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Pesticides organophosphorés totaux	< 50 ng/l
Pesticides organochlorés totaux plus biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

* Si l'on suspecte une interaction entre les ions de dureté et la substance d'essai, il convient d'utiliser une eau moins dure (auquel cas le milieu Elendt M4 ne pourra pas être utilisé).

ANNEXE 5

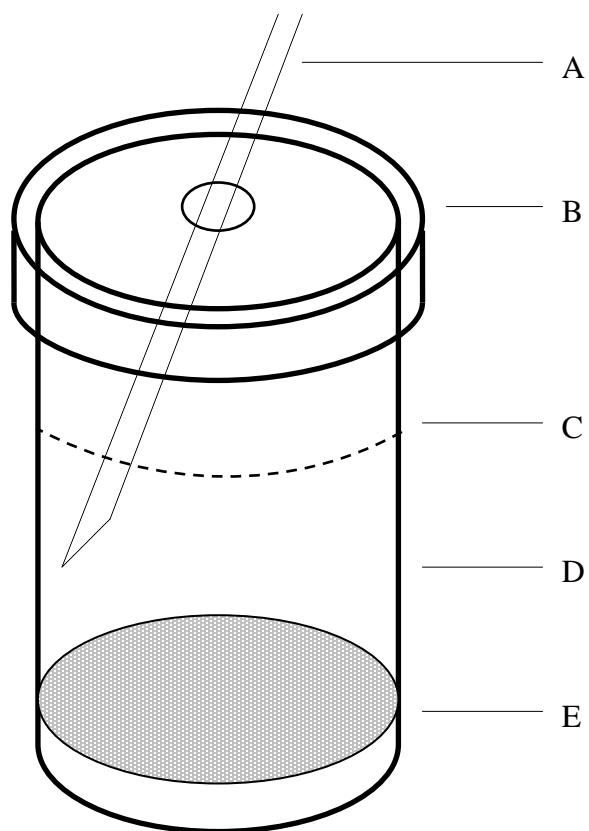
CONSEILS POUR LA RÉALISATION DE L'ESSAI

Exemple de cage d'élevage :



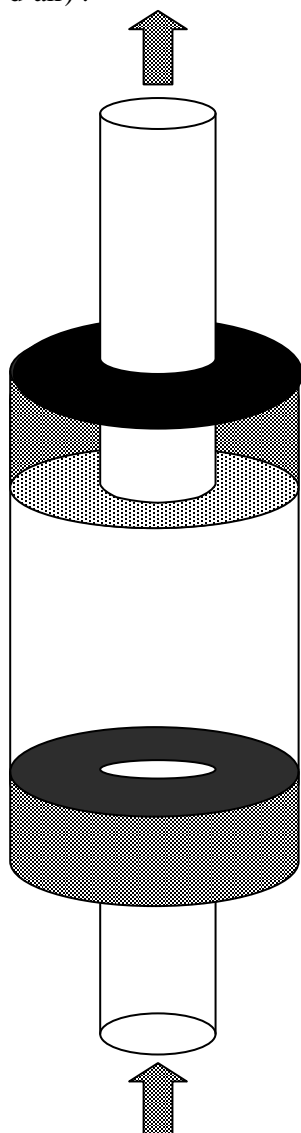
- A : gaze sur le dessus et au moins un côté de la cage (maillage environ 1 mm)
- B : ouverture permettant d'introduire les adultes émergés à l'intérieur de la cage et de retirer les amas d'œufs des cristallisoirs (non représentés sur ce schéma)
- C : taille minimale de la cage d'élevage : 30 cm de longueur, 30 cm de hauteur et 30 cm de profondeur

Exemple de récipient expérimental :



- A: pipette Pasteur permettant d'aérer l'eau sus-jacente
- B: couvercle en verre empêchant les moucheron de s'échapper
- C: surface de la couche d'eau
- D: récipient expérimental (bêcher en verre d'une contenance minimum de 600 ml)
- E: couche de sédiment

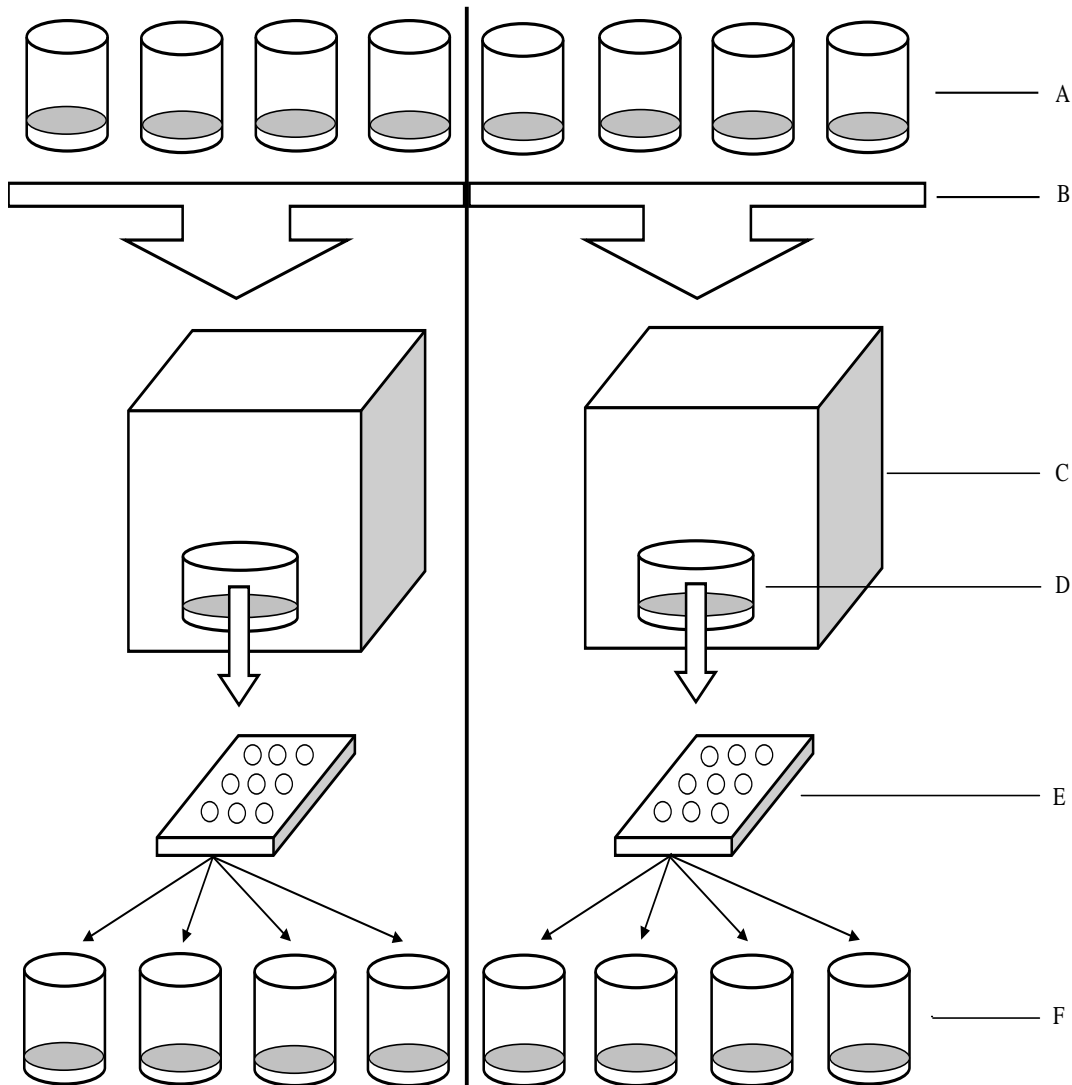
Exemple d'extracteur pour la capture des moucheron adultes (les flèches indiquent la direction du flux d'air) :



- _____ A
- _____ B
- _____ C
- _____ D
- _____ E

- A: tube de verre (diamètre interne environ 5 mm) relié à une pompe à amorçage automatique
- B: bouchon en caoutchouc vulcanisé, transpercé d'un tube de verre (A). Face intérieure, l'ouverture du tube de verre (A) est recouverte de coton et d'une gaze (maillage environ 1 mm²) pour empêcher d'endommager les moucheron lorsqu'ils sont aspirés dans l'extracteur
- C: conteneur transparent (en plastique ou verre, longueur 15 cm environ) pour les moucheron capturés
- D: bouchon en caoutchouc vulcanisé, transpercé d'un tube (E). Pour libérer les moucheron dans la cage d'élevage, retirer le bouchon D du conteneur C
- E: tube (de plastique ou de verre, diamètre intérieur environ 8 mm) pour collecter les moucheron dans le récipient expérimental

Présentation schématique d'un essai sur le cycle de vie :



- A: 1^{ère} génération - récipients expérimentaux contenant un système sédiment-eau, huit répliqués, 20 larves de premier stade par récipient
 B: quatre récipients expérimentaux pour chaque cage d'élevage, A et B
 C: cages d'élevage (A et B) pour l'essaimage, l'accouplement et la ponte
 D: cristallisoirs pour le dépôt des amas d'œufs
 E: plaques de microtitration, un puits par amas d'œufs
 F: 2^{ème} génération - récipients expérimentaux contenant un système sédiment-eau, huit répliqués, 20 larves de premier stade par récipient