

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

Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment chargé

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice est conçue pour évaluer les effets d'une exposition prolongée à des substances chimiques sur des larves de *Chironomus* sp., un diptère vivant dans les sédiments d'eau douce. Elle s'appuie sur des protocoles d'essais de toxicité sur *Chironomus riparius* et *Chironomus tentans*, mis au point en Europe (1)(2)(3) et en Amérique du Nord (4)(5)(6)(7)(8), et soumis à des essais tournants (1)(6)(9). D'autres espèces de chironomes bien documentées peuvent aussi être employées, par exemple *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. Le mode d'exposition appliqué dans cette Ligne directrice consiste à mélanger la substance d'essai au sédiment. La sélection du mode d'exposition dépend de la finalité de l'essai. Le chargement du sédiment vise à simuler l'accumulation de produits chimiques persistants dans le sédiment. Ce chargement s'effectue dans un système expérimental eau-sédiment.

3. En général, les substances à tester sur des organismes vivant dans les sédiments subsistent longtemps dans ce compartiment. 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 chaque substance chimique. Dans le cas des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un $\log K_{oc} > 5$) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, l'ingestion d'aliments contaminés peut constituer une voie d'exposition non négligeable. 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. La présente Ligne directrice est axée sur l'exposition à long terme, de façon à couvrir toutes les voies d'exposition potentielles. L'essai dure de 20 à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et de 28 à 65 jours pour *C. tentans*. Si l'on a besoin de données à court terme pour un motif précis, par exemple pour étudier les effets d'une substance chimique instable, des expériences identiques, rajoutées au dispositif expérimental, peuvent être retirées après 10 jours d'essai.

4. Les effets observés sont le nombre total d'adultes émergés et temps écoulé jusqu'à l'émergence. Si l'on a besoin de données à court terme, il est recommandé de ne mesurer la survie et la croissance des larves qu'après 10 jours, en ajoutant le nombre nécessaire d'expériences identiques.

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

- la variabilité expérimentale est réduite parce que 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 afin d'éliminer la faune indigène ; l'utilisation de sédiments reconstitués diminue aussi le coût associé à la collecte sur le terrain d'une quantité suffisante de sédiments pour les essais systématiques ;
- les sédiments reconstitués permettent de comparer la toxicité des substances et de les classer en conséquence.

6. L'Annexe 1 contient les définitions employées dans la présente Ligne directrice.

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. Une fois la substance d'essai incorporée au sédiment, des larves au premier stade sont introduites dans des béciers où les concentrations d'eau et de sédiment ont été stabilisées. L'émergence des chironomes et leur vitesse de développement sont mesurées à la fin de l'essai. La survie des larves et leur poids peuvent aussi être mesurés après 10 jours si nécessaire (en ajoutant le nombre d'expériences identiques requis). Ces données sont analysées, soit à l'aide d'un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x% de l'émergence ou de la survie des larves ou de leur croissance (par exemple CE₁₅, CE₅₀, etc.), soit par la vérification d'une hypothèse statistique afin de déterminer une CSEO/CMEO. Cette dernière nécessite une comparaison entre les valeurs efficaces et les valeurs des témoins à l'aide de tests statistiques.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

8. Il faudrait connaître l'hydrosolubilité de la substance d'essai, sa pression de vapeur, son coefficient de partage mesuré ou calculé dans le sédiment et sa stabilité dans l'eau et le sédiment. Il convient de disposer d'une méthode d'analyse fiable pour quantifier la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, dans l'eau des pores et dans le sédiment, et pour laquelle 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 sa dissipation, sa dégradation abiotique et biotique, etc.). Le document guide (12) propose des informations pour les substances avec lesquelles les essais sont rendus difficiles du fait de leurs propriétés physico-chimiques.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

9. Des substances de référence pourront être testées régulièrement afin de démontrer, le cas échéant, la fiabilité du protocole et des conditions de l'essai. Voici quelques exemples de toxiques de référence ayant fait leurs preuves dans des essais tournants et des études de validation : lindane, trifluraline, pentachlorophénol, chlorure de cadmium et chlorure de potassium (1)(2)(5)(6)(13).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. Pour que l'essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies :

- l'émergence chez les témoins doit atteindre au moins 70% à la fin de l'essai (1)(6) ;
- S'agissant de *C. riparius* et *C. yoshimatsui*, l'émergence au stade adulte dans les récipients témoins doit avoir lieu entre 12 et 23 jours après leur introduction dans les récipients expérimentaux ; *C. tentans* réclame une période de 20 à 65 jours ;
- à la fin de l'essai, le pH et la concentration d'oxygène dissous seront mesurés dans chaque récipient. La concentration d'oxygène devrait atteindre au moins 60% de sa valeur dans l'air

saturé (VAS) à la température appliquée et le pH de l'eau sus-jacente devrait être compris entre 6 et 9 dans tous les récipients expérimentaux ;

- la température de l'eau ne devrait pas varier de plus de $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$ et pourrait être contrôlée grâce à une chambre isotherme, auquel cas la température de la chambre devra être confirmée à intervalles appropriés.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Récipients expérimentaux

11. L'essai se déroule dans des béchers en verre de 600 ml, mesurant 8 cm de diamètre. D'autres récipients peuvent être utilisés à condition qu'ils permettent à l'eau sus-jacente et au sédiment d'atteindre une profondeur suffisante. Le sédiment doit offrir une superficie de 2 à 3 cm² par larve. Le quotient de la profondeur de la couche de sédiment par la profondeur de la couche d'eau sus-jacente doit être égal à 1/4. Les récipients 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 (par exemple du Téflon).

Sélection des espèces

12. *Chironomus riparius* est l'espèce qui convient le mieux. *Chironomus tentans* peut aussi être utilisé, mais il est plus difficile à manipuler et nécessite une période d'essai plus longue. *Chironomus yoshimatsui* convient également. La méthode de culture de *Chironomus riparius* est détaillée à l'Annexe 2. D'autres documents décrivent les conditions de culture d'autres espèces : *Chironomus tentans* (4) et *Chironomus yoshimatsui* (11). L'identification de l'espèce 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 faudrait 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 s'assurer qu'il n'est pas contaminé et n'abrite pas d'autres organismes qui pourraient entrer en compétition avec les chironomes ou les consommer. Avant d'utiliser un sédiment naturel dans un essai de toxicité sur les chironomes, il est également recommandé de le maintenir durant sept jours dans des conditions identiques à celles qui régneront durant l'essai (conditionnement). Nous recommandons le sédiment reconstitué comme décrit ci-dessous, d'après le sol artificiel utilisé dans la Ligne directrice 207 (14)(1)(15)(16) :

- (a) 4-5% (poids sec) de tourbe, avec un pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0 ; il est important d'utiliser une tourbe sous forme de 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 μm) ;
- (d) ajouter de l'eau désionisée jusqu'à ce que la teneur en humidité du mélange final atteigne 30 à 50% ;
- (e) ajouter du carbonate de calcium de qualité chimiquement pure (CaCO_3) pour ajuster le pH du mélange final composant le sédiment à $7,0 \pm 0,5$. Il faudrait 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, de kaolin et de sable doivent être connues. On vérifiera que les composants du sédiment ne sont pas contaminés par des substances chimiques (par exemple des métaux lourds, des composés organochlorés, des composés organophosphorés, etc.). Un exemple de préparation de sédiment reconstitué est décrit à l'Annexe 3. Les composants peuvent aussi être mélangés à l'état sec, à condition de démontrer qu'après l'ajout de l'eau sus-jacente, les composants du sédiment ne se séparent pas (flotement 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 peut servir 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 eau 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 CaCO₃. Néanmoins, si l'on suspecte une interaction entre les ions qui provoquent la dureté et la substance d'essai, il faudra utiliser une eau moins dure (et ne pas employer le milieu Elendt M4 dans ce cas). Le même type d'eau doit être utilisé tout au long de l'étude. Les caractéristiques de la qualité de l'eau énumérées à l'Annexe 4 sont à mesurer au moins deux fois par an ou chaque fois que ses caractéristiques sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées.

Solutions mères – sédiments chargés

16. 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 petit 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 ce qu'il soit totalement éliminé du sable ; le sable est ensuite mélangé avec la quantité appropriée de sédiment par béccher expérimental. 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 la substance d'essai et du 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.

CONCEPTION DE L'ESSAI

17. La conception de l'essai définit le nombre et l'espacement des concentrations expérimentales, le nombre de récipients à chaque concentration et le nombre de larves par récipient. La marche à suivre pour estimer la CE ponctuelle, la CSEO et mener un essai limite est décrite.

Conduite d'une analyse de régression

18. La gamme de concentrations et la concentration efficace (par exemple, CE₁₅, CE₅₀) auxquelles la substance d'essai produit un effet intéressant doivent être couvertes par les concentrations incluses dans l'essai. Généralement, l'exactitude, et plus particulièrement la validité, de l'estimation des concentrations efficaces (CE_x) s'accroissent lorsque la concentration efficace se situe dans la gamme des concentrations testées. Il faut éviter d'extrapoler des résultats très en dessous de la concentration efficace la plus faible ou

au-dessus de la concentration maximale. Il est utile de conduire un essai préliminaire pour déterminer la gamme des concentrations à utiliser (voir paragraphe 27).

19. S'il faut estimer la CE_x , au moins cinq concentrations et trois expériences identiques par concentration doivent être mises à l'essai. En tout état de cause, il est recommandé de tester suffisamment de concentrations pour obtenir une bonne estimation du modèle. Le facteur séparant les concentrations ne doit pas excéder deux (sauf dans les cas où la courbe dose-effet présente une pente faible). Le nombre d'expériences identiques par traitement peut être diminué si le nombre de concentrations expérimentales entraînant différents effets est augmenté. L'augmentation du nombre d'expériences identiques ou la contraction des intervalles entre les concentrations expérimentales tend à réduire les intervalles de confiance pour l'essai. Le nombre d'expériences identiques sera augmenté s'il y a lieu d'estimer le taux de survie et la croissance des larves après dix jours.

Procédure d'estimation d'une CSEO/CMEO

20. S'il faut estimer la CMEO ou la CSEO, on mettra à l'essai cinq concentrations expérimentales et au moins quatre expériences identiques par concentration, le facteur séparant les concentrations n'excédant pas deux. Le nombre d'expériences identiques doit être tel qu'il fournit une puissance statistique permettant de détecter une différence de 20% avec le témoin, au seuil de signification statistique de 5% ($p = 0,05$). S'agissant de la vitesse de développement, une analyse de la variance (ANOVA) convient généralement, telle que le test de Dunnett ou le test de Williams (17)(18)(19)(20). S'agissant du taux d'émergence, le test de Cochran-Armitage, le test exact de Fisher (avec correction selon Bonferroni) ou le test de Mantel-Haentzel peuvent être utilisés.

Essai limite

21. Si l'essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations n'a engendré aucun effet, un essai limite peut être conduit (une concentration expérimentale et un témoin). L'essai limite se pratique avec une concentration suffisamment élevée pour permettre aux décideurs d'exclure tout effet toxique possible de la substance et la limite est fixée à une concentration censée ne jamais être atteinte dans les conditions réelles. Une concentration de 1000 mg/kg (poids sec) est recommandée. Il est généralement nécessaire de mener au moins six expériences identiques pour les organismes traités et les témoins. Il y a lieu de démontrer que la puissance statistique est suffisante pour détecter une différence de 20% avec les témoins, au seuil de signification statistique de 5% ($p = 0,05$). En ce qui concerne l'effet sur la vitesse de développement et sur le poids, le test t constitue une méthode statistique appropriée, si les données respectent les conditions exigées par ce test (normalité, variances homogènes). On pourra recourir au test t à variance inégale ou à un test non paramétrique, tel que le test de Wilcoxon-Mann-Whitney si ces conditions ne sont pas remplies. S'agissant du taux d'émergence, le test exact de Fisher convient.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition

Préparation du système sédiment chargé-eau

22. La procédure de mélange de la substance d'essai au sédiment décrite dans la Ligne directrice 207 de l'OCDE : «Ver de terre, essais de toxicité aiguë» est recommandée pour cet essai (14). On dépose les sédiments chargés au fond des récipients avant d'y verser l'eau, de façon à obtenir un quotient volumique sédiment-eau de 1/4 (voir paragraphes 11 et 15). La profondeur de la couche de sédiment doit être comprise entre 1,5 et 3 cm. Afin d'éviter la séparation des ingrédients du sédiment et la resuspension des particules fines pendant le 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 conviennent également.

23. Les récipients expérimentaux doivent être couverts (par des plaques de verre, par exemple). On prendra soin de remplacer les volumes d'eau évaporée durant l'étude, le cas échéant, et ce avec de l'eau distillée ou désionisée afin d'empêcher l'accumulation de sels.

Stabilisation

24. Une fois que le sédiment chargé surmonté d'une couche d'eau a été préparé, il est souhaitable de laisser la substance d'essai se répartir entre la phase aqueuse et le sédiment (3)(4)(6)(13), et ce, de préférence, dans les mêmes conditions de température et d'aération que durant l'essai. L'équilibre met de quelques heures à quelques jours à s'établir, voire 4-5 semaines dans de rares cas, selon le sédiment et la substance chimique. Il ne faut pas attendre que l'équilibre soit atteint, car beaucoup de substances risquent de se dégrader durant cette période, mais un temps d'attente de 48 heures est recommandé. Au terme de cette période d'équilibrage, on mesure la concentration de la substance d'essai dans l'eau sus-jacente, les pores et le sédiment, au moins pour la concentration la plus élevée et la 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.

Introduction des organismes d'expérience

25. Quatre à cinq jours avant d'introduire les organismes d'expérience dans les récipients, des amas d'oeufs sont prélevés dans les cultures et déposés dans de petits flacons garnis de milieu de culture. Un milieu plus ancien issu de la culture mère tout comme un milieu fraîchement préparé peuvent être utilisés. Si ce dernier est utilisé, on ajoutera une petite quantité de nourriture, par exemple des algues vertes et/ou quelques gouttes du filtrat d'une suspension de paillettes pour poissons finement broyées, au milieu de culture (voir Annexe 2). Seuls des amas d'oeufs fraîchement pondus peuvent être utilisés. Normalement, les larves commencent à éclore quelques jours après la ponte (2 à 3 jours pour *Chironomus riparius* à 20°C et 1 à 4 jours pour *Chironomus tentans* à 23°C et *Chironomus yoshimatsui* à 25°C) et le développement des larves se déroule en quatre stades, dont chacun dure 4 à 8 jours. Cet essai se pratique au premier stade larvaire (2-3 ou 1-4 jours après l'éclosion). Il est possible de vérifier le stade de développement des moucheron d'après la largeur de la capsule de la tête (6).

26. Vingt larves au premier stade, choisies au hasard, sont déposées dans chaque récipient contenant le sédiment chargé et l'eau, à l'aide d'une pipette émoussée. L'aération de l'eau doit être interrompue dès qu'on introduit les larves dans les récipients expérimentaux, et ce durant 24 heures après l'ajout des larves (voir paragraphes 25 et 32). Selon le protocole expérimental suivi (voir paragraphes 19 et 20), le nombre de larves utilisées par concentration s'élève au moins à 60 pour l'estimation de la concentration efficace (CE) ponctuelle et à 80 pour la détermination de la CSEO.

Concentrations expérimentales

27. Il peut être utile de conduire un essai de détermination de l'ordre de grandeur pour délimiter la gamme de concentrations à appliquer dans l'essai proprement dit. À cet effet, on utilise une série de concentrations largement espacées de la substance d'essai. Afin de reproduire la même densité de surface par chironome que dans l'essai proprement dit, les chironomes sont exposés à chaque concentration de la substance d'essai durant une période permettant d'estimer les concentrations expérimentales appropriées et aucune expérience identique n'est nécessaire.

28. Les concentrations expérimentales de l'essai proprement dit sont choisies en fonction des résultats de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur. Au moins cinq concentrations doivent être appliquées et sélectionnées comme décrit aux paragraphes 18 à 20.

Témoins

29. L'essai inclura le nombre nécessaire de récipients témoins pourvus du sédiment mais exempts de toute substance d'essai (voir paragraphes 19-20). Si la substance d'essai a été appliquée à l'aide d'un solvant (voir paragraphe 16), on ajoutera un récipient témoin dont le sédiment renferme également le solvant.

Système expérimental

30. On utilise des systèmes statiques. Des systèmes semi-statiques ou à écoulement continu avec renouvellement intermittent ou continu de l'eau sus-jacente peuvent être utilisés dans des cas exceptionnels, par exemple si les spécifications de la qualité de l'eau deviennent inappropriées pour l'organisme d'expérience ou affectent l'équilibre chimique (si, par exemple, la concentration d'oxygène dissous devient trop basse, la concentration des excréta montre trop haut ou si des minéraux lessivés à partir du sédiment affectent le pH et/ou la dureté de l'eau). Néanmoins, d'autres méthodes d'amélioration de la qualité de l'eau sus-jacente, telles que l'aération, seront normalement suffisantes et préférables.

Alimentation

31. Les larves ont besoin d'être nourries, de préférence quotidiennement ou au moins trois fois par semaine. Durant les dix premiers jours, chaque jeune larve recevra quotidiennement 0,25 à 0,5 mg (0,35-0,5 mg pour *C. yoshimatsui*) de nourriture pour poissons (suspendue dans l'eau ou finement moulue, 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 diminuera la ration alimentaire de tous les organismes traités et témoins si des champignons se développent ou si des organismes témoins meurent. Si la croissance fongique s'avère impossible à enrayer, l'essai est à recommencer. Si l'essai porte sur des substances fortement adsorbantes (par exemple avec un $\log K_{oc} > 5$) ou des substances liées de façon covalente au sédiment, la quantité de nourriture nécessaire à la survie et à la croissance naturelle des organismes peut être ajoutée au sédiment reconstitué avant la période de stabilisation. Dans ce cas, 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 ou rampant (*Trifolium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*), par exemple, ou d'un autre matériau végétal (*Cerophyl* ou alpha-cellulose).

Conditions d'incubation

32. L'eau sus-jacente est soumise à une légère aération, mise en route de préférence 24 heures après l'introduction des larves 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 sa valeur dans l'air saturé). L'air est insufflé à travers une pipette Pasteur en verre fixée 2 à 3 cm au-dessus de la couche de sédiment (une ou quelques bulles par seconde). Si la substance d'essai est volatile, il faudra éventuellement supprimer l'aération.

33. L'essai est mené à température constante ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Pour *C. tentans* et *C. yoshimatsui*, les températures recommandées s'élèvent respectivement à 23°C et $25^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$. La photopériode est de 16 heures et l'éclairage compris entre 500 et 1 000 lux.

Durée de l'exposition

34. L'exposition débute avec l'introduction des larves dans les récipients traités et témoins. La durée maximale de l'exposition s'élève à 28 jours pour *C. riparius* et *C. yoshimatsui* et à 65 jours pour *C. tentans*. Si les moucheron émergent plus tôt, l'essai peut s'achever au moins cinq jours après l'émergence du dernier adulte témoin.

Observations

Émergence

35. La durée du développement et le nombre total de moucheron mâles et femelles adultes totalement émergés sont à déterminer. Les mâles sont faciles à identifier grâce à leurs antennes plumeuses.

36. Au moins trois fois par semaine, on vérifiera que les organismes des récipients expérimentaux ne manifestent aucun comportement anormal (sortie du sédiment, nage inhabituelle par exemple) par rapport aux témoins. Chaque jour, durant la période supposée de l'émergence, on comptera le nombre de moucheron émergés et on consignera le sexe et le nombre de moucheron complètement émergés. Après identification, les moucheron sont retirés des récipients. Tout amas d'oeufs déposé avant la fin de l'essai doit être recensé puis enlevé afin d'empêcher la réintroduction de larves dans le sédiment. Le nombre de pupes visibles n'ayant pas réussi à émerger est aussi enregistré. Des indications sur la façon de mesurer l'émergence sont données à l'Annexe 5.

Croissance et survie

37. S'il faut fournir des données sur la survie et la croissance des larves après 10 jours, des récipients expérimentaux supplémentaires seront ajoutés dès le début de l'essai, pour pouvoir être utilisés ultérieurement. Le sédiment de ces récipients supplémentaires sera tamisé à travers des mailles de 250 µm pour retenir les larves. La mort est déterminée par deux critères : l'immobilité et l'absence de réaction à un stimulus mécanique. Les larves non récupérées doivent aussi être comptabilisées parmi les mortes (les larves qui sont mortes au début de l'essai ont pu être dégradées par des microbes). Après avoir déterminé le poids sec (sans cendres) des larves survivantes par récipient expérimental, on calcule le poids sec individuel moyen par récipient. Il est utile d'établir à quel stade se trouvent les larves survivantes, et ce d'après la largeur de la capsule de la tête de chaque individu.

Mesures analytiques

Concentration de la substance d'essai

38. Avant le début de l'essai (c'est-à-dire avant l'introduction des larves), on prélève des échantillons du sédiment d'au moins un récipient par traitement, afin de déterminer analytiquement la concentration de la substance d'essai dans le sédiment. Il est recommandé d'analyser, au minimum, des échantillons de l'eau sus-jacente, de l'eau des pores, et du sédiment, au début (voir paragraphe 24) et à la fin de l'essai, et ce de la concentration la plus élevée et d'une concentration plus basse. Les concentrations de la substance d'essai nous renseignent sur le comportement et la répartition de la substance d'essai dans le système eau-sédiment.

39. Lorsqu'on effectue des mesures intermédiaires (par exemple au septième 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 des observations biologiques.

40. Pour isoler l'eau interstitielle, on recommande 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 ne s'adsorbe pas sur les filtres, la filtration est également acceptable. Avec des échantillons trop petits, il arrive que les concentrations dans l'eau des pores soient impossibles à analyser.

Paramètres physico-chimiques

41. Le pH de l'eau et la température des récipients expérimentaux doivent être mesurés de façon appropriée (voir paragraphe 10). La dureté de l'eau et la teneur en ammoniac sont mesurées dans les récipients témoins et dans un récipient traité à la concentration la plus élevée, au début et à la fin de l'essai.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

42. Cet essai vise à déterminer l'effet de la substance d'essai sur la vitesse de développement et le nombre total de moucheron mâles et femelles totalement émergés ou, dans le cas de l'essai de 10 jours, les effets sur la survie et le poids des larves. Si rien n'indique que les deux sexes présentent des différences statistiques de sensibilité, les résultats obtenus sur les mâles et les femelles peuvent être regroupés pour l'analyse statistique. Les différences de sensibilité entre les sexes peuvent être jugées statistiquement par un test (de tableau) χ^2 -r x 2, par exemple. La survie des larves et le poids sec individuel moyen par récipient doivent être déterminés après dix jours, le cas échéant.

43. Il est préférable de calculer les concentrations efficaces, exprimées en fonction du poids sec, à partir des concentrations mesurées dans le sédiment au début de l'essai (voir paragraphe 38).

44. Pour estimer ponctuellement la CE_{50} ou une quelconque CE_x , les statistiques par récipient peuvent être utilisées comme des expériences identiques proprement dites. Lorsqu'on calcule un intervalle de confiance pour une quelconque CE_x , il faut tenir compte de la variabilité entre les récipients ou montrer 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 «détransformés» de façon à recouvrer leur valeur originale.

45. Si l'analyse statistique vise à déterminer la CSEO/CMEO par la vérification d'une hypothèse, la variabilité entre les récipients doit être prise en compte, par exemple à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) « emboîtée ». Par contre, des tests plus robustes (21) peuvent être utilisés au cas où les hypothèses habituelles de l'analyse de la variance ne se vérifient pas.

Taux d'émergence

46. Le taux d'émergence donne une réponse par tout ou rien et peut être analysé 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 expériences identiques 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 (21).

La somme des moucheron 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 moucheron émergés par récipient
n_a	=	nombre de larves introduites par récipient

47. Une variante 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 telle que le test de William si la relation dose-effet est supposée être monotone et si les taux d'émergence corroborent cette hypothèse. Le test de Dunnett convient dans le cas où la relation ne s'avère pas monotone. Ici, on considère qu'un échantillon est de grande taille lorsque le nombre de moucheron émergés et le nombre de chironomes non émergés dépassent chacun cinq, par récipient expérimental.

48. Avant d'appliquer l'analyse de la 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 Bonferroni) ou le test de Mantel-Haentzel peuvent être employés lorsqu'on utilise des fréquences absolues. La transformation arcsinus-racine carrée consiste à calculer l'inverse du sinus (\sin^{-1}) de la racine carrée du TE.

49. Pour les taux d'émergence, les valeurs de la CE_x sont calculées par une analyse de régression (ou par probit (22), logit, Weibull, des logiciels commerciaux appropriés, etc.). Si l'analyse de la 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 une simple interpolation.

Vitesse de développement

50. La période de développement moyenne représente le temps moyen écoulé entre l'introduction des larves (jour 0 de l'essai) et l'émergence de la cohorte expérimentale de moucheron (pour calculer la période de développement réelle, 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 représente 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 les tests paramétriques 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 l'analyse de la régression, par exemple (23), (24).

51. Pour les tests statistiques suivants, le nombre de moucheron 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 moucheron émergés durant l'intervalle d'observation i
n_e	=	nombre total de moucheron émergés à la fin de l'expérience (= $\sum f_i$)
x_i	=	vitesse de développement des moucheron émergés durant l'intervalle i

$$x_i = 1/(\text{jour}_i - 1_i/2)$$

où :

jour_i = jour d'observation (compté depuis l'application)

1_i = longueur de l'intervalle d'observation i (exprimé en jours, habituellement 1 jour)

Rapport d'essai

52. Le rapport d'essai doit fournir au moins les informations suivantes :

Substance d'essai :

- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques (hydrosolubilité, pression de vapeur, coefficient de partage dans le sol (ou dans le sédiment s'il est connu), stabilité dans l'eau, etc.) ;
- identification chimique (nom courant, nom chimique, formule structurale, numéro CAS, etc.), pureté et méthode d'analyse pour la quantification de la substance d'essai.

Espèce d'essai :

- animal d'essai utilisé : espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage ;
- informations sur la manipulation des amas d'oeufs et des larves ;
- âge des animaux d'expérience au moment où ils ont été déposés dans les récipients expérimentaux.

Conditions expérimentales :

- sédiment utilisé, c'est-à-dire naturel ou reconstitué ;
- pour les sédiments naturels : localisation et description du site de prélèvement et notamment, si possible, son histoire en matière de contamination ; caractéristiques : pH, teneur en carbone organique, quotient C/N et granulométrie, le cas échéant.
- préparation du sédiment reconstitué : ingrédients et caractéristiques (teneur en carbone organique, pH, humidité, etc. au début de l'essai) ;
- préparation de l'eau d'essai (si l'eau est reconstituée) et caractéristiques (concentration d'oxygène, pH, conductivité, dureté, etc. au début de l'essai) ;
- profondeur du sédiment et de l'eau sus-jacente ;
- volume de l'eau sus-jacente et de l'eau des pores ; poids du sédiment humide avec et sans eau des pores ;
- récipients expérimentaux (matériau et dimension) ;
- méthode de chargement du sédiment : concentrations expérimentales appliquées, nombre d'expériences identiques et utilisation d'un solvant, le cas échéant ;
- phase de stabilisation du système sédiment chargé-eau : durée et conditions ;
- conditions d'incubation : température, cycle et intensité de lumière, aération (fréquence et intensité) ;
- informations détaillées sur la nourriture : 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 le récipient expérimental ;
- qualité de l'eau dans les récipients expérimentaux : pH, température, oxygène dissous, dureté et teneur en ammoniac ;

- remplacement de l'eau d'essai évaporée, le cas échéant ;
- nombre de moucheron mâles et femelles émergés par récipient et par jour ;
- nombre de larves non émergées sous la forme de moucheron par récipient ;
- poids sec individuel moyen des larves par récipient, et par stade larvaire, s'il y a lieu ;
- pourcentage d'émergence par expérience identique et concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucheron mâles et femelles) ;
- vitesse de développement moyenne des moucheron totalement émergés par expérience identique et concentration d'essai (regroupement des résultats pour les moucheron mâles et femelles) ;
- estimation des effets toxiques observés, par exemple CE_x (et intervalles de confiance associés), CSEO et/ou CMEQ, et méthodes statistiques employées pour les déterminer ;
- analyse des résultats, y compris les répercussions sur les résultats d'un écart éventuel à la présente Ligne directrice.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius* : Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin, 1995.
- (2) R. Fleming et al. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No : EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp.1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate ; Biotechnology ; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environnement Canada (1997). Essai de croissance et de survie de larves de moucheron d'eau douce (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*). Méthode d'essai biologique. Rapport SPE 1/RM/32. Décembre 1997.
- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996) : Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996) : Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and Kirby, R.S., (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. Institut national de recherche sur les eaux. Burlington, Ontario, Canada.
- (10) Sugaya, Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp.J. Sanit. Zool. 48(4) : 345-350.

- (11) Kawai, K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). *Jp. J. Sanit. Zool.* 37(1) :47-57.
- (12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations, n°23.
- (13) 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.
- (14) OCDE. (1984). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, Essai n°207 : Ver de terre, Essais de toxicité aiguë.
- (15) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H., (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13 : 1163-1175.
- (16) Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere* 31 : 3291-3303.
- (17) Dunnett, C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statis. Assoc.*, 50 : 1096-1121.
- (18) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20 : 482-491.
- (19) 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.
- (20) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28 :510-531.
- (21) Rao, J.N.K. and Scott A.J., (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48 : 577-585.
- (22) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18, 213-221.
- (23) Bruce and Versteeg 1992, A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11 :1485-1494.
- (24) Slob, W., 2002. Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66, 298-312.

ANNEXE 1DÉFINITIONS

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

Le sédiment reconstitué, ou artificiel ou synthétique, désigne le 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 l'eau des pores, se réfère à l'eau qui occupe les vides laissés entre le sédiment et les particules de sol.

Le sédiment chargé est un sédiment auquel on a ajouté la substance d'essai.

ANNEXE 2RECOMMANDATIONS 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) sur le 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 doivent être gardées à température ambiante, ou à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ si elles sont installées 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. L'eau d'un puits, de l'eau du robinet déchlorée et un milieu artificiel (Elendt «M4» ou «M7», voir ci-après) sont souvent utilisés. L'eau doit être aérée avant 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 des larves.

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. Un manque 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*) 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. Il est facile de distinguer les mâles d'après leurs antennes plumeuses.

Amas d'oeufs

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'oeufs gélatineux n'ont pas été déposés. Le cas échéant, les amas d'oeufs doivent être soigneusement enlevés et transférés dans un petit récipient contenant un échantillon de l'eau d'élevage. Les amas d'oeufs servent à préparer un nouveau récipient de culture (2 à 4 amas d'oeufs par récipient, par exemple) ou à pratiquer des essais de toxicité.

10. Les larves au 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 que les moucheron adultes ont émergé. 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 reprises au tableau 1, dont les concentrations sont quatre fois plus faibles dans le milieu «M7» que dans le milieu «M4». Une publication sur le milieu «M7» est en préparation (Elendt, communication personnelle). 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 préparer 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 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.

Référence

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius* : Development and validation of a new test system M. Strelke et H. Köpp, Berlin 1995.

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

Solutions mères (I)	Quantité (mg) pour former une solution d'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⁾	57190	1,0	0,25	2,86	0,715
MnCl ₂ •4H ₂ O ⁽¹⁾	7210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl ⁽¹⁾	6120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl ⁽¹⁾	1420	1,0	0,25	0,071	0,018
SrCl ₂ •6H ₂ O ⁽¹⁾	3040	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⁾	1260	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
CoCl 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⁾	5000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ •7H ₂ O ⁽¹⁾⁽²⁾	1991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Ces substances sont dosées différemment en 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 d'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	293800	1,0	293,8
MgSO ₄ •7H ₂ O	246600	0,5	123,3
KCl	58000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64800	1,0	64,8
NaSiO ₃ •9H ₂ O	50000	0,2	10,0
NaNO ₃	2740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1840	0,1	0,184

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

Les trois solutions de vitamines seront mélangées de façon à ne former qu'une solution mère de vitamines

	Quantité pour former une solution d'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

Elendt, B.P. (1990) : Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154, 25-23

Elendt B.P. & 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(9), 1157-1167.

ANNEXE 3PRÉPARATION DU SÉDIMENT RECONSTITUÉComposition du sédiment

Le sédiment sera 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	dimension des particules : >50% des particules doivent mesurer 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 ($\pm 0,5$)
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 $5,5 \pm 0,5$ 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, il devrait atteindre $6,0 \pm 0,5$. Ensuite la suspension de tourbe est mélangée avec les autres ingrédients (sable et argile kaolinique) et de l'eau désionisée pour former un sédiment homogène avec une teneur en eau de 30 à 50% du poids sec du sédiment. Le pH du mélange final est encore 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. Ensuite, avant d'utiliser le sédiment reconstitué dans l'essai de toxicité sur les chironomes, il est recommandé 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) ne doit pas être stocké avant son utilisation dans l'essai. Il doit être utilisé immédiatement après la période de conditionnement de sept jours qui achève sa préparation.

Références

Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : Essai^o 207 : Ver de terre, Essais de toxicité aiguë (1984).

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R. et Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety*, 39, 10-20.

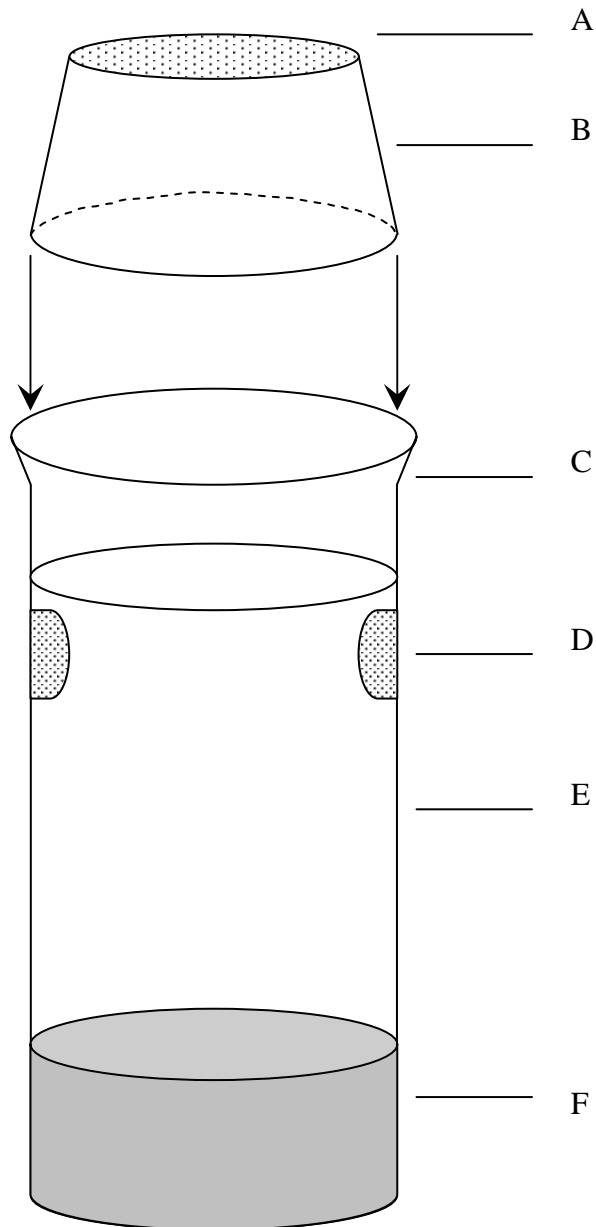
ANNEXE 4CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

SUBSTANCE	CONCENTRATIONS
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1µg/l
Dureté en CaCO ₃	< 400 mg/l*
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Totalité des pesticides organophosphorés	< 50 ng/l
Totalité des pesticides organochlorés et des biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

* S'il risque d'y avoir une interaction entre les ions qui provoquent la dureté de l'eau 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 5CONSEILS POUR SUIVRE L'ÉMERGENCE DES LARVES DE CHIRONOMES

Les béciers expérimentaux sont coiffés par des pièges à émergence, du 20^{ème} jour jusqu'à la fin de l'essai. Le schéma ci-dessous illustre un exemple de piège.



- A : toile de nylon
- B : coupelles en plastique renversées
- C : bécier expérimental sans bec
- D : ouvertures recouvertes de toile par où s'effectuent les échanges d'eau
- E : eau
- F : sédiment