

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

### **Chironomus sp., essai d'immobilisation immédiate**

#### **INTRODUCTION**

1. Cette Ligne directrice (LD) décrit un essai de toxicité aiguë destiné à évaluer les effets des substances chimiques sur les chironomes. Cet essai d'immobilisation immédiate sur les chironomes dans l'eau seule vient compléter les LD 218, 219 et 233, consacrées aux essais de toxicité chronique sur les chironomes (10) (11) (14).

2. La méthode employée s'appuie sur la LD 202 : *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test (12). Le présent document tient également compte des informations tirées des protocoles d'essai de toxicité à long terme sur sédiment élaborés pour *C. riparius* et *C. dilutus* en Europe et en Amérique du Nord (6) (5) (18) (19) (2) (20), ainsi que des précédentes expériences interlaboratoires (17) (8) (20).

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

3. Des chironomes au premier stade larvaire sont exposés à une gamme de concentrations de la substance d'essai dans un récipient contenant uniquement de l'eau, pour une période de 48 heures. L'immobilisation est enregistrée à 24 et 48 heures. La CE<sub>50</sub> est calculée à 24 et 48 heures (si les données le permettent). L'annexe 1 présente des définitions / descriptions.

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

4. La solubilité dans l'eau et la pression de vapeur de la substance d'essai doivent être connues. De même, il faut disposer d'une méthode d'analyse fiable de dosage de la substance dans les solutions d'essai, dont le rendement de récupération et la limite de détermination sont connus. Des informations utiles sur la substance d'essai comprennent la formule structurale, la pureté, la stabilité dans l'eau et à la lumière, le coefficient de partage octanol-eau K<sub>ow</sub>, et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir la LD 301 ou la LD 310). L'aspect physique de la substance d'essai est décrit. Le document d'orientation OCDE No. 23 (9) fournit des informations pour les substances avec lesquelles les essais sont rendus difficiles du fait de leurs propriétés physico-chimiques.

#### **SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE**

5. On peut tester régulièrement une substance de référence pour s'assurer que le système et les conditions d'essai sont fiables. Les substances toxiques qui ont été employées par les essais interlaboratoires et les études de validation menés dans le monde sont recommandés à cet effet. Un essai inter-laboratoires a été réalisé lors d'une expérience de toxicité aiguë sur les chironomes. Il utilisait comme substances d'essai du 3,5-dichlorophénol et du chlorure de potassium (15) (21). Parmi les autres substances toxiques de référence ayant fait leurs preuves sur les chironomes figurent le lindane, le pentachlorophénol

© OCDE, (2011).

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

et le chlorure de cadmium (5) (17) (1) (2) (20). L'essai ou les essais avec une substance de référence sont menés de manière appropriée, par exemple après l'introduction dans la culture de nouveaux organismes de référence ou après avoir modifié significativement les conditions de culture. Quoiqu'il en soit, au moins deux essais de référence sont menés chaque année.

### VALIDITÉ DE L'ESSAI

6. Pour qu'un essai soit valide, les critères de performance suivants s'appliquent :

- dans le témoin, y compris le cas échéant dans le témoin solvant, un maximum de 15 % des larves sont immobilisées ou présentent d'autres signes de défaillance ou de stress (par exemple une apparence anormale ou un comportement inhabituel, comme le fait d'être piégées à la surface de l'eau) à la fin de l'essai ;
- la concentration d'oxygène dissous à la fin de l'essai est  $\geq 3$  mg/l dans les récipients d'essai et les récipients témoins.

### DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

#### *Appareils*

7. Les récipients et autres équipements qui sont amenés à entrer en contact avec les solutions d'essai sont intégralement en verre, ou en un autre matériau chimiquement inerte. Conviennent par exemple des boîtes de Petri de 50 ml (hauteur : 3 cm, diamètre intérieur : 4.7 cm) ou des béchers de 100 ml (hauteur : 7 cm, diamètre intérieur : 4.5 cm), qui sont nettoyés avant utilisation suivant des procédures standard de laboratoire. Afin de réduire la déperdition d'eau par évaporation et de prévenir l'entrée de poussière dans les solutions, les récipients d'essai sont couverts (par exemple par un couvercle en verre, du verre de montre ou du parafilm). Les substances d'essai volatiles et les autres substances d'essai susceptibles d'être difficiles à tester sont manipulées conformément aux recommandations données dans le document d'orientation No. 23 de l'OCDE (9).

8. Par ailleurs, tout ou partie des équipements suivants peut être utilisé : un appareil pour mesurer la concentration de l'oxygène (à l'aide d'une microélectrode ou d'un autre dispositif destiné à mesurer l'oxygène dissous dans des échantillons de faible volume) ; un pH-mètre ; un appareil pour déterminer la dureté de l'eau ; un thermostat adéquat, etc. Si l'eau de dilution provient d'une eau souterraine ou d'une eau de surface, un appareil pour déterminer la concentration de carbone organique total (COT) dans l'eau ou la demande chimique en oxygène (DCO) est nécessaire.

#### *Organismes d'essai*

9. Cet essai utilise des *Chironomus riparius* au premier stade larvaire, car on a montré qu'il s'agissait du stade larvaire le plus sensible (21). De plus, cet instar de larve se meut en nage libre et comme tel il n'est pas stressé par l'absence de sédiment. Bien que *C. riparius* soit à privilégier, il est aussi possible d'utiliser *C. dilutus* ou *C. yoshimatsui*. Des précisions sur les méthodes de culture sont disponibles pour *C. riparius* (annexe 2), *C. dilutus* (20) et *C. yoshimatsui* (18). Les organismes d'essai proviennent d'une source (de préférence une culture sur site) dans laquelle l'identité de l'espèce d'essai a été confirmée.

10. Les larves doivent être issues d'un lot sain (c'est-à-dire qui ne présente pas de signe de stress, tels qu'une mortalité élevée, des animaux décolorés, etc.) et dont l'histoire est connue (méthode d'élevage, conditions de culture). Tous les organismes utilisés pour un test doivent provenir de la même culture. Les

cultures sont maintenues dans des conditions (de lumière, de température et de milieu) semblables à celles utilisées dans l'essai. Si le milieu utilisé dans l'essai est différent de celui où sont normalement élevés les chironomes, il convient de ménager une période d'acclimatation avant l'essai, en plaçant des amas d'œufs destinés à éclore et en maintenant les larves de premier stade dans l'eau de dilution à la température appliquée pendant l'essai, jusqu'au début de l'exposition.

### *Eau d'acclimatation et de dilution*

11. On peut utiliser, comme eau d'acclimatation et de dilution, de l'eau naturelle (eau de surface ou eau souterraine), de l'eau reconstituée ou de l'eau du robinet déchlorée, du moment que les chironomes y survivent sans montrer de signes de stress pendant toute la durée de l'élevage, de l'acclimatation et de l'essai. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable selon les critères spécifiés à l'[annexe 3](#) peut servir à l'essai. Il convient que sa qualité reste constante tout au long de l'essai. Les eaux reconstituées peuvent être composées d'eau distillée ou désionisée, auxquelles on ajoute certaines quantités spécifiques de réactifs de qualité analytique. Des exemples d'eau reconstituée sont donnés dans l'[annexe 2](#).

12. Dans le cas de l'eau naturelle, les caractéristiques de la qualité de l'eau énumérées à l'[annexe 3](#) sont mesurées au moins deux fois par an ou chaque fois que ses caractéristiques sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées. Les métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple) doivent être mesurés. Si de l'eau du robinet déchlorée est utilisée, il est souhaitable de procéder chaque jour à une analyse de sa teneur en chlore. Si l'eau de dilution provient d'une eau souterraine ou d'une eau de surface, sa conductivité et son carbone organique total (COT) ou sa demande chimique en oxygène (DCO) sont mesurés.

13. Pour éviter qu'il y ait besoin d'une adaptation avant l'essai, il est recommandé d'utiliser la même eau dans l'essai et dans la culture. L'eau de dilution peut être aérée avant utilisation dans l'essai, de façon à ce que la concentration de l'oxygène dissous atteigne la saturation.

### *Solutions d'essai*

14. Les solutions d'essai sont généralement amenées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. De préférence, les solutions mères sont préparées par dissolution de la substance d'essai directement dans l'eau de dilution. Le recours à des solvants ou dispersants est évité dans toute la mesure du possible ; néanmoins, des solvants peuvent être nécessaires dans certains cas, pour obtenir une solution mère à la concentration voulue et homogène. Des recommandations sur les solvants adaptés et sur d'autres aspects concernant la manipulation de substances difficiles, telles que les substances et les mélanges qui se biodégradent, qui forment des complexes, qui s'ionisent ou qui sont multi-composantes, sont disponibles dans le document d'orientation No. 23 (9). Pour les ingrédients actifs ou d'autres produits chimiques isolés (c'est-à-dire qui ne sont pas des mélanges), la substance d'essai présente dans les solutions d'essai n'excède pas sa limite pratique de solubilité dans l'eau de dilution. Si on utilise des agents solubilisants, la concentration de solvant est égale pour toutes les concentrations d'essai et dans le témoin solvant. En outre, la concentration maximale de solvant est de 100 µl/l ou de 100 mg/l, la plus basse de ces deux concentrations étant retenue (9).

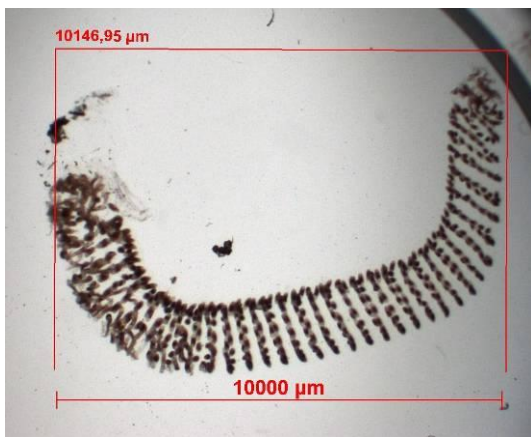
15. L'essai est généralement mené sans ajustement du pH. Si le pH ne reste pas dans la plage comprise entre 6 et 9, alors il convient de procéder à un deuxième essai, en ajustant le pH de la solution mère à celui de l'eau de dilution avant de préparer les solutions d'essai. Lors de l'ajustement du pH, de préférence avec 0.1 M HCl et 0.1 M NaOH, il convient que la solution mère ne soit quasiment pas modifiée, et qu'aucune réaction chimique, telle que la précipitation de la substance d'essai, ne soit provoquée. Pour maintenir les concentrations d'essai pendant 48 heures, des ajustements du pH dans la

plage comprise entre 6 et 9 peuvent être adaptés pour des produits chimiques susceptibles d'être instables au-delà de ces valeurs.

## PROCÉDURE

### *Préparation des organismes d'essai avant l'exposition*

16. Quatre à cinq jours avant l'introduction des larves du premier stade dans les récipients d'essai (début de l'essai), des amas d'œufs frais (< 24 h) doivent être prélevés dans la culture. Pour s'assurer que les œufs utilisés dans l'essai ont l'âge requis, il convient de nettoyer le rebord des récipients de culture pour en ôter les anciens amas d'œufs 24 heures avant la collecte (ces anciens amas peuvent rester à l'intérieur des récipients). Pour commencer l'essai de toxicité, on laisse éclore au moins trois, mais de préférence six amas d'œufs sélectionnés à partir de la culture et on ajoute un peu de nourriture (voir paragraphe 17). Les larves de l'essai sont sélectionnées au hasard à partir de ce lot. Il est possible d'utiliser un milieu plus ancien issu de la culture-mère ou un milieu fraîchement préparé. 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). L'essai est réalisé avec des chironomes au premier stade larvaire. Si nécessaire, il est possible de vérifier le stade de développement des larves de moucheron d'après la largeur de la capsule de la tête (20). Les figures 1 et 2 représentent respectivement un amas d'œufs fraîchement pondus et un amas d'œufs ayant presque fini d'éclore.



**Figure 1 : amas d'œufs de *C. riparius* fraîchement (< 24 h) pondus (21)**



**Figure 2 : larves de premier stade provenant d'un amas d'œufs de *C. riparius* presque entièrement éclos (21)**

17. Les larves ne doivent pas être nourries pendant l'essai. Néanmoins, il importe de les nourrir avant l'exposition (c'est-à-dire juste après l'éclosion), pour garantir un taux de survie des larves  $\geq 85\%$  dans les témoins à la fin de la période d'exposition. Chaque jeune larve recevra quotidiennement 0.05-0.5 mg de nourriture, sous la forme de quelques gouttelettes de filtrat d'une suspension de paillettes pour poissons finement broyées (par exemple Tetra-Min ou Tetra-Phyll, voir aussi (11)). Il a aussi été suggéré que les algues vertes peuvent servir d'aliment (10) (11), mais il faut veiller à ne pas « inoculer » d'algue dans le milieu lors de l'ajout des larves aux récipients d'essai, ce qui pourrait influencer la disponibilité du composé d'essai. La nourriture pour poissons peut être remplacée par une ration végétale, par exemple de feuilles d'ortie (*Urtica dioica*), de mûrier (*Morus alba*), de trèfle blanc (*Trifolium repens*), d'épinard (*Spinacia oleracea*) ou d'un autre matériel végétal (Cerophyl ou alpha-cellulose). Néanmoins, dans la mesure où les quantités de nourriture recommandées dans la littérature varient considérablement, il est conseillé à chaque laboratoire de définir la quantité de nourriture nécessaire avant l'exposition pour assurer une survie adaptée lors de l'essai. Ces extraits d'aliments pour poissons, préparés en faisant bouillir de la suspension de nourriture pour poissons, puis en enlevant les particules les plus grosses, par exemple en les filtrant ou en écartant une fraction prédéfinie, présenteront généralement une concentration en COT d'environ 3.7 g/l, dont de très petites quantités seront transférées dans les récipients d'essai.

18. Les larves de chironomes peuvent être piégées à la surface de l'eau et ne pas pouvoir rejoindre la colonne d'eau. Ce phénomène dépend essentiellement des propriétés physico-chimiques de la substance et/ou du milieu d'essai, mais peut également être lié au nettoyage des récipients en verre. Introduire les larves dans le système d'essai en les relâchant en-dessous de la surface de l'eau réduit le piégeage. Dans le cas où des larves seraient piégées, verser doucement dessus une gouttelette du milieu de traitement par l'intermédiaire d'une pipette peut les aider à couler vers le fond. Le phénomène du piégeage peut invalider certaines études (par exemple, mortalité élevée du groupe témoin). Une solution possible pour éviter le piégeage consiste à ajouter une très faible quantité de dispersant, par exemple du Tween 80 à 2  $\mu\text{l/l}$ , afin de réduire la tension superficielle du milieu, bien que l'utilisation de dispersants ne soit en général pas conseillée (voir aussi paragraphe 14). Une autre façon de procéder serait d'empêcher physiquement les larves d'atteindre l'interface air/eau, par exemple en employant des récipients scellés hermétiquement ou un maillage qui retienne les organismes en-dessous de la surface.

### **Conditions d'exposition**

#### *Groupes traités et témoins*

19. On remplit les récipients d'essai avec les volumes voulus de solution d'essai. Des larves de chironomes du premier stade choisies au hasard sont déposées dans les récipients à l'aide d'une pipette émoussée. Il faut utiliser, pour chaque concentration d'essai et pour les témoins, au moins 20 animaux, répartis de préférence en quatre groupes de cinq animaux. Un volume d'au moins 2 ml de solution d'essai est prévu pour chaque animal (soit au moins 10 ml pour cinq larves par récipient ; il convient que le volume suffise à prélever les échantillons requis à la fin de l'essai pour réaliser les déterminations analytiques des concentrations d'exposition).

#### *Concentrations d'essai*

20. Un essai préliminaire de détermination des concentrations peut être mené pour déterminer la plage des concentrations de l'essai définitif. À cette fin, les larves sont exposées à une série de concentrations de la substance d'essai largement espacées. Au moins dix larves sont exposées, réparties en deux expériences identiques par concentration d'essai pendant 48 heures.

21. Au moins cinq concentrations doivent être utilisées pour l'essai définitif, avec un témoin pour l'eau de dilution et un pour le solvant (le cas échéant). Le témoin solvant présente une concentration de

solvant identique à celle utilisée dans l'essai. Les concentrations doivent former une série géométrique de concentrations séparées de préférence par un facteur inférieur ou égal à 2.2. Si on utilise moins de cinq concentrations ou un facteur d'espacement des concentrations plus important, il convient de le justifier, par exemple par la faible pente de la courbe dose effet. De préférence, la concentration la plus élevée provoque 100 % d'immobilisation, et la moins élevée ne donne lieu à aucun effet observable. Une définition adéquate de la CE<sub>50</sub> prime toutefois sur ces niveaux d'effet.

#### *Conditions d'incubation*

22. Il convient que la température de l'eau soit comprise entre 18 et 22 °C pour *C. riparius*. Pour *C. dultus* et *C. yoshimatsui*, les températures recommandées sont 23°C et 25°C respectivement, et pour chaque essai il convient que la température soit constante à 1 °C près. Une alternance de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité est recommandée et l'éclairage est compris entre 500 et 1 000 lux. Une obscurité complète est également acceptable, en particulier pour les substances d'essai instables à la lumière. Les récipients d'essai sont disposés au hasard.

#### *Durée*

23. L'exposition débute lors de l'introduction des larves dans les solutions d'essai et dure 48 heures.

#### *Observations*

24. À échéances de 24 et 48 heures après le début de l'exposition, la présence de larves immobiles est contrôlée dans chaque récipient d'essai. Pour faciliter les observations, on peut s'aider d'un microscope stéréo ou d'une table lumineuse. Les animaux incapables de changer de position (en rampant ou en nageant) dans les 15 secondes qui suivent leur stimulation mécanique, c'est-à-dire par exemple après qu'on leur a versé dessus un peu d'eau à l'aide d'une pipette Pasteur ou après agitation du récipient, sont considérés comme immobiles. Les mouvements des larves sont erratiques et des phases de forte activité (c'est-à-dire de nage par contraction rapide de leur corps en forme de huit puis relâchement) alternent avec des phases sans mouvement. L'immobilité sert de paramètre de substitution pour l'évaluation de la létalité, comme cela a été défini pour des daphnies nouvelles-nées dans la LD pour les essais de toxicité aiguë de 48 heures (12), puisqu'il est difficile d'établir la mort des larves de premier stade. Outre l'immobilité, tout comportement anormal ou aspect inhabituel sera noté dans le rapport. Les larves immobiles observées à échéance de 24 heures ne sont pas enlevées des récipients, pour que leur immobilité puisse être confirmée à la fin de l'essai. Les larves disparues sont comptabilisées avec les larves immobiles.

#### *Mesures analytiques*

25. L'oxygène dissous et le pH sont mesurés au moins au début et à la fin de l'essai dans le ou les récipient(s) témoin(s) et dans ceux contenant la concentration de la substance d'essai la plus élevée. Il convient que la concentration de l'oxygène dissous dans les témoins soit conforme au critère de validité. La teneur en oxygène dans les récipients témoins et d'essai est indiquée en mg/l. Normalement, le pH ne varie pas de plus de 1.5 unité au cours d'un essai. En règle générale, on mesure la température dans les récipients témoins, et il est préférable de l'enregistrer en continu au cours de l'essai ou, au minimum, au début et à la fin de l'essai.

26. La concentration de la substance d'essai est mesurée, au minimum, dans le ou les récipients témoins et dans les récipients contenant la concentration la plus élevée et la concentration la plus basse, mais de préférence dans tous les récipients, au début et à la fin de l'essai (4). Il est recommandé d'exprimer les résultats en fonctions des concentrations mesurées. Toutefois, si l'on peut démontrer de façon suffisamment convaincante que la concentration de la substance d'essai a été maintenue tout au long de

l'essai de manière satisfaisante dans un intervalle de  $\pm 20\%$  de la concentration nominale ou de la concentration initiale mesurée, alors les résultats peuvent être basés sur les valeurs nominales ou les valeurs initiales mesurées.

### **ESSAI LIMITE**

27. Un essai limite à concentration unique peut être conduit à 100 mg/l de substance d'essai ou jusqu'à sa limite pratique de solubilité dans le milieu d'essai (si cette dernière est plus basse), de façon à démontrer que la  $CE_{50}$  est supérieure à cette concentration. L'essai limite est mené sur 20 larves (de préférence réparties en quatre groupes de cinq), avec un nombre équivalent d'animaux dans les récipients témoins. Si le pourcentage d'immobilisations dépasse les 15 % à la fin de l'essai, il y a lieu de mener une étude dose-effet complète. Tout comportement anormal observé est enregistré.

### **RÉSULTATS ET RAPPORT**

#### *Données*

28. Les résultats sont synthétisés dans des tableaux mettant en évidence, pour chaque groupe d'essai et chaque témoin, le nombre de larves utilisées et l'immobilisation à chaque observation. En outre, une représentation graphique montre les pourcentages immobilisés à 24 et 48 heures par concentration d'essai. Les résultats sont analysés au moyen des modèles appropriés (analyse probit par exemple) recommandés par le document d'orientation statistique sur les essais d'écotoxicité (13) pour calculer les courbes dose-effet, leur pente et la  $CE_{50}$  avec des limites de confiance de 95 % (16) (3). La CSEO peut être calculée par l'un des tests statistiques présentés dans le document d'orientation (13), comme le test exact de Fisher (4).

29. Lorsque les données obtenues ne se prêtent pas au calcul de la  $CE_{50}$  par les méthodes standard, on utilise la concentration la plus élevée qui ne donne aucune immobilisation et la plus faible qui donne 100 % d'immobilisation pour en déduire une valeur approximative de la  $CE_{50}$  (en prenant la moyenne géométrique de ces deux concentrations).

#### *Rapport d'essai*

30. Le rapport d'essai mentionne les informations suivantes :

##### Substance d'essai

- État physique et propriétés physico-chimiques pertinentes
- Données permettant l'identification chimique, y compris la pureté

##### Organisme d'essai

- Source et espèce de chironome, fournisseur (s'il est connu) et conditions de culture appliquées (notamment source, type et quantités de nourriture, fréquence de l'alimentation)

##### Conditions expérimentales

- Description des récipients d'essai : type et volume des récipients, volume de la solution, nombre de chironomes par récipient, nombre de récipients d'essai (essais identiques) par concentration
- Méthodes de préparation des solutions mères et d'essai, et notamment utilisation éventuelle et concentration de tout solvant ou agent dispersant, et concentrations d'essai utilisées

- Détails concernant l'eau de dilution : source et caractéristiques (pH, dureté, alcalinité, conductivité, etc.) ; le cas échéant, composition de l'eau reconstituée
- Conditions d'incubation : température, éclairage et périodicité de la lumière, oxygène dissous, pH, etc.

#### Résultats

- Nombre et pourcentage de larves de chironomes immobilisés ou ayant manifesté un effet adverse quelconque (y compris un comportement anormal) parmi les témoins et les groupes traités à chaque période d'observation, et description de la nature des effets constatés
- Résultats et date de l'essai effectué avec une substance de référence, le cas échéant
- Concentrations d'essai nominales et résultat de toutes les analyses visant à déterminer la concentration de la substance d'essai dans les récipients d'essai ; l'efficacité de la méthode de récupération et la limite de quantification (LQ) doivent également être signalées
- Toutes les mesures physico-chimiques (température, pH et oxygène dissous) effectuées au cours de l'essai
- $CE_{50}$  à 48 heures (immobilisation) avec des intervalles de confiance de 95 % et graphique du modèle utilisé pour le calcul, pente de la courbe dose-effet et son erreur-standard ; procédures statistiques/mathématiques utilisées pour calculer la  $CE_{50}$  (ces informations doivent aussi être précisées pour l'immobilisation à 24 heures lorsque les mesures ont été effectuées)
- CSEO à 24 et 48 heures le cas échéant
- Explication de tout écart par rapport à la LD, et des conséquences éventuelles sur les résultats de l'essai



## BIBLIOGRAPHIE

- (1) 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.
- (2) 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.
- (3) Finney DJ. (1978), *Statistical methods in biological assay*. 3<sup>e</sup> éd., Griffin, Weycombe, Londres, Royaume-Uni.
- (4) Fisher RA. (1922), « On the interpretation of  $\chi^2$  from contingency tables, and the calculation of P. », *Journal of the Royal Statistical Society*, 85: 87-94.
- (5) Fleming R., Crane M., van de Guchte C., Grootelaar L., Smaal A., Ciarelli S., Karbe L., Borchert J., Westendorf J., Vahl H., Holwerda D., Looise B., Guerra M., Vale C., Castro O., Gaudencio MJ., van den Hurk P. (1994), *Sediment toxicity tests for poorly water-soluble substances*, Rapport final à la Commission européenne, rapport n° CE 3738, WRc, Royaume-Uni.
- (6) Hill IR., Matthiessen P., Heimbach F. (Dir.) (1993), *Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments*, Society of Environmental Toxicology and Chemistry-Europe, Bruxelles, Belgique.
- (7) Kawai K. (1986), « Fundamental studies on chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera) », *Jp J Sanit Zool*, 37: 47-57.
- (8) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS. (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)*, rapport technique, Environnement Canada, Institut national de recherche sur les eaux, Burlington, Ontario, Canada.
- (9) OCDE (2000), *Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*, Série sur les essais et évaluations No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OCDE, Paris.
- (10) OCDE (2004a), *Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment chargé*, Ligne directrice No. 218, Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- (11) OCDE (2004b), *Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment chargé*, Ligne Directrice No. 219, Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- (12) OCDE (2004c), *Daphnia sp., Essai d'immobilisation immédiate*, Ligne directrice No. 202, Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- (13) OCDE (2006), *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application*, Série sur les essais et évaluations No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OCDE, Paris.

- (14) OCDE (2010), *Essai de toxicité sur le cycle de vie des chironomes dans un système eau-sédiment chargé ou eau chargée-sédiment*, Ligne directrice No. 233, Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- (15) OCDE (2011), *Validation Report for the acute Chironomid Assay*, Série sur les essais et évaluations No. 144, ENV/JM/MONO(2011)25, OCDE, Paris.
- (16) Stephan CE. (1977), « Methods for calculating an LC50 », In: *Aquatic toxicology and hazard evaluation* (Mayer FI., Hamelink JL., dir.), ASTM STP 634-American Society for Testing and Materials, pp. 65-84.
- (17) Streloke M., Köpp H. (Dir.) (1995), « Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system », *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*, n° 315, BBA, Berlin, Allemagne.
- (18) [USEPA] U.S. Environmental Protection Agency (1996a), *Whole sediment acute toxicity invertebrates*. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS 850.1735, Washington, D.C., États-Unis.
- (19) [USEPA] U.S. Environmental Protection Agency (1996b), *Chironomid sediment toxicity test*. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS 850.1790, Washington, D.C., États-Unis.
- (20) [USEPA] U.S. Environmental Protection Agency (2000), *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*, 2<sup>e</sup> édition, EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., États-Unis.
- (21) Weltje, L, Rufli, H, Heimbach, F, Wheeler, J, Vervliet-Scheebaum, M, Hamer, M. (2010), « The chironomid acute toxicity test: development of a new test system », *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6: 301-307.

## ANNEXE 1

## DÉFINITIONS/DESCRIPTIONS

Les définitions/descriptions suivantes sont utilisées dans le cadre de la présente LD :

**CE<sub>50</sub>** : concentration estimée capable d'immobiliser 50 % des larves de chironomes après une période d'exposition définie.

**Immobilisation** : les animaux incapables de changer de position (en rampant ou en nageant) dans les 15 secondes qui suivent leur stimulation mécanique, c'est-à-dire par exemple après qu'on leur a versé dessus un peu d'eau à l'aide d'une pipette Pasteur ou après agitation du récipient, sont considérés comme immobiles. Les mouvements des larves sont erratiques et des phases de forte activité (c'est-à-dire de nage par contraction rapide de leur corps en forme de huit puis relâchement) alternent avec des phases sans mouvement. Les larves disparues sont également considérées comme immobiles.

## 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) 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). Du papier filtre a également été utilisé comme substrat. Une eau de qualité appropriée, profonde de plusieurs centimètres, vient ensuite recouvrir le substrat. En cas d'évaporation, le niveau d'eau est toujours 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). Il est conseillé d'échanger régulièrement les amas d'œufs avec d'autres laboratoires pour minimiser la consanguinité.

2. Les cages doivent être gardées à température ambiante, ou à  $20 \pm 2$  °C si elles sont installées dans une chambre à ambiance constante, avec une photopériode de 16 heures de lumière (éclairage : environ 1 000 lux) et 8 heures d'obscurité. On a montré que recréer l'aube et/ou le crépuscule pendant une demi-heure grâce à un éclairage d'environ 500 lux stimule l'essaimage et la reproduction (1). 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 est aérée pendant environ 24 heures 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 des larves. Cela est fait au moins une fois par mois, ou quand la qualité de l'eau se détériore.

***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. Il est possible de nourrir les adultes émergés au moyen d'un tampon d'ouate imbibé d'une solution de sucrose saturée. Cela accroît la durée de vie et améliore la reproduction.

### *Émergence*

8. À  $20 \pm 2$  °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 et la finesse de leur corps.

### *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 n'ont pas été déposés. S'il y a besoin d'amas d'œufs pour démarrer un essai de toxicité ou préparer de nouveaux récipients de culture, ces amas d'œufs doivent être enlevés soigneusement et transférés dans un petit récipient contenant un échantillon de l'eau d'élevage. On peut les utiliser directement pour un nouveau récipient de culture (avec par exemple 2 à 4 amas d'œufs par récipient) ou attendre l'éclosion et introduire un nombre prédéfini de larves (par exemple 200) dans un nouveau récipient de culture.

10. À 20 °C 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 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 ». La solution d'essai n'est pas être préparée selon les instructions d'Elendt et Bias (3) car les concentrations de  $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  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.

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

Solutions mères (I)	Quantité pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée (mg)	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 d'essai M4 et M7 (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> <sup>(1)</sup>	57 190	1.0	0.25	2.86	0.715
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	7 210	1.0	0.25	0.361	0.090
LiCl <sup>(1)</sup>	6 120	1.0	0.25	0.306	0.077
RbCl <sup>(1)</sup>	1 420	1.0	0.25	0.071	0.018
SrCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	3 040	1.0	0.25	0.152	0.038
NaBr <sup>(1)</sup>	320	1.0	0.25	0.016	0.004
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	1 260	1.0	0.25	0.063	0.016
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	335	1.0	0.25	0.017	0.004
ZnCl <sub>2</sub>	260	1.0	1.0	0.013	0.013
CaCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	200	1.0	1.0	0.010	0.010
KI	65	1.0	1.0	0.0033	0.0033
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43.8	1.0	1.0	0.0022	0.0022
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11.5	1.0	1.0	0.00058	0.00058
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O <sup>(1)(2)</sup>	5 000	20.0	5.0	2.5	0.625
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O <sup>(1)(2)</sup>	1 991	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 pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantités de solutions mères de macronutriments ajoutées pour préparer les milieux M4 et M7 (ml/l)	Concentrations finales dans les solutions d'essai M4 et M7 (mg/l)
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	293 800	1.0	293.8
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	246 600	0.5	123.3
KCl	58 000	0.1	5.8
NaHCO <sub>3</sub>	64 800	1.0	64.8
NaSiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	50 000	0.2	10.0
NaNO <sub>3</sub>	2 740	0.1	0.274
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 430	0.1	0.143
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	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 ne former qu'une solution mère de vitamines.

	Quantité pour former une solution d'1 litre avec de l'eau désionisée (mg)	Quantités de solutions mères de vitamines ajoutées 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

### **Bibliographie**

- (1) Credland, P.F. (1973), « A new method for establishing a permanent laboratory culture of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) », *Freshwater Biology*, 3: 45-51.
- (2) Elendt, B.P. (1990), « Selenium deficiency in Crustacea ». *Protoplasma*, 154: 25-33.
- (3) Elendt, B.P. et Bias W.-R. (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.
- (4) OCDE (2010), *Validation report of the chironomid full life-cycle toxicity test*, Série sur les essais et évaluations No. 136, ENV/JM/MONO(2010)35, OCDE, Paris.

## ANNEXE 3

**QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE**

L'expérience a montré que les eaux naturelles présentant les caractéristiques suivantes (tableau 4) peuvent servir d'eau d'acclimatation et de dilution pour les chironomes.

**Tableau 4. Caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable**

SUBSTANCE	CONCENTRATIONS
Matières particulaires	< 20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Dureté en CaCO <sub>3</sub>	< 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 4

**RESULTAT DE L'ESSAI CIRCULAIRE AVEC LES SUBSTANCES DE REFERENCE  
CHLORURE DE POTASSIUM ET 3,5-DICHLOROPHENOL**

Les valeurs de  $CE_{50}$  à 24 et 48 h pour les substances de référence chlorure de potassium (KCl) et 3,5-dichlorophenol (3,5-DCP), qui ont été obtenues dans l'essai circulaire à l'appui de cette LD, sont résumées ci-dessous. L'ensemble des données est présenté dans le rapport de validation (ref. 15 de la LD). Les valeurs valides de  $CE_{50}$  ont été utilisées pour déterminer des gammes de valeurs approximatives, auxquelles les résultats des essais de référence peuvent être comparés (voir paragraphe 5).

L'analyse statistique des valeurs de  $CE_{50}$  a été menée avec le logiciel GraphPad Prism version 5.04 pour Windows, Logiciel GraphPad, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

	3,5-DCP 24h	3,5-DCP 48h	KCl 24h	KCl 48h
Nombre de valeurs	13	13	15	15
Minimum	0.770	0.517	1.53	0.330
25% Percentile	1.68	0.776	2.16	1.10
Médiane	2.30	1.67	2.84	1.44
75% Percentile	3.47	2.15	3.80	1.85
Maximum	5.74	3.86	5.94	2.19
10% Percentile	<b>0.807</b>	<b>0.541</b>	<b>1.54</b>	<b>0.643</b>
90% Percentile	<b>5.21</b>	<b>3.57</b>	<b>5.34</b>	<b>2.09</b>
Coefficient de variation	53.89%	60.12%	39.97%	35.92%

En s'appuyant sur les percentiles 10% et 90%, les valeurs de références approximatives on pu être estimées à :

3,5-DCP	<b><math>CE_{50}</math> 24h : 0.80-5.3 mg/l</b>	<b><math>CE_{50}</math> 48h : 0.50-3.6 mg/l</b>
KCl	<b><math>CE_{50}</math> 24h : 1.5-5.4 g/l</b>	<b><math>CE_{50}</math> 48h : 0.60-2.1 g/l</b>

Il convient de considérer ces gammes de valeurs comme des valeurs guides pour étudier la sensibilité des animaux provenant de la culture d'essai au cours du temps, en particulier en cas de changements

significatifs des conditions de culture ou lorsque de nouveaux organismes sont ajoutés à la culture (voir paragraphe 5).

Les valeurs pour KCl sont un peu plus homogènes que celles qui correspondent au 3,5-DCP (comme le montrent leurs coefficients de variation). Certaines caractéristiques de KCl, *i.e.* sa solubilité dans l'eau élevée, son absence de dégradation, et les concentrations d'essai environ 1000 fois plus élevées pour produire 50% d'effet, ont vraisemblablement contribué à réduire l'erreur expérimentale au laboratoire.