



Section 2
Effets sur les systèmes biologiques

Ligne directrice n° 203
Poisson, essai de toxicité aiguë

18 juin 2019

**Lignes directrices de l'OCDE pour
les essais de produits chimiques**



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

Toxicité Aiguë Chez Le Poisson

INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement mises à jour à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La révision de la présente Ligne directrice (adoptée en 1981, mise à jour en 1984 et en 1992) reflète également les mises à jour d'une série de recommandations formulées dans *OECD Fish Toxicity Testing Framework 2011* (OCDE, 2012), et comprend :

- Les méthodes alternatives: dans l'intérêt du bien-être des animaux et de l'utilisation efficace des ressources, il est important d'éviter ou de réduire l'utilisation des animaux chaque fois que cela est possible et approprié. Par conséquent, avant d'effectuer un essai de toxicité aiguë du poisson conformément à cette directive, il convient de déterminer si des informations fiables sur la toxicité aiguë du poisson pourraient être dérivées de méthodes alternatives dans une approche fondée sur le poids de la preuve, comme l'utilisation de QSAR, le *read across*, les embryons de poissons (OCDE 2013), les lignées cellulaires de poissons et autres. Alternativement, l'utilisation de l'approche par seuil (OCDE, 2010) ou l'essai de limite tel que décrit au paragraphe 30 de la présente ligne directrice peuvent suffire. Lorsque des essais sur des poissons sont exigés (**c.-à-d., les méthodes alternatives peuvent ne pas suffire en l'état actuel pour toutes les juridictions et les besoins d'essai. Par conséquent, assurez-vous que les tests satisfont aux exigences réglementaires**), des méthodes alternatives telles que celles énumérées ci-dessus peuvent être envisagées pour la recherche de la gamme de concentrations.
- La précision qu'il n'est pas obligatoire de mener des essais pour établir la concentration minimale causant 100 % de mortalité et la concentration maximale causant 0 % de mortalité (par exemple, il n'est pas nécessaire d'analyser d'autres concentrations simplement pour démontrer une mortalité de 0 et/ou 100 %).

- Des précisions sur les circonstances dans lesquelles un témoin avec l'eau est requis lorsqu'un solvant est utilisé (OCDE, 2018).
 - L'introduction d'espèces de poissons estuariens et marins dans la liste des espèces recommandées.
 - L'amélioration de l'enregistrement des anomalies visibles (également appelées signes cliniques sublétaux) que les poissons peuvent présenter pendant l'exposition afin de renforcer notre capacité à prédire la toxicité d'origine chimique et de réduire au minimum les souffrances des animaux à l'avenir, de manière analogue aux modalités décrites dans le document d'orientation n° 19 sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques comme effets observés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité sur des mammifères (OCDE, 2000).
2. Les définitions utilisées dans cette Ligne directrice sont présentées à l'annexe 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Les poissons sont exposés au produit chimique testé pour une période de 96 heures en conditions statiques, semi-statiques ou d'écoulement-traversant. Les mortalités, et les anomalies visibles relatives à l'apparence et au comportement sont enregistrées. Dans la mesure du possible, les concentrations qui tuent 50 % des poissons (CL_{50}) sont déterminées.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

4. En ce qui concerne les propriétés du produit chimique testé, les informations suivantes sont utiles : formule structurale, poids moléculaire, pureté, stabilité dans l'eau et à la lumière, constante acide de dissociation (pKa), coefficient de partage avec le carbone organique (K_{oc}) et coefficient de partage n-octanol/eau (K_{oe}), hydrosolubilité et pression de vapeur, ainsi que résultats de l'essai de biodégradabilité facile décrit dans la Ligne directrice de l'OCDE n° 301 (OCDE, 1992) ou n° 310 (OCDE, 2006a). On peut utiliser la solubilité et la pression de vapeur pour calculer la constante de Henry, qui indique les risques de perte par évaporation du produit chimique testé. La conduite de cet essai sans les informations énumérées ci-dessus doit être envisagée avec prudence sachant que la conception de l'essai sera fonction des propriétés physico-chimiques du produit chimique testé et pourrait mener à des résultats incohérents ou difficiles à interpréter. En ce qui concerne les produits chimiques peu solubles dans l'eau ou d'autres produits chimiques difficiles à tester, il convient de se reporter au document d'orientation n° 23 (OCDE, 2019) sur les essais de toxicité aquatique des substances difficiles. Lorsqu'on prévoit que les produits chimiques testés n'auront pas d'effets toxiques aigus aux concentrations expérimentales appliquées, il est recommandé de consulter les autorités réglementaires compétentes. Certains organismes de réglementation peuvent préférer omettre les essais de toxicité aiguë et passer directement aux essais de toxicité chronique, par exemple s'il est probable que les conditions d'équilibre ne seront pas atteintes pendant la durée d'un essai de toxicité à court terme. Les autres informations importantes, en particulier lorsqu'elles sont accompagnées du recueil systématique des signes cliniques sublétaux (voir l'annexe 4), comprennent le mode d'action (narcose polaire, par exemple).

5. Il faut disposer d'une méthode analytique validée dont l'exactitude, la précision et la sensibilité sont connues pour quantifier le produit chimique testé dans la solution d'essai (OCDE, 2014), lorsque cela est techniquement possible. Les paramètres de performance (exactitude, précision, limite de détection, limite de quantification, spécificité, plage de travail, etc.) doivent être signalés.

6. Si la Ligne directrice est utilisée pour tester un mélange, une substance de composition inconnue ou variable, des produits de réaction complexes ou des matériels biologiques (UVCB), ou une substance multi-constituants, sa composition doit être déterminée dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique de ses constituants, leur présence et quantité, ainsi que leur propriétés spécifiques (voir § 5). Le document d'orientation n° 23 (OCDE, 2019) contient des recommandations au sujet des essais de produits chimiques difficiles comme les UVCB ou les substances multi-constituants. Lors de l'examen des mélanges, des produits chimiques difficiles à tester (par exemple instables) ou des produits chimiques d'essai qui ne relèvent pas clairement du domaine d'applicabilité décrit dans la présente orientation, il convient de considérer au préalable si les résultats de ces essais produiront des résultats scientifiquement pertinents.

Critères de validité de l'essai

7. Les critères de validité de l'essai sont les suivants :

- dans le(s) témoin(s) (témoin avec l'eau de dilution, témoin avec solvant), la mortalité ne doit pas dépasser 10 % (soit un poisson, si moins de 10 poissons témoins sont testés) à la fin de l'exposition ;
- la concentration d'oxygène dissous est ≥ 60 % de la valeur de saturation en air dans tous les récipients d'essai pendant toute la durée de l'exposition ;
- le dosage analytique des concentrations expérimentales est obligatoire (voir § 24).

8. Tout écart par rapport aux critères de validité et à la Ligne directrice doit être signalé. Les raisons qui expliquent l'écart (les écarts) et ses (leurs) conséquences pour les résultats et la validité de l'essai doivent être notées dans le rapport d'essai. En cas d'observation d'un léger écart par rapport aux critères de validité de l'essai, les conséquences doivent être considérées en fonction de la fiabilité des données, et ces considérations doivent être notées dans le rapport d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

9. L'équipement de laboratoire normal pour la réalisation de cet essai, avec la documentation appropriée pour valider que l'équipement fonctionne correctement, comprend :

- oxygénomètre
- pH-mètre
- luxmètre

- dispositif adéquat de régulation de la température
- matériel permettant de déterminer la dureté de l'eau
- matériel permettant de déterminer la concentration de carbone organique total (COT) et la demande chimique en oxygène (DCO)
- matériel permettant de déterminer la concentration du produit chimique testé dans la solution d'essai
- matériel permettant de maintenir la température de l'eau et la teneur en oxygène, s'il y a lieu
- bassins composés d'un matériau chimiquement inerte

Récipients d'essai

10. On peut utiliser tout récipient en verre, acier inoxydable ou autre matériau chimiquement inerte. Le silicone étant connu pour sa bonne capacité d'absorption des substances lipophiles, l'usage de tubes en silicone dans les essais dynamiques et celui de joints en silicone au contact de l'eau doivent être tempérés. Les tubes utilisés pour le dosage doivent être en matériau inerte, et il est possible d'éviter les joints en silicone en utilisant, par exemple, des aquariums en verre monobloc. Les dimensions des récipients doivent être suffisamment grandes pour éviter aux poissons tout stress (autre que celui causé par le produit chimique testé) et pour satisfaire aux critères de taux de charge indiqués au § 20. Les récipients d'essai doivent être placés de manière aléatoire dans la zone d'essai et protégés des perturbations indésirables (bruit excessif, vibrations, lumière). Pour les produits chimiques difficiles à tester, on consultera le document d'orientation n° 23 (OCDE, 2019), et on modifiera le plan d'étude en conséquence. En ce qui concerne les produits chimiques volatils et autres produits difficiles à tester, d'autres mesures spécifiques doivent être prises (OCDE, 2018). Tous les matériels en silicone qui ont été en contact avec la/les solution(s) d'essai doivent de préférence être jetés et ne pas être réutilisés lors d'essais ultérieurs avec d'autres produits chimiques testés.

Choix des espèces

11. Le choix des espèces dépend des exigences réglementaires (produits chimiques industriels, pharmaceutiques, biocides ou phytosanitaires, etc.) et des scénarios d'exposition environnementale (espèces d'eau froide, tempérée ou chaude, poissons d'eau douce ou estuariens/marins). Les poissons d'eau froide sont considérés comme ceux qui nécessitent des températures de maintien inférieures à 20 °C alors que les poissons d'eau chaude sont généralement conservés à des températures supérieures à 20 °C. Les espèces de poissons d'eau tempérée préfèrent des températures comprises entre 18 °C et 22 °C. Une liste des espèces de poissons recommandées pour cet essai figure dans l'annexe 2. Ces espèces de poissons sont facilement accessibles, faciles à entretenir, et la plupart d'entre elles sont utilisées depuis longtemps dans les essais de sécurité des produits chimiques. Elles peuvent être élevées et se reproduire dans des fermes aquacoles ou en laboratoire, où elles sont protégées des maladies, fournissant des animaux sains de provenance connue pour les essais. En cas d'utilisation d'espèces autres que celles figurant dans l'annexe 2 ou d'adaptation par rapport aux recommandations de la Ligne directrice, on indiquera la raison de ce choix.

Âge et taille des poissons

12. Les poissons doivent être juvéniles (voir l'annexe 2 pour les indications concernant la taille) et provenir de la même source et de la même population dans un souci d'uniformité. Les poissons doivent être du même âge (si l'on ne connaît pas leur âge, on peut l'estimer d'après leur taille) et avoir une apparence normale.

Maintenance des poissons

13. Tous les poissons doivent être conservés au laboratoire pendant au moins neuf jours avant d'être utilisés. Les 48 premières heures constituent une période d'installation. Ensuite, les poissons doivent être acclimatés pendant au moins sept jours (48 heures d'installation + sept jours d'acclimatation = neuf jours) dans une eau similaire à l'eau servant à l'essai (voir l'annexe 3 pour les caractéristiques correspondantes) immédiatement avant le début de l'essai. La conservation des poissons doit se faire dans les conditions suivantes :

- Photopériode : adaptée à l'espèce (voir l'annexe 2) ;
- Température : adaptée à l'espèce (voir l'annexe 2) ;
- Concentration d'oxygène : au moins 80 % de la valeur de saturation de l'air ;
- Alimentation : trois fois par semaine ou quotidiennement jusqu'à 24-48 heures avant le début de l'exposition. La nourriture peut être donnée à satiété¹. Les surplus de nourriture et les fèces doivent être retirés en tant que de besoin pour éviter l'accumulation de déchets.

14. Pendant la période d'acclimatation, on note la mortalité et on applique les critères suivants :

- Mortalité supérieure à 10 % de la population en sept jours: rejet du lot entier.
- mortalité entre 5 et 10 % de la population : acclimatation poursuivie pendant sept jours supplémentaires et si il y'a plus de 5% de mortalité pendant la seconde période des sept jours, le lot entier est rejeté.
- mortalité de moins de <5 % de la population en sept jours : acceptation du lot.

Les poissons ne doivent pas présenter de signes visibles de maladie et de stress ni de malformations apparentes et ne doivent pas avoir reçu de traitement médicamenteux ou antiparasitaire au cours des 14 jours précédant l'essai. Lorsque les poissons proviennent d'étangs en plein air (carpe, crapet arlequin, par exemple) ou, dans des circonstances exceptionnelles, de populations sauvages, ils peuvent avoir besoin d'un traitement médicamenteux ou antiparasitaire dès leur arrivée au laboratoire d'essai, ce qui nécessite 14 jours supplémentaires d'acclimatation. L'utilisation de poissons provenant de populations sauvages doit être évitée autant que possible.

¹ Certaines espèces de poissons (le medaka, par exemple) mangent trop parce que leur centre de la satiété est réduit voire inexistant, ce qui peut entraîner le dépassement de la taille recommandée à l'annexe 2.

Eau (eau de dilution, milieu d'essai)

15. S'agissant des poissons d'eau douce, il est préférable d'utiliser de l'eau de surface, de l'eau souterraine ou de l'eau reconstituée propre (ISO, 1996) (voir les annexes 2 et 3), bien que de l'eau potable déchlorée puisse également être utilisée si nécessaire. S'agissant des espèces estuariennes ou marines, l'eau reconstituée est préférable à l'eau de mer et peut être préparée en ajoutant des sels marins commerciaux (tels que *Instant Ocean*, *Red Sea* ou équivalent) à l'eau désionisée ou distillée. 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. L'eau doit être de qualité constante pendant toute la durée de l'essai. La qualité de l'eau est considérée comme bonne si les poissons survivent pendant toute la durée de l'élevage, de l'acclimatation et de l'essai sans montrer de signes de stress. La dureté totale et le pH doivent se situer dans la plage optimale pour les espèces de poissons sélectionnées (voir l'annexe 2). Les réactifs utilisés dans la préparation de l'eau de dilution doivent être de qualité pour analyse, et l'eau désionisée ou distillée doit avoir une conductivité $\leq 10 \mu\text{S/cm}$. L'eau de dilution est aérée avant utilisation dans l'essai, de façon à ce que la concentration de l'oxygène dissous atteigne la saturation.

16. Pour s'assurer que l'eau de dilution ne puisse pas influencer sur le résultat de l'essai (par complexation du produit chimique testé, par exemple) ou avoir des effets néfastes sur la performance des poissons géniteurs, on prélèvera des échantillons à différents intervalles pour analyse. L'analyse chimique du type d'eau servant à l'essai doit inclure les éléments et les limites des concentrations maximales indiquées à l'annexe 3 sur la base d'essais au moins semestriels, sauf s'il peut être démontré que ces exigences sont systématiquement respectées. Si l'eau des récipients de test est recyclée, il faut surveiller régulièrement l'ammoniac (NH_3) pour s'assurer de la qualité de l'eau et du bien-être des animaux. Si de l'eau naturelle est utilisée, le COD ou le COT et la teneur en nitrate (NO_3) doivent être mesurés une fois avant l'essai. Si de l'eau du robinet déchlorée est utilisée, il faut démontrer que la survie, la croissance et la reproduction des organismes testés ne sont pas affectées et que les organismes testés ne présentent pas d'autres signes de stress. On procédera à des analyses de nitrate et de chlore pour chaque lot d'eau de dilution afin de démontrer que les limites spécifiées à l'annexe 3 ne sont pas dépassées.

Solutions d'essai

17. Des solutions d'essai des concentrations sélectionnées peuvent être préparées, par exemple par dilution d'une solution-mère. Les solutions-mères doivent, de préférence, être préparées par simple mélange ou agitation du produit chimique testé dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (agitation ou ultrasons, par exemple). Si le produit chimique testé n'est pas stable dans les conditions expérimentales et/ou s'il est difficile à dissoudre dans l'eau, les procédures décrites dans le document d'orientation n° 23 doivent être suivies (OCDE, 2019). L'emploi de solvants doit être évité, les solvants n'étant utilisés qu'en dernier recours pour obtenir une solution-mère à la concentration appropriée. Si l'emploi d'un solvant ne peut être évité, il convient de consulter le document d'orientation n° 23 (OCDE, 2019) doit être consulté. La concentration finale du solvant utilisé doit être réduite autant que possible (et ne pas dépasser 100 mg/L ou 0.1 mL/L) et doit être la même dans tous les récipients d'essai, à l'exception du témoin avec l'eau de dilution (OCDE, 2019). En ce qui concerne les témoins, voir le paragraphe 23.

18. L'essai doit être réalisé sans ajustement du pH. Toutefois, s'agissant des produits chimiques ionisables, l'essai définitif doit être réalisé à un pH stable correspondant à la forme la plus toxique du produit chimique testé (variable selon le produit chimique), suivant la procédure décrite dans le document d'orientation n° 23 (OCDE, 2019) tant que le pH ne dépasse pas la plage de pH de 6.0-8.5 (voir annexe 2). Lorsque le produit chimique provoque en soi une modification du pH du milieu d'essai en dehors de la plage de pH 6.0-8.5, il est possible d'ajuster la solution-mère pour respecter la plage spécifiée de pH 6.0-8.5 (OCDE, 2019). Si l'essai est effectué avec ajustement du pH, il n'est pas nécessaire réaliser un essai parallèle sans ajustement, sauf si des réglementations spécifiques l'exigent. On privilégiera le HCl et le NaOH pour l'ajustement du pH.

PROCÉDURE

Conditions d'exposition

19. **Durée** : 96 heures.

- **Chargement** : En ce qui concerne les poissons d'eau douce, une charge maximale de 0.8 g de poids frais/L est recommandée pour les essais avec renouvellement statique ou semi-statique. En ce qui concerne les systèmes dynamiques, la charge maximale recommandée est de 0.5 g de poids frais de poissons/L par 24 heures (exemple : dans une cuve de 10 L avec un débit de cinq volumes par 24 heures, un total de 50 L passe dans la cuve en 24 heures. Avec 25 g de poisson, cela correspond à 25 g dans 50 L en 24 heures, soit 0.5 g/L en 24 heures). Une charge ne dépassant pas 5 g/L de solution à tout moment est recommandée.
- **Lumière** : Elle doit se situer dans les plages de photopériode spécifiées pour les espèces testées (voir le tableau 1 de l'annexe 2) et avoir une intensité de 10-20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 540-1 000 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire).
- **Température** : La température de l'eau ne doit pas varier de plus de 2 °C entre les récipients d'essai ou d'un jour sur l'autre à tout moment pendant l'exposition, et doit se situer dans les plages de température spécifiées pour les espèces testées (voir l'annexe 2) ; par exemple, en ce qui concerne le poisson-zèbre, la température de l'eau devant être comprise entre 21°C et 25 °C, la température choisie pourrait être 24 °C, avec une variation maximale de ± 1 °C entre les récipients d'essai et d'un jour sur l'autre qui respecte la plage recommandée 21-25 °C).
- **Concentration d'oxygène** : pas moins de 60 % de la valeur de saturation de l'air. Il est possible d'aérer, à condition que cela n'entraîne pas une perte significative de produit chimique testé, comme le confirment les mesures analytiques des concentrations expérimentales (voir § 25).
- **Alimentation** : aucune.
- **Perturbation** : les perturbations (vibrations ou bruit excessifs, par exemple) qui pourraient modifier le comportement des poissons doivent être évitées ou réduites autant que possible.

Nombre de poissons et manipulation des poissons

20. Un minimum de sept poissons doit être utilisé à chaque concentration expérimentale et dans le(s) témoin(s). Les poissons doivent être répartis au hasard dans les différents groupes de traitement. Aucune réplication des cuves expérimentales n'est requise.

Concentrations expérimentales

21. Toutes les sources d'information doivent être prises en compte lors du choix de la gamme de concentrations expérimentales, telles que les prédictions dans le domaine d'applicabilité des modèles QSAR valides, les estimations à partir de données croisées ou de regroupements valides et les données provenant d'autres essais (utilisation d'embryons de poissons ou de lignées de cellules de poissons, par exemple). Si ces données ne sont pas disponibles ou s'il n'est pas possible d'avoir suffisamment confiance, il convient d'envisager de procéder à un essai de détermination de l'ordre de grandeur sur des poissons appartenant, de préférence, à la même espèce (1). Dans ce cas, le recours à la concentration « seuil » (OCDE, 2010) dérivée des études sur les algues et les daphnies (annexe 1) peut guider la détermination de la gamme de concentrations. Notons qu'il n'est pas obligatoire d'identifier une concentration maximale causant 0 % de mortalité ni une concentration minimale causant 100 % de mortalité.

22. Pour l'essai définitif avec des poissons, on utilise au moins cinq concentrations dans une série géométrique avec un facteur ne dépassant pas de préférence 2.2 ; des facteurs de séparation plus petits de 1.6 à 1.8 doivent être utilisés chaque fois que possible (Rufli et Springer, 2011).

Témoins

23. Lorsqu'un solvant est utilisé, un témoin avec solvant est nécessaire en plus du témoin avec l'eau de dilution. Toutefois, le témoin avec l'eau de dilution peut être omis, et l'essai peut être effectué et évalué avec uniquement un témoin avec solvant, à condition qu'il soit approprié compte tenu des besoins quant à ces données et des exigences des autorités réglementaires compétentes. Seuls les solvants à faible toxicité (acétone, éthanol, méthanol, alcool tertiobutylique, acétonitrile, diméthylformamide, diméthylsulfoxyde et triéthylèneglycol) recommandés dans le document d'orientation n° 23 (OCDE, 2019) doivent être utilisés, alors que les solvants dont la toxicité est inconnue ne doivent pas être employés. Il convient de noter que malgré leur faible toxicité pour les poissons, le diméthylformamide et le diméthylsulfoxyde doivent être évités autant que possible pour des raisons de santé et de sécurité humaines.

Fréquence des dosages analytiques et des mesures

24. Pour tous les systèmes d'essai, l'analyse de la concentration d'essai la plus élevée et la plus faible (ou la plus faible concentration quantifiable, comme il est recommandé dans le document d'orientation no 23 (OCDE, 2019)) et une concentration autour de la CL50 attendue est considérée comme l'exigence minimale. Cependant, la mesure de chaque concentration individuelle est préférée. En outre, il convient de veiller à ce que les déterminations reflètent les concentrations du produit chimique d'essai dissous (document d'orientation no 23 (OCDE 2019)). Si les produits chimiques ne sont pas stables, idéalement, la détermination analytique doit être effectuée immédiatement

sur des échantillons frais. Alternativement, la détermination de la stabilité du stockage de l'analyte dans les échantillons est jugée utile pour différencier l'instabilité potentielle dans les conditions d'essai de l'instabilité potentielle dans les conditions de stockage. Pour les essais statiques, l'analyse chimique des concentrations d'essai doit être effectuée au début et à la fin de la période d'exposition. Pour les essais de renouvellement semi-statiques, les concentrations d'essai doivent être mesurées au moins deux fois sur une période d'exposition (avant et après le renouvellement des solutions d'essai). Pour les essais d'écoulement traversant, l'analyse chimique des concentrations d'essai doit être effectuée avant l'initiation de l'exposition afin de vérifier si les concentrations cibles sont atteintes et maintenues. La fréquence d'échantillonnage nécessaire pour l'analyse chimique lors de l'exposition doit être décidée sur la base de la stabilité du produit chimique d'essai dans la ou les solution (s) de stock et sur quelle fréquence les solutions de stock sont renouvelées, de telle sorte que la stabilité de l'exposition chimique d'essai puisse être documentée. Il doit être prouvé que la concentration du produit chimique testé a été maintenue de façon satisfaisante et, de préférence, elle devrait être d'au moins 80% de la concentration nominale tout au long de l'essai. Si les concentrations peuvent diminuer de plus de 20% lors de l'exposition, alors toutes les concentrations d'essai doivent être mesurées, et des analyses plus fréquentes sont recommandées, par exemple après 48 heures.

25. Au cours de l'essai, on doit mesurer quotidiennement l'oxygène dissous, le pH, la salinité (s'il y a lieu) et la température, dans tous les récipients d'essai – la température de préférence en continu, la dureté (sauf si sa stabilité dans le temps est démontrée) et le COT au début de l'exposition dans l'eau de dilution. Dans les systèmes semi-statiques, on doit mesurer l'oxygène dissous, le pH, la salinité (s'il y a lieu) et la température avant et après le renouvellement de l'eau.

Observations, euthanasie et mesure des poissons

26. **Observations et enregistrement :** Dans la mesure du possible, un minimum de deux observations doivent être effectuées dans les 24 premières heures de l'étude, avec de préférence un intervalle d'au moins trois heures entre deux observations. Par exemple, le poisson pourrait être inspecté à $2 \text{ h} \pm 0.5 \text{ h}$, $5 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ et $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ après le début de l'exposition (jour 0-1). Aux jours 2-4 de l'essai, tous les récipients contenant des poissons vivants doivent être inspectés deux fois par jour (de préférence tôt le matin et en fin d'après-midi pour mieux couvrir les périodes de 24 heures). Les décès et les anomalies visibles en ce qui concerne l'équilibre (perte d'équilibre, tête en haut ou en bas, poisson flottant ou coulant, par exemple), l'apparence (pigmentation claire ou foncée, exophtalmie), le comportement ventilatoire (hyperventilation, hypoventilation ou ventilation irrégulière, toux) et le comportement natatoire (hyperactivité ou hypoactivité, immobilité, convulsions, nage près de la surface ou du fond, augmentation ou diminution de la nage en groupe ou en banc) sont notés dans le rapport d'essai. Si possible, des signes cliniques supplémentaires peuvent être consignés tels qu'ils sont énumérés dans les tableaux 1 et 2 de l'annexe 4.

27. **Mortalité :** Les poissons sont considérés comme morts en cas d'absence de mouvement visible (mouvements des branchies, par exemple) et si le contact avec le

pédoncule caudal ne provoque aucune réaction². Les décès sont notés dans le rapport d'essai, et les poissons morts sont retirés dès qu'ils sont identifiés.

28. **Euthanasie** : Les poissons survivants des groupes de traitement sont euthanasiés à la fin de l'exposition, alors que l'euthanasie des poissons survivants des groupes témoins n'est pas nécessaire mais ils ne doivent pas être utilisés dans un autre test. Pour la méthode d'euthanasie des poissons, on consultera les directives nationales ou européennes (UE) respectives (la directive 2010/63/UE, par exemple) (Commission européenne, 2010).

29. **Mesure des poissons** : La taille individuelle (poids humide et longueur totale) doit être mesurée avant le début de l'exposition dans au moins un sous-échantillon de 10 poissons appartenant à l'aquarium désigné³. Ces poissons ne seront pas utilisés dans l'essai. Si ces poissons sont mesurés plus d'une semaine avant le début de l'essai, on doit mesurer les poissons du témoin à la fin de l'exposition pour confirmer la longueur requise des poissons. Le poids humide peut être déterminé par exemple en plaçant les poissons vivants dans un récipient pré-pesé contenant de l'eau de culture et en enregistrant le poids total. La longueur totale peut être renseignée au moyen d'images photographiques, par exemple. L'annexe 2 indique la taille requise pour les espèces de poissons recommandées.

ESSAI LIMITE

30. Sur la base du mode opératoire décrit dans la présente Ligne directrice, un essai limite peut être conduit pendant 96 heures à 100 mg/L ou jusqu'à la limite de solubilité dans le milieu d'essai, dans les conditions d'essai ou à la concentration seuil comme définie dans l'annexe 1, selon la valeur la plus basse, de façon à démontrer que la CL₅₀ est supérieure à cette concentration. L'essai limite doit être effectué sur au moins sept poissons, avec le même nombre de poissons dans le(s) témoin(s)⁴. Si des anomalies visibles sont observées, elles doivent être notées dans le rapport d'essai (voir l'annexe 4 pour une liste complète des signes cliniques sublétaux qui peuvent être enregistrés en plus des informations mentionnées au paragraphe 26. Le test limite est considéré valide si la mortalité dans les témoins est inférieure ou égale à 10%, ou équivaut à un poisson mort si l'on a moins de 10 poissons témoins.

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Traitement et expression des résultats

31. Il est recommandé de calculer les résultats en utilisant les concentrations mesurées du produit chimique testé. Si l'écart par rapport aux concentrations nominales est inférieur à 20 %, les résultats peuvent être basés également sur les concentrations nominales. Il convient de noter qu'il est souvent utile de citer à la fois les concentrations mesurées et les concentrations nominales voir document d'orientation n° 23 : (OCDE,

² Il convient de noter que selon certains organismes de réglementation, il n'est pas permis par l'éthique ni par la loi de causer la mort des poissons. Dans ces cas, l'état moribond est fréquemment utilisé (voir l'annexe 4, références bibliographiques : Commission européenne, 2010 ; CCPA, 2005).

³ La mesure d'un sous-échantillon au début de l'essai permet de vérifier le taux de charge.

⁴ La loi binomiale (théorème de Bernoulli, où $p=q=50\%$) tend à montrer que lorsque 7 à 10 poissons sont utilisés avec un décès au maximum, il y a au moins 94 à 99 % de confiance que la CL₅₀ soit supérieure à la concentration utilisée dans l'essai limite.

2019). Les résultats sont récapitulés sous forme de tableau indiquant le nombre de poissons utilisés, la mortalité et les effets sublétaux pour chaque concentration et témoin(s) à chaque temps d'observation. La consignation des signes cliniques comme indiqué dans le paragraphe 26 est obligatoire, alors que la consignation des signes cliniques indiqués dans l'annexe 4 aux tableaux 1 et 2, est optionnelle. Si un essai limite est effectué, aucune représentation graphique des réponses ni calcul statistique n'est nécessaire. Sinon, le pourcentage cumulé de décès pour chaque période d'exposition, de préférence sur une échelle de probits ou de probabilités afin de produire une ligne droite, est représenté par rapport à la concentration sur une échelle logarithmique.

32. Les méthodes statistiques à utiliser pour l'estimation de la CL_{50} dépendent du nombre de concentrations observées avec des décès partiels (mortalité >0 et $<100\%$). Lorsqu'une expérience donne au moins deux concentrations avec des décès partiels, la CL_{50} , les limites de confiance (95 %) et la pente de la courbe doivent être estimées à l'aide de méthodes statistiques appropriées telles que les méthodes classiques du maximum de vraisemblance pour ajuster les modèles probit ou logit (ISO, 2006 ; OCDE, 2006b et Finney, 1978). Lorsqu'une expérience aboutit à une seule concentration avec mortalité partielle ou n'aboutit à aucune concentration avec mortalité partielle, il n'est pas possible d'utiliser les méthodes classiques du maximum de vraisemblance pour estimer la CL_{50} , la pente de la courbe concentration-réponse ne peut pas être estimée, et un intervalle de confiance pour la CL_{50} peut ne pas être estimable. Dans ces cas de figure, la CL_{50} peut être estimée à l'aide de diverses techniques telles que la méthode Spearman-Kärber (Stephan, 1977), la méthode binomiale (USEPA, 2002), la méthode de la moyenne mobile (ISO, 1996) ou, en dernier recours, la méthode graphique (USEPA, 2002). Ces méthodes non classiques peuvent donner des estimations précises de la CL_{50} et sont utiles pour évaluer les études de toxicité aiguë chez les poissons donnant des résultats qui ne peuvent pas être analysés à l'aide des techniques classiques du maximum de vraisemblance.

Rapport d'essai

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

Produit chimique testé :

- Substance mono-constituante :
 - apparence physique, hydrosolubilité, et autres propriétés physico-chimiques pertinentes ;
 - identification chimique : désignation(s) UICPA ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;
- Substance multi-constituants, UVCB et mélanges :
 - caractérisation, dans la mesure du possible, par leurs propres identifiants chimiques (voir ci-dessus) et/ou ceux de leurs constituants, leurs propriétés physico-chimiques correspondantes et/ou celles des constituants et l'occurrence quantitative des constituants.

Poissons expérimentaux :

- nom scientifique, souche (s'il y a lieu), taille (poids frais et longueur totale), fournisseur, prétraitement éventuel, etc.

Conditions expérimentales :

- procédure utilisée pour l'essai (statique, semi-statique ou dynamique, par exemple ; fréquence de renouvellement ; aération ; charge de poissons ; etc.) ;
- caractéristiques de qualité de l'eau (pH, dureté, COT et/ou DCO pour les eaux de surface, souterraines ou reconstituées) et adaptations faites pour répondre aux exigences des espèces de poissons utilisées autres que celles de l'annexe 2 ;
- concentration d'oxygène dissous, valeurs de pH, température des solutions d'essai à 24 heures d'intervalles dans chaque cuve et température continue dans une cuve (dans les systèmes de renouvellement semi-statique : oxygène dissous, pH, salinité – s'il y a lieu – et température avant et après le renouvellement de l'eau) ;
- méthodes de préparation des solutions-mères et des solutions d'essai ;
- L'aspect de la solution de test et autres méthodes utilisées pour déterminer la concentration dissoute (par exemple., la centrifugation et la filtration).
- concentrations utilisées ;
- concentrations mesurées du produit chimique testé dans les solutions d'essai ;
- nombre de poissons dans chaque récipient d'essai.

Résultats :

- la mortalité cumulée pour chaque concentration aux moments d'observation recommandés ;
- la mortalité dans le(s) groupe(s) témoin(s) ;
- les valeurs de la CL₅₀ sur 24, 48, 72 et 96 heures avec des limites de confiance de 95 %, si possible ;
- la pente de la courbe concentration-réponse après 96 heures d'exposition, si possible ;
- un graphique représentant la courbe concentration-mortalité à la fin de l'essai, si possible⁵ ;

⁵ De préférence sur une échelle de probits ou de probabilités par rapport à la concentration sur l'échelle logarithmique (il est à noter que le groupe témoin ne peut pas être représenté sur les axes de l'échelle logarithmique). De même, les pourcentages de mortalité de 0 % et de 100 % ne peuvent pas être représentés sur une échelle probit (valeurs non définies), et la pente ne peut pas être représentée de façon significative pour les expériences avec mortalité partielle de moins de deux décès ou si la réponse de 50 % se situe entre la concentration témoin et la plus faible concentration expérimentale. Par conséquent, les graphiques ne sont pas obligatoires dans de telles circonstances, mais ils peuvent aider à visualiser les résultats.

- l'incidence et la description des anomalies visibles observées pendant l'exposition comme indiqué dans le paragraphe 26 ; les signes cliniques supplémentaires sont listés dans l'annexe 4 , dans les tableaux 1 et 2 peuvent être enregistrés de façon optionnelle ;
- les incidents survenus au cours de l'essai et qui ont pu influencer sur les résultats ;
- la description des méthodes statistiques utilisées et du traitement des données (analyse probit, modèle de régression logistique, moyenne arithmétique ou géométrique des valeurs de la CL_{50} , moyenne pondérée dans le temps, par exemple) ;
- les écarts éventuels par rapport à la présente Ligne directrice, les conséquences et les explications correspondantes.

RÉFÉRENCES

- European Commission (2010) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union L 276, 20.10. pp 33-79.
- Finney, DJ (1978) Statistical Methods in Biological Assays. Griffin, Weycombe, U.K.
- ISO (1996) International Standards. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Available: [<http://www.iso.org>]
- ISO (2006) International Standard. Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Available: [<http://www.iso.org>].
- OECD (1992) Ready Biodegradability, Test Guideline No. 301, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals used in Safety Evaluation Series on Testing and Assessment No.19, OECD, Paris.
- OECD (2006a) Ready Biodegradability, CO₂ in sealed vessels, Test Guideline No. 310, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- OECD (2006b) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application: Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris.
- OECD (2010) Short Guidance on the Threshold Approach for Acute Fish Toxicity. Series on Testing and Assessment No. 126, OECD, Paris.
- OECD (2012) Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.
- OECD (2013) Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, Test Guideline No. 236, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- OECD (2014) Guidance Document for Single Laboratory Validation of Quantitative Analytical Methods – Guidance used in Support of Pre-and-Post-Registration Data Requirements for Plant Protection and Biocidal Products, Series on Testing and Assessment No. 204, OECD Publishing, Paris.
- OECD (2019) Guidance Document on Aqueous-Phase Aquatic Toxicity Testing of Difficult Test Chemicals. Series on Testing and Assessment No. 23 (Second Edition), OECD, Paris
- OECD (forthcoming) Guidance Document on Aquatic and Sediment Toxicological Testing of Nanomaterials (currently under development).
- Rufli H, Springer TA (2011) Can we reduce the number of fish in the OECD acute fish toxicity test? Environ Toxicol Chem 30: 1006-1011.
- Stephan, CE (1977) Methods for calculating an LC₅₀. In Aquatic toxicology and hazard evaluation ASTM STP 634, ed. F.L Mayer and J. L Hamelink. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.

USEPA (2002) Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Fourth edition. US Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. EPA-821-R-02-013. October 2002.

ANNEXE 1

DÉFINITIONS

Essai dynamique : essai caractérisé par l'écoulement continu des solutions d'essai dans le système d'essai pendant la durée de l'exposition.

Code InChI : identifiant chimique international de l'UICPA

UICPA : Union internationale de chimie pure et appliquée (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

Concentration létale médiane (CL₅₀) : concentration d'un produit chimique testé dont on estime qu'elle provoquera la mort de 50 % des organismes d'essai au cours de l'essai.

Essai semi-statique (essai avec renouvellement) : essai avec renouvellement régulier des solutions d'essai à l'issue de périodes définies (toutes les 24 h, par exemple).

SMILES : Spécification d'écriture moléculaire linéaire simplifiée (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*).

Essai statique : essai dans lequel les solutions d'essai ne sont pas renouvelées pendant toute la durée de l'essai.

Concentration « seuil » : La plus faible valeur CL₅₀ des données existantes et fiables sur la toxicité pour les algues ou la toxicité aiguë pour les invertébrés (daphnies, par exemple) est fixée comme seuil de concentration (OCDE 2010).

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

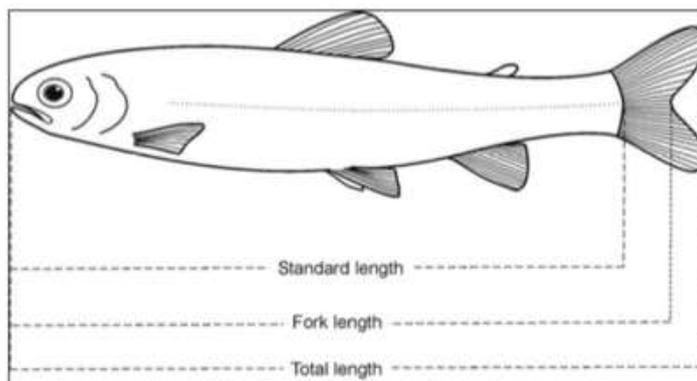


Figure 1: Description of the different lengths, used

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

ANNEXE 2

TABLEAU 1 : ESPÈCES DE POISSONS RECOMMANDÉES, LONGUEURS TOTALES ET CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Espèce ⁶	Température ⁷ (°C)	Salinité ⁸ (‰)	pH	Dureté (mg/L CaCO ₃)	Photopériode (heures de lumière)	Gamme de longueur recommandée ⁹ (cm)
<i>Danio rerio</i> <i>Poisson-zèbre</i>	21-25	<0.2	6.0-8.5	40-250, preferablement <180	12-16	1-2
<i>Pimephales promelas</i> <i>Tête-de-boule</i>	21-25	<0.2	6.0-8.5	40-250, preferablement <180	12-16	1-3
<i>Cyprinus carpio</i> <i>Carpe</i>	20-24	<0.2	6.0-8.5	40-250, preferablement <180	12-16	2-4
<i>Oryzias latipes</i> <i>Médaka japonais</i>	23-27	<0.2	6.0-8.5	40-250, preferablement <180	12-16	1-2
<i>Poecilia reticulata</i> <i>Guppy</i>	21-25	<0.2	6.0-8.5	40-250, preferablement <180	12-16	1-2

⁶ Si d'autres espèces sont utilisées, il convient de justifier le choix de l'espèce et de signaler toute adaptation des recommandations de la Ligne directrice. Il est suggéré que l'espèce soit choisie en fonction de sa disponibilité immédiate, de sa facilité d'entretien et de son utilisation historique dans les essais d'innocuité.

⁷ Lorsque la température de culture diffère de la plage recommandée, la période d'acclimatation doit être utilisée pour acclimater le poisson à la température d'essai désirée.

⁸ Pour tout test conduit, le test devra être effectué à un taux de $\pm 2\%$, par exemple $17 \pm 2 = 15-19\%$, $31 \pm 2 = 29-33\%$.

⁹ Les poissons expérimentaux doivent être juvéniles lorsqu'ils sont utilisés dans cet essai (âge précédant l'atteinte de la maturité sexuelle). Si l'on utilise des poissons de tailles autres que celles recommandées, il faut le signaler, en précisant le stade de développement (juvénile, subadulte, adulte) et en indiquant la raison de ce choix.

<u>Lepomis macrochirus</u> Crapet arlequin	21-25	<0.2	6.0-8.5	40-250, preferablement <180	12-16	1-3
<u>Oncorhynchus mykiss</u> Truite arc-en-ciel	10-14 ¹⁰	<0.2	6.0-8.5	40-250, preferablement <180	12-16	3-6
<u>Gasterosteus aculeatus</u> Épinoche à trois épines	13-19	0-35	6.0-8.5	40-7500	12-16	1-2
<u>Cyprinodon variegatus</u> Fondule tête de mouton	23-27	15-35	6.0-8.5	3000-7500	12-16	1-2
<u>Dicentrarchus labrax</u> Bar commun européen	18-22	15-35	6.0-8.5	3000-7500	12-16	4-8
<u>Pagrus major</u> Dorade de la Mer Rouge	18-22	30-35	6.0-8.5	5000-7500	12-16	2-4

¹⁰ Un changement significatif par rapport à la version précédente de la Ligne directrice n° 203. Avec une plage de 10-14 °C, qui est similaire à celle donnée dans OPPTS 850.1075, la plage de 13-14 °C chevauche celle de 13-17 °C indiquée dans la Ligne directrice n° 203 d'origine.

ANNEXE 3

CERTAINES CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION OU D'ESSAI ACCEPTABLE EN CE QUI CONCERNE LES POISSONS D'EAU DOUCE, ESTUARIENS ET MARINS

Paramètre	Concentration maximale
Matières particulaires	5 mg/L
Carbone organique total (COT) ¹¹	2 mg/L
Ammoniac non ionisé (NH ₃)	1 µg/L
Nitrate (NO ₃)	<9 mg/L ¹²
Chlore résiduel	10 µg/L
Pesticides organophosphorés totaux	50 ng/L
Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés	50 ng/L
Chlore organique total	25 ng/L
Aluminium (Al)	1 µg/L
Arsenic (As)	1 µg/L
Chrome (Cr)	1 µg/L
Cobalt (Co)	1 µg/L
Cuivre (Cu) ¹³	1 µg/L
Fer (Fe)	1 µg/L
Plomb (Pb)	1 µg/L
Nickel (Ni)	1 µg/L
Zinc (Zn)	1 µg/L
Cadmium (Cd)	100 ng/L
Mercure (Hg)	100 ng/L
Argent (Ag)	100 ng/L
Demande chimique en oxygène (DCO) ¹⁴	5 mg/L

¹¹ Des niveaux élevés de carbone organique total (COT) indiquent des quantités élevées de carbone organique dissous (COD), qui se lient potentiellement au produit chimique testé (produits chimiques organiques et composés métalliques qui démontrent une sorption) et réduisent donc la quantité biodisponible ainsi que la toxicité du produit chimique testé. Le COD est défini sur le plan opérationnel comme étant des molécules organiques qui passent à travers un filtre, le plus souvent de 0.45 µm.

¹² « Une concentration maximale de 2 mg de NO₃-N/L serait appropriée pour protéger les espèces d'eau douce les plus sensibles » ; soit 8.85 mg de NO₃/L (Camargo JA, Alonso A, Salamanca A. 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58(9):1255-67).

¹³ Il convient de noter que les tuyaux en cuivre ou les compositions contenant du cuivre (alliages) peuvent causer la mort des poissons (CL₅₀ du tête-de-boule : 0.073 mg/L).

¹⁴ La DCO ou le COT doit être mesuré.

DESCRIPTION DES SIGNES CLINIQUES SUBLÉTAUX CHEZ LE POISSON

Introduction : La législation européenne¹⁵ (Commission européenne, 2010) et les lignes directrices canadiennes¹⁶ (CCPA, 2005) encouragent l'application de points limites précoces adaptés dans les essais sur les vertébrés. Par conséquent, il est devenu pratique courante dans les laboratoires d'établir des points limites sublétaux dans les essais de toxicité aiguë chez le poisson afin de réduire la souffrance terminale des poissons¹⁷. Toutefois, outre le fait que l'identification des signes cliniques prédictifs de l'état moribond et de la mort est cruciale pour leur utilisation efficace comme points limites expérimentaux (Toth, 2000), il n'existe pas de consensus international sur les signes cliniques sublétaux qui définissent l'état moribond ou sont prédictifs de la mort chez le poisson. Afin de générer des données scientifiques fiables permettant de parvenir à un consensus sur ce point à l'avenir, on encourage la collecte améliorée et systématique d'observations sur les signes qui conduisent à l'état moribond et à la mort au fil du temps et de préférence chez le même poisson individuel. Le tableau 1 est un outil dédié à cet objectif ; il s'agit d'une liste complète de tous les signes cliniques potentiellement pertinents pour la toxicité d'origine chimique, tandis que le tableau 2 fournit un moyen d'enregistrer ces signes lors des observations quotidiennes. Lorsqu'il existe une expertise et que la procédure a un impact minime sur le bien-être animal, il est recommandé de marquer individuellement les poissons avant l'essai. Cela permet ensuite d'établir un lien entre le signe sublétal et le résultat (survie ou mort) au niveau de chaque poisson. Les techniques d'identification appropriées en ce qui concerne les poissons de petite taille comprennent l'injection de pigments, l'utilisation d'élastomères d'implants visibles et le marquage morphométrique. On peut aussi filmer le poisson et étudier rétrospectivement la progression des symptômes sublétaux vers l'état moribond et la létalité.

Les signes sublétaux définis dans le tableau 1 ont été observés dans des études de toxicité chez le poisson (Rufli, 2012 ; Morton, 1997 ; Drummond *et al*, 1986 ; Hawkins *et al*, 2011a et Hawkins *et al*, 2011b) ou décrits ailleurs¹⁸. Les signes cliniques ont été décrits dans la littérature (Hawkins *et al*, 2011b et EPA, 1977), bien qu'il existe, pour certaines de ces observations, un spectre d'ordres de grandeur qui pourrait être spécifique aux espèces, aux populations ou même aux longueurs.

Il est prévu qu'une prochaine version de cette Ligne directrice comprenne des orientations détaillées sur la façon dont on peut utiliser les signes cliniques sublétaux

¹⁵ En vertu de l'article 13 de la directive 2010/63/UE (Commission européenne, 2010) : « Dans la mesure du possible, la mort doit être évitée en tant que point limite dans une procédure et remplacée par des points limites précoces adaptés » et « le choix entre les procédures est guidé par le souci de sélectionner celles qui (...) sont les plus susceptibles de fournir des résultats satisfaisants ».

¹⁶ En vertu des lignes directrices du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA, 2005) : « lorsque cela est faisable, on encourage l'établissement de points limites pré-létaux ».

¹⁷ Dans le contexte de la présente Ligne directrice, cela signifie que l'application de points limites sublétaux doit permettre d'assurer le respect des exigences relatives à la détermination d'une CL₅₀ (de veiller au respect des prescriptions des autorités réglementaires, par exemple).

¹⁸ Exemples de signes cliniques chez les salmonidés :

<http://www.necropsymanual.net/en/additional-info/fpa/>

chez les poissons-zèbres :

<https://wiki.zfin.org/display/ZHWG/Zebrafish+Health+and+Welfare+Glossary+Home>.

pour déterminer quels poissons individuels doivent être euthanasiés avant la fin de l'essai. Ces orientations seront analogues à celles décrites dans le document d'orientation n° 19 sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques comme effets observés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité sur des mammifères (Rufli, 2012).

Lorsqu'ils signalent des signes cliniques sublétaux, les laboratoires sont encouragés à se familiariser avec la liste plus complète des signes sublétaux énumérés dans le tableau 1 et à noter dans le rapport d'essai les signes observés (voir l'exemple de feuille de notation du tableau 2) pendant les essais au niveau de chaque cuve ou pour chaque poisson si possible. L'enregistrement amélioré et systématique des signes sublétaux ainsi que toute information supplémentaire existant sur le produit chimique (c'est-à-dire sur son mode d'action) permettent de grandement faciliter et d'accélérer la réalisation de cet exercice.

À l'avenir, une approche fondée sur la force probante de la preuve pourrait faciliter la distinction entre les signes cliniques liés aux produits chimiques et les anomalies visibles dues à d'autres raisons [prise en compte du moment de l'apparition, de la progression dans le temps (persistance, croissance, décroissance), du nombre de poissons concernés, des récipients concernés (concentrations, témoin, récipients de stockage), d'une autre cause potentielle (mauvaise manipulation, agression, maladie, effet toxique, mauvaises conditions environnementales, etc.)]. Des exemples clairs de signes cliniques liés aux produits chimiques comprennent les effets sur l'opercule dus à l'exposition à des produits chimiques cationiques et les hémorragies internes dues à l'exposition aux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Muir *et al*, 1997, McKim *et al*, 1987a).

Les laboratoires doivent également inclure les informations supplémentaires disponibles, telles que les propriétés physico-chimiques (K_{oc} , par exemple), le mode d'action, la dégradation potentielle (si les essais sont effectués dans un système statique) ou toute autre information utile sur les propriétés spécifiques du produit chimique testé. Le mode d'action toxicologique peut être non spécifique (narcose) ou spécifique. Les catégories chimiques largement utilisées pour décrire le mode d'action comprennent les narcotiques polaires, les narcotiques apolaires, les découpleurs de la phosphorylation oxydative, les électrophiles/pro-électrophiles, les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, les irritants, les agents provoquant des crises d'épilepsie, les bloquants respiratoires (Russom *et al*, 1997 ; McKim *et al*, 1987b).

TABLEAU 1 : Signes cliniques observés chez le poisson, compilés à partir de publications (CCPA, 2015 ; Ruffi, 2012 ; Drummond *et al*, 1986 et Midtlyng *et al*, 2011) et des feuilles de notation de la Ligne directrice 203 fournies par les laboratoires individuels. Les lignes sur fond blanc correspondent aux principales catégories d'anomalies visibles pour lesquelles l'enregistrement est obligatoire dans la Ligne directrice 203 depuis 1992. Les lignes sur fond gris correspondent aux sous-catégories explicatives facultatives.

Signe clinique	Définition	Synonymes
PERTE D'ÉQUILIBRE (sous-catégories ci-dessous)		
Orientation horizontale anormale	Perte d'équilibre se manifestant par une orientation/posture horizontale anormale dans la colonne d'eau	Poisson chancelant, perte du réflexe de redressement
Orientation verticale anormale	Tête en haut ou en bas	
Perte de contrôle de la flottabilité	Poisson flottant ou coulant	
COMPORTEMENT NATATOIRE ANORMAL (sous-catégories ci-dessous)		
Hypoactivité	Baisse de l'activité spontanée	Lenteur, apathie, léthargie, faiblesse, immobilité, inactivité, cessation de la nage, calme
Hyperactivité	Augmentation de l'activité spontanée	Mouvements irréguliers, soubresauts
Nage en tire-bouchon	Rotation autour d'un axe longitudinal ; mouvements irréguliers, souvent sporadiques	Mouvements en forme de spirales, nage en spirales, mouvements en forme de cercles
Convulsions	Contractions musculaires incontrôlées et involontaires anormales	Crises d'épilepsie, tressaillements, spasmes musculaires, tremblements, frémissements, vibrations
Tétanie	Rigidité (intermittente ou permanente) de la musculature corporelle	Paralyse
Comportements dus à une irritation cutanée		Frottement, éraflures, écorchures
Répartition/comportement anormal(e) à la surface	Sélection de profondeur inadaptée, poisson proche de l'interface eau/air	Sauts, remontée en surface ; poisson à la surface/proche de la surface/juste en-dessous de la surface
Répartition/comportement anormal(e) au fond	Sélection de profondeur inadaptée, poisson proche du fond de la cuve	Plongée, sondage ; poisson immobile au fond/orienté vers le fond/collecté au fond/proche du fond/situé juste au-dessus du fond
Surréaction à un stimulus	Réaction (brusque) de fuite ou d'évitement à un stimulus visuel (passage de la main au-dessus de la cuve, faisceau lumineux), tactile (toucher) ou vibratoire (léger coup sur la cuve)	Hyperexcitabilité ; hyperactivité en cas de stimulation/de menace
Sous-réaction à un stimulus		Absence de réaction en cas de stimulation extérieure ; inactivité en cas de stimulation/de menace
Diminution de la nage en groupe ou en banc	Diminution du regroupement et des interactions sociales	Isolement, isolement social
Augmentation de la nage en groupe ou en banc	Augmentation du regroupement des poissons en une masse compacte	Suroccupation
FONCTION VENTILATOIRE ANORMALE (sous-catégories ci-dessous)		
Hyperventilation	Augmentation de la fréquence des mouvements ventilatoires des opercules, avec éventuellement bouche ouverte et opercules étendus	Fréquence respiratoire/respiration rapide. Mouvements intenses des branchies, ventilation élevée, branchies fortement étendues, activité anormale des opercules, opercules écartées, bouche ouverte
Hypoventilation	Diminution de la fréquence des mouvements ventilatoires (éventuellement superficiels) des opercules	Respiration/ventilation réduite/difficile/faible/lente
Ventilation irrégulière	Mouvements ventilatoires irréguliers des opercules	Mouvement des branchies/respiration sporadique/spasmodique
Toux	Expansion rapide de la bouche et des opercules par réflexe ailleurs qu'à la surface de l'eau – un phénomène supposé dégager les voies ventilatoires	Respiration agonisante, activité anormale des opercules, bâillements
Hoquet	Mouvements de la bouche (et des opercules) à la surface de l'eau entraînant une prise d'eau et d'air	Pipage
Mouvements de la tête	Rapides mouvements latéraux de la tête	
PIGMENTATION CUTANÉE ANORMALE (sous-catégories ci-dessous)		
Plus foncée		Couleur/pigmentation modifiée/accrue/plus foncée/mélanisme
Plus claire		Pâleur, pigmentation claire/pâle/modifiée
Tachetée		Taches décolorées
AUTRES ANOMALIES VISIBLES (EN MATIÈRE D'APPARENCE ET DE COMPORTEMENT) (sous-catégories ci-dessous)		
Exophtalmie	Gonflement à l'intérieur des orbites faisant ressortir les yeux	Syndrome des yeux exorbités
Œdème	Gonflement abdominal dû à l'accumulation de liquide, pouvant entraîner des écailles proéminentes et/ou une fissure de la paroi abdominale	Région abdominale/intestinale distendue/enflée/gonflée ; hydropisie
Hémorragie	Pétéchies (taches de la taille d'une tête d'épingle) et/ou hématome (amas de sang) dus à un saignement intradermique ou sous-muqueux	
Sécrétion de mucus	Production excessive de mucus	Accumulation de mucus (observer les yeux de près) ; sécrétion accrue de mucus (sur la peau ou dans l'eau) ; perte de mucus
Fèces	Fil d'excréments qui ne se détache pas de l'anus ou qui se dépose au fond de la cuve	
Agression et/ou cannibalisme		Agression, attaque directe, domination d'endroits choisis de la cuve, cadavres de poissons picorés ou mangés

TABLEAU 2 : Exemple de format de feuille d'enregistrement des signes cliniques. Chaque colonne représente un ensemble d'observations. Si aucune anomalie n'est observée, il suffit de noter « PAO » pour « pas d'anomalie observée ». Sinon, on note le nombre de poissons vivants observés présentant une anomalie. Les lignes sur fond gris représentent des sous-catégories explicatives facultatives pour l'enregistrement des anomalies visibles observées.

Informations sur l'étude et les cuves	Jour 0, 2-3 heures	Jour 0, 5-6 heures	Jour 1, matin	Jour 1, après-midi	Jour 2, matin	Jour 2, après-midi	Jour 3, matin	Jour 3, après-midi	Jour 4, matin
Jour de l'essai/observation	2.5 h	5.5 h	24 h	30 h	48 h	54 h	72 h	78 h	96 h
Délai d'observation approximatif en partant du début de l'essai									
Date/heure									
Nbre de poissons vivants présents dans la cuve à enregistrer									
Nbre de poissons moribonds* retirés de la cuve après leur enregistrement									
Nbre de poissons morts retirés de la cuve									
Si aucune anomalie n'est observée, il suffit de noter « PAO »									
PERTE D'EQUILIBRE									
Orientation horizontale anormale									
Orientation verticale anormale									
Perte de contrôle de la flottabilité									
COMPORTEMENT NATATOIRE ANORMAL									
Hypoactivité									
Hyperactivité									
Nage en tire-bouchon									
Convulsions									
Tétanie									
Comportements dus à une irritation cutanée									
Répartition/comportement anormal(e) à la surface									
Répartition/comportement anormal(e) au fond									
Surréaction à un stimulus									
Sous-réaction à un stimulus									
Diminution de la nage en groupe ou en banc									
Augmentation de la nage en groupe ou en banc									
FONCTION VENTILATOIRE ANORMALE									
Hyperventilation									
Hypoventilation									
Ventilation irrégulière									
Toux									
Hoquet									
Mouvements de la tête									
PIGMENTATION CUTANÉE ANORMALE									
Plus foncée									
Plus claire									
Tachetée									
AUTRES ANOMALIES VISIBLES									
Exophtalmie									
Œdème									
Hémorragie									
Sécrétion de mucus									
Fèces									
Agression et/ou cannibalisme									
Autres anomalies, veuillez préciser									

*À l'heure actuelle, il n'existe pas d'accord international sur la définition du terme « moribond ».

Références

- Canadian Council on Animal Care Guidelines (2005) *The Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing*. Ottawa, Canada. 87 pp. <https://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>.
- Drummond RA, Russom CL, Geiger DL, DeFoe DL (1986) Behavioral and Morphological Changes in Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) as Diagnostic Endpoints for Screening Chemicals According to Mode of Action. *Aquatic Toxicology and Environmental Fate: Vol. 9, ASTM STP 921*, T. M. Poston and R. Purdy, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 415-435.
- European Commission (2010) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union L276/33*.
- EPA-600/3-77-33 (1977) Procedures for measuring cough (gill purge) rates of fish.
- Hawkins P, Ryder K, Dennison N, Goodman G, Hetherington S, Llywelyn-Jones S, and AJ Smith (2011a) Guidance on the severity classification of procedures involving fish. Poster at 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in Montreal. <http://norecopa.no/media/6975/fish-procedures.jpg>.
- Hawkins P, Ryder K, Dennison N, Goodman G, Hetherington S, Llywelyn-Jones S, and AJ Smith (2011b) Working Party Report: Guidance on the severity classification of scientific procedures involving fish: report of a Working Group appointed by the Norwegian Consensus-Platform for the Replacement, Reduction and Refinement of animal experiments (Norecopa). *Laboratory Animals* 45, 219–224.
- McKim M, Bradbury SP, Niemi GI (1987a) Fish Acute Toxicity Syndromes and Their Use in the QSAR Approach to Hazard Assessment. *Environmental Health Perspectives* 71, pp. 171-186.
- McKim JM, Schmieder PK, Carlson RW, Hunt EP, Niemi GJ (1987b) Use of respiratory-cardiovascular responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in identifying acute toxicity syndromes in fish: Part 1. pentachlorophenol, 2,4-dinitrophenol, tricaine methane-sulfonate and 1-octanol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 6(4), pp. 295-312.
- Midtlyng PJ, Hendriksen C, Balks E, Bruckner L, Elskem L, Evensen O, Fyrand K, Gut A, Halder M, Hawkins P, Kisen G, Romstad AB, Salenius K, Smith P, Sneddon LU (2011). Three Rs approaches in the production and quality control of fish vaccines. *Biologicals* 39, pp.117-128.
- Morton DB (1997) A Scheme for the Recognition and Assessment of Adverse Effects. In, *Animal Alternatives, Welfare and Ethics*. Eds., van Zutphen, L.F.M., Balls, M. Publ. Elsevier, Amsterdam. pp. 235-241. ISBN 0-444-82424-3.
- Muir MM, Kosteretzoe KG, Lech JJ (1997) Localization, depuration, bioaccumulation and impairment of ion regulation associated with cationic polymer exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica* 27(10), pp. 1005-1014.
- OCDE (2010) Guide abrégé sur l'approche seuil pour la toxicité aiguë des poissons. Série sur les essais et l'évaluation no 126, OCDE, Paris. Ruffli H (2012) Introduction of moribund category to OECD fish acute test and its effect on suffering and LC50-values. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2012.

Russom CL, Bradbury SP, Broderius SJ, Hammermeister DE, Drummond RA (1997) Predicting modes of toxic action from chemical structure: Acute toxicity in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(5), pp. 948-967.

Toth LA (2000) Defining the moribund condition as an experimental endpoint for animal research. *ILAR J* 41:72-79.