



Section 2
Effets sur les systèmes biologiques

Essai n° 253:
Dépistage à court terme de l'activité de
l'hormone juvénile sur *Daphnia magna*

25 juin 2024

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



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

Essai de dépistage à court terme de l'activité de l'hormone juvénile sur *Daphnia magna* (JHASA)

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice (LD) décrit un essai de dépistage à court terme de l'activité de l'hormone juvénile (JH) faisant appel à *Daphnia magna* en vue de détecter les produits chimiques ayant un potentiel d'activité analogue à l'hormone juvénile. L'essai JHASA est un essai de dépistage conçu pour évaluer la production de descendants mâles chez les daphnies d'origine parthénogénétique, comme décrit à l'Annexe 7 de la LD 211 de l'OCDE (*Daphnia magna*, essai de reproduction). La méthode JHASA est placée au niveau 3 du cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais concernant les perturbateurs endocriniens dans le document-guide 150 (1) pour générer des informations mécanistiques et n'est pas destinée à déterminer des valeurs de toxicité (c'est-à-dire la concentration sans effet observé [CSEO] ou la concentration avec effet de x % [CE_x]) pour l'évaluation des risques, à moins d'avoir une courbe concentration-réponse basée sur plus de trois niveaux de traitement.

2. Le concept de la méthode JHASA s'appuie sur les études de la production de descendants mâles chez les daphnies d'origine parthénogénétique, qui est régulée par la voie de signalisation de l'hormone juvénile (2, 3). La production de descendants mâles est généralement connue pour survenir sous l'effet de stimuli environnementaux tels que le raccourcissement de la photopériode, la diminution de la température, la réduction de la quantité de nourriture ainsi que l'augmentation de la densité de population (4-6). Cependant, la production de descendants mâles est également induite par l'exposition à des hormones juvéniles naturelles de crustacés et d'insectes (farnésoate de méthyle pour les crustacés et JH I, II et III pour les insectes) et à des analogues d'hormones juvéniles comme les régulateurs de croissance d'insectes (p. ex. hydroprène, pyriproxifène, fénoxycarbe) (7-10) et pourraient mener à des effets pertinents au niveau d'une population (11). Pour utiliser cette production de descendants mâles comme moyen supplémentaire de détecter les produits chimiques ayant une activité d'hormone juvénile, une étude de validation interlaboratoire a été menée (12) et l'évaluation de la production de descendants mâles a été ajoutée comme mesure optionnelle de l'effet observé à l'Annexe 7 de la LD 211 (*Daphnia magna*, essai de reproduction) en 2008 (13).

3. L'Annexe 7 de la LD 211 peut fournir suffisamment de données pour l'évaluation des dangers et des risques ; toutefois, c'est un essai qui nécessite des ressources et des coûts supplémentaires afin d'identifier le sexe de toute la descendance produite pendant 21 jours.

L'essai de dépistage à court terme de l'activité de l'hormone juvénile faisant appel à *Daphnia magna* (JHASA) a donc été mis au point pour raccourcir la durée de l'essai de 21 jours selon la méthode de l'Annexe 7 de la LD 211 à 7 jours environ avec la méthode JHASA (14-16). Sachant que la détermination du sexe de la descendance a lieu pendant la période critique du développement des oocystes dans l'ovaire, approximativement 7 à 10 heures avant l'ovulation dans la chambre incubatrice (17), la méthode JHASA commence l'exposition chez des femelles adultes (p.ex. âgées de 10 à 17 jours) et n'observe la descendance qu'à partir de la deuxième portée après l'exposition. La première portée dans la chambre incubatrice au début de l'essai n'est pas incluse dans l'observation car son sexe a déjà été déterminé avant l'exposition.

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. Les femelles adultes (animal parent) ayant des embryons en développement dans leurs chambres incubatrice sont exposées à au moins trois concentrations du produit chimique d'essai et à un témoin de l'eau (et, si nécessaire, à un témoin solvant). La durée de l'essai est de 7 jours environ, jusqu'à ce que les daphnies soumises à l'essai se soient reproduites une deuxième fois après l'exposition. La durée de l'essai peut être étendue jusqu'à ce que toutes les daphnies survivantes produisent la deuxième portée (voir la section « Durée » pour plus d'information). Dix récipients ou réplicats par traitement sont utilisés (chaque récipient contenant 1 femelle adulte). On compte le nombre de descendants mâles et femelles de la deuxième portée. L'identification du sexe des descendants est réalisée par une observation macroscopique de la première antenne, qui est plus longue chez les mâles que chez les femelles. La mortalité des animaux parents est également enregistrée. La proportion de descendants mâles (proportion de mâles) est calculée pour chacun des réplicats de traitement une fois la deuxième portée produite. Le résumé de tous les paramètres et conditions d'essai se trouve en Annexe 2.

5. La méthode JHASA sert à identifier les produits chimiques ayant une activité analogue à celle de l'hormone juvénile, ce qui peut être détecté par la production de descendants mâles dans les concentrations d'essai. Si aucun descendant mâle n'est observé chez le(s) témoin(s), le produit chimique d'essai induisant des descendants mâles peut être considéré comme « actif » sans analyse statistique. Cependant, si quelques mâles sont identifiés dans le(s) témoins ou si seulement quelques mâles sont induits dans les groupes traités, la proportion de mâles devra être analysée afin de déceler les différences statistiquement significatives entre les groupes exposés et le(s) groupe(s) témoin(s) (voir Annexe 6 pour plus de détails). De plus, la possibilité que les mâles soient induits par d'autres facteurs environnementaux (p. ex. l'alimentation, la densité, la photopériode, la température) ne peuvent pas être complètement exclues, il est donc recommandé de vérifier la reproductibilité de l'essai et l'éventualité que d'autres facteurs aient pu influencer les résultats. Ces considérations indiqueront s'il faut procéder à des essais complémentaires (Annexe 7 sur la détermination de la proportion de mâle de la LD 211) pour le produit chimique d'essai en vue de déterminer les valeurs de toxicité (CSEO ou CEX) (voir (1) pour plus d'information).

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI

6. L'hydrosolubilité et la pression de vapeur du produit chimique d'essai doivent être connues. D'autres informations sont utiles, notamment les suivantes : formule structurale, pureté du produit chimique d'essai, stabilité dans l'eau et à la lumière, pKa, Po_e et biodégradabilité (LD 301 ou 310, par exemple) (18, 19). Le document-guide 23 de l'OCDE (20) fournit des indications pour les essais concernant des produits difficiles à tester en raison de leurs propriétés physicochimiques. Pour doser le produit chimique dans les solutions d'essai, il faut disposer d'une méthode d'analyse fiable, dont le rendement de récupération ainsi que la limite de détermination et la limite de quantification sont connus, si la vérification analytique de l'exposition est requise.

7. Même si cela n'est pas obligatoire, il peut être utile de consulter les résultats d'un essai de toxicité aiguë d'immobilisation (LD 202, par exemple) (21) sur la même souche de *D. magna* pour, sur cette base, sélectionner une gamme de concentrations d'essai adaptée aux essais de reproduction. Les résultats d'essais *in vitro* comme l'essai d'activation transcriptionnelle faisant intervenir les récepteurs d'hormones juvéniles peuvent également être utiles (22, 23) pour confirmer les résultats.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

8. Une substance de référence peut être testée de manière régulière afin de s'assurer que les conditions d'essai sont fiables. Un agoniste de l'hormone juvénile (HJ), diofenolan, qui a été utilisé lors d'un essai circulaire internationale (24) est recommandé à cette fin. D'autres agonistes de l'HJ utilisés avec succès dans l'essai JHASA sont HJ III, le méthyle de farnesoate, le fénoxycarbe, le pyriproxifen (14-15-16). Les essais utilisant une substance de référence devront être effectués au besoin, par exemple après l'introduction d'une nouvelle souche d'organismes ou des changements significatifs dans les conditions d'élevage. En règle générale, les tests recommandés au moins deux fois par an.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

9. Pour que l'essai soit valide, les témoins doivent répondre aux critères suivants :
- la mortalité des animaux parents (*Daphnia* femelles) ne doit pas dépasser 20 % à la fin de l'essai.
 - le nombre moyen de descendants vivants par animal parent vivant à la fin de l'essai doit être ≥ 12 ;
 - il n'y a pas plus d'un animal parent qui produit de descendants mâles ;
 - la proportion moyenne de mâles ne doit pas dépasser 5 %.

10. Les trois derniers critères ci-dessus sont établis pour s'assurer la puissance statistique pour détecter le ratio des mâles (24). Dans le cas d'une déviation des critères de validité, les conséquences de la déviation sur la fiabilité des résultats devra être prise en compte et consignés dans le rapport d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Appareillage

11. 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. On utilisera en principe des béchers en verre.
12. En outre, il sera nécessaire d'employer une partie ou la totalité du matériel suivant :
 - oxygénomètre (avec une microélectrode ou un autre dispositif destiné à mesurer l'oxygène dissous dans des échantillons de faible volume) ;
 - appareillage adéquat pour maintenir la température constante ;
 - pH-mètre ;
 - appareil pour mesurer la dureté de l'eau ;
 - dispositif approprié pour régler le régime d'éclairage et mesurer l'intensité lumineuse.

Organisme d'essai

13. L'espèce à utiliser dans cet essai est *D. magna* Straus. Il est possible de recourir à d'autres espèces de daphnies (*Ceriodaphnia dubia* (25), par exemple) à condition que les critères de validité pertinents soient respectés (le critère relatif au produit de la reproduction dans le groupe témoin s'applique à toutes les espèces de daphnies). Si d'autres espèces de daphnies sont utilisées, il y a lieu de les identifier clairement et de justifier ce choix dans le rapport d'essai avec toute adaptation des recommandations énoncées dans la présente Ligne directrice.

14. Le clone de *Daphnia* devrait de préférence avoir été identifié d'après son génotype. Étant donné l'objectif de l'essai, les souches les moins susceptibles de produire des descendants mâles en condition témoin conviennent. Par exemple, la proportion moyenne de mâles de la souche d'essai ne doit pas dépasser 5 % en condition témoin pour remplir les critères de performance. L'essai circulaire a montré que les souches de l'Institut national japonais des études environnementales (NIES) et de l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (US EPA), la souche appelée « Clone A » dans l'essai circulaire précédent pour la LD 211 (provenant de l'IRCHA, en France) (13, 26) ainsi que la souche DHI (DHI Water & Environment, Danemark) sont acceptables ; elles n'ont pas produit de descendants mâles chez les témoins dans l'essai circulaire mené pour la méthode JHASA (24). Cependant, le Clone A produisant parfois des mâles chez les témoins (24), il faut veiller à maintenir un lot sain sans mâles en ajustant la densité optimale et les conditions d'alimentation.

15. Au début de l'essai, il est recommandé d'utiliser des *Daphnia* femelles âgées de 10 à 17 jours. Il est possible de recourir à des daphnies en dehors de cette tranche d'âge, mais il convient d'éviter les jeunes femelles n'ayant pas encore produit leur première portée afin d'obtenir un nombre suffisant de descendants dans l'essai. Si l'on utilise des daphnies de plus de trois semaines, une confirmation préalable est recommandée pour s'assurer que la

mortalité parentale chez le(s) témoin(s) ne dépasse pas 20 % dans l'essai. Les animaux sont issus d'un lot sain (c'est-à-dire qui ne présente pas de signes de stress, tels qu'une mortalité élevée, la présence de mâles et d'éphippies, un retard dans la production des premiers descendants, des animaux décolorés, etc.) et ne doivent pas provenir d'une première génération de descendants. Le lot d'animaux est maintenu dans des conditions de culture (lumière, température, milieu, alimentation et nombre d'animaux par unité de volume) semblables à celles qui seront appliquées au cours de l'essai. Si le milieu utilisé dans l'essai est différent du milieu de culture habituel, il convient de laisser aux daphnies une période d'acclimatation, avant l'essai, qui dure normalement trois semaines environ (c'est-à-dire une génération), afin d'éviter de stresser les animaux parents.

Milieu d'essai

16. Il est recommandé d'utiliser pour cet essai un milieu entièrement défini. On peut ainsi éviter d'employer des additifs (p. ex. des algues, des extraits de sol), qui sont difficiles à caractériser, et améliorer les possibilités de normalisation entre les laboratoires. Les milieux Elendt M4 (27) et M7 (voir annexe 3) se sont révélés pertinents à cette fin. D'autres milieux sont cependant acceptables (p. ex. 28, 29), à condition que les *Daphnia* élevées dans ces milieux satisfassent aux critères de validité établis pour l'essai.

17. Si le milieu utilisé contient des additifs non définis, ceux-ci seront spécifiés clairement et le rapport d'essai devra comporter des informations sur la composition, notamment la teneur en carbone, étant donné qu'elle peut contribuer au régime alimentaire fourni. On préconise de déterminer le carbone organique total (COT) et/ou la demande chimique en oxygène (DCO) de la solution mère de l'additif organique et d'estimer leur incidence sur le COT et la DCO du milieu d'essai. En outre, il est conseillé de maintenir les niveaux de COT dans le milieu (c'est-à-dire avant l'ajout des algues) inférieurs à 2 mg/L (30).

18. Lorsque l'on met à l'essai des produits chimiques contenant des métaux, il est important de reconnaître que les propriétés du milieu d'essai (p. ex. la dureté, le pouvoir de chélation) peuvent avoir une influence sur leur disponibilité et leur toxicité. C'est pourquoi il est souhaitable d'opérer dans un milieu entièrement défini. Néanmoins, dans l'état actuel des connaissances, les seuls milieux entièrement définis qui conviennent aux cultures à long terme de *D. magna* sont Elendt M4 et M7. Ces deux milieux contiennent l'agent chélatant EDTA. Des travaux ont montré (26) que la « toxicité apparente » du cadmium est généralement moindre lorsque l'essai de reproduction est effectué dans les milieux M4 et M7 que dans des milieux ne contenant pas d'EDTA. M4 et M7 ne sont donc pas recommandés pour mettre à l'essai des produits chimiques contenant des métaux, de même que d'autres milieux contenant des agents chélatants connus. De ce fait, quand un produit chimique contient des métaux, il est souhaitable d'utiliser un autre milieu, par exemple de l'eau douce calcaire reconstituée d'ASTM (30), qui ne contient pas d'EDTA. La combinaison de l'eau douce calcaire reconstituée d'ASTM et de l'extrait d'algues (31) convient également aux cultures à long terme de *D. magna* (26).

19. La concentration de l'oxygène dissous doit être supérieure à 3 mg/L au début de l'essai et durant celui-ci. Le pH doit être compris entre 6 et 9 et ne doit normalement pas varier de

plus de 1.5 unité au cours d'un même essai. Une dureté supérieure à 140 mg/L (en CaCO₃) est recommandée. La capacité reproductrice des animaux dans les essais pratiqués à un niveau au moins égal à ce seuil s'est révélée conforme aux critères de validité (32, 33).

Solutions d'essai

20. Les solutions d'essai aux concentrations retenues sont généralement préparées par dilution d'une solution mère. Idéalement, les solutions mères sont préparées en mélangeant ou en agitant le produit chimique dans le milieu d'essai par des moyens mécaniques (agitation et/ou ultrasons, par exemple). Si le produit chimique d'essai n'est pas stable dans les conditions expérimentales et/ou s'il est difficile à dissoudre dans l'eau, il convient de suivre les procédures décrites dans le document-guide 23 (20). Le recours à des solvants ou à des dispersants doit être évité ; leur usage peut néanmoins se révéler nécessaire dans certains cas pour produire une solution mère convenablement concentrée. Si l'emploi d'un solvant ne peut être évité, il convient de consulter le document-guide 23 (20). Seuls des solvants à faible toxicité (acétone, éthanol, méthanol, alcool tertiobutylique, acétonitrile, diméthylformamide, diméthylsulfoxyde et triéthylèneglycol) (20) doivent être utilisés, alors que les solvants dont la toxicité est inconnue ne doivent pas être employés. 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 devra être identique dans tous les récipients d'essai, à l'exception du témoin de l'eau de dilution (20). Lorsqu'un solvant est utilisé, un témoin solvant supplémentaire est nécessaire en plus du témoin de l'eau de dilution.

21. L'essai doit généralement être mené sans ajustement du pH. Si le pH ne reste pas dans la plage comprise entre 6 et 9, 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. Le pH doit être ajusté, de préférence avec une solution de HCl et de NaOH, de telle façon que la concentration de la solution mère ne change pas de manière significative et qu'il n'y ait pas de réaction chimique, par exemple précipitation du produit chimique d'essai.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition

Durée

22. L'exposition peut s'arrêter dès que la deuxième portée est produite dans chaque récipient. Le cycle de reproduction de *D. magna* durant généralement 2 ou 3 jours, la deuxième portée est habituellement produite dans les 7 jours. Si un retard survient dans la reproduction des groupes exposés, la durée de l'essai peut être prolongée jusqu'à ce que toutes les daphnies survivantes produisent leur deuxième portée. Compte tenu des propriétés de l'essai de dépistage et également de la possibilité que la reproduction soit inhibée aux

concentrations les plus élevées, il est recommandé de mettre fin à l'essai dans les 10 jours, quel que soit le nombre de concentrations d'essai et/ou de réplicats produisant une deuxième portée. La troisième portée, si elle est produite, n'est pas incluse dans l'évaluation des données.

Charge

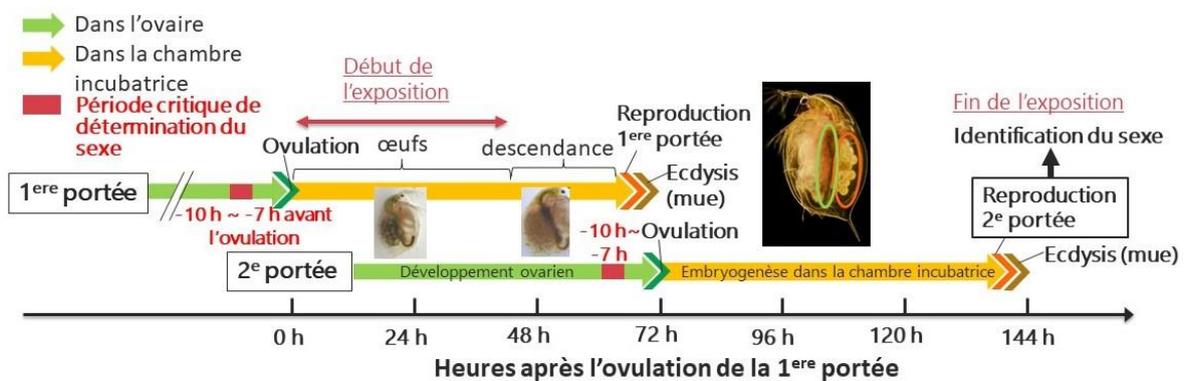
23. Les animaux parents sont répartis individuellement dans des récipients d'essai, contenant en général 50 à 100 mL de milieu chacun pour *Daphnia magna*, à moins qu'un essai dynamique ne soit requis. Le régime dynamique peut être requis dans le cas d'un produit chimique testé qui se dégrade très rapidement (voir aussi la section « Renouvellement du milieu d'essai »).

24. Il est parfois nécessaire d'avoir recours à des volumes plus grands, afin de pouvoir appliquer la méthode d'analyse utilisée pour déterminer la concentration du produit chimique d'essai, bien qu'il soit aussi possible de regrouper les réplicats aux fins de l'analyse chimique. Si des volumes supérieurs à 100 mL sont employés, il faudra peut-être augmenter la ration distribuée aux *Daphnia*, afin que la nourriture disponible soit suffisante et que les critères de validité soient satisfaits (voir la section Alimentation).

Préparation des animaux d'essai

25. Au moins 10 animaux sont individuellement maintenus pour chaque concentration d'essai et pour les témoins.

26. Il convient d'utiliser des femelles adultes ayant des œufs dans la chambre incubatrice. La période au cours de laquelle le sexe est déterminé correspond au stade de développement avancé des oocytes dans l'ovaire, soit 7 à 10 heures après que les œufs de la portée précédente ont été déposés dans la chambre incubatrice (15, 17). Lorsque les néonates de la première portée ont éclos dans la chambre incubatrice, il est possible que le sexe des néonates de la deuxième portée dans l'ovaire soit déjà déterminé (graphique 1). Les daphnies ayant des néonates éclos dans la chambre incubatrice (> 48 h après l'ovulation) ne doivent donc pas être utilisées, car la période sensible pour la détermination du sexe des descendants de la deuxième portée pourrait être manquée.



Graphique 1. Cycle de reproduction et période critique pour la détermination du sexe

des descendants des première et deuxième portées lors de l'essai avec la méthode JHASA.

27. Les traitements sont répartis de façon aléatoire entre les récipients d'essai, et toutes les manipulations ultérieures de ceux-ci se font de même. Faute de quoi, les résultats pourraient présenter un biais qui risquerait d'être interprété comme un effet de la concentration. Notamment, si les unités expérimentales sont manipulées par ordre de traitement ou de concentration, certains effets liés au temps, comme la fatigue du manipulateur ou d'autres erreurs, pourraient avoir un impact plus prononcé aux concentrations supérieures.

Concentrations d'essai

28. Le présent essai a pour objet d'établir si un produit chimique d'essai a une activité potentielle d'hormone juvénile ; il est donc recommandé d'utiliser une concentration aussi élevée que possible dans la mesure où les animaux parents ne meurent pas et se reproduisent. Par exemple, une demi-concentration de CE50 de l'essai d'immobilisation immédiate peut être utilisée comme concentration la plus élevée. Sinon, la concentration d'essai maximale sera établie en fonction de la plus faible des trois valeurs suivantes : limite de solubilité du produit chimique dans le milieu d'essai, concentration maximale tolérée (CMT) (concentration d'essai la plus élevée du produit chimique entraînant une mortalité $\leq 20\%$) ou concentration maximale de 100 mg/L.

29. Normalement, on utilise au moins trois concentrations d'essai, qui doivent former une suite géométrique avec un facteur d'espacement ne dépassant pas 3.2. L'utilisation de moins de trois concentrations doit être justifiée. On prendra soin de ne pas avoir une série de concentrations d'essai où aucun descendant n'est observée à cause de la mortalité parentale. Des considérations autres pour assurer $\leq 20\%$ de mortalité dans les concentrations les plus faibles peuvent être exigées par certaines autorités réglementaires.

30. Compte tenu de la différence de sensibilité de chaque souche en fonction des conditions de chaque laboratoire (24, 34), il est recommandé au laboratoire de mener un essai pour déterminer la plage des concentrations ou un essai d'immobilisation immédiate au préalable afin d'établir la concentration la plus élevée à laquelle les daphnies parents peuvent survivre au cours de l'essai. Trois concentrations 1a partir de la moitié de la CE50 ont été utilisées avec succès pour la plupart des produits chimiques sans générer plus de 20% de mortalité parentale ; ce pendant il est recommandé de recourir à un essai de détermination des concentrations pour certains produits chimiques (p. ex. les produits à action lente). L'essai de détermination des concentrations est réalisé en utilisant, par exemple, cinq réplicats par traitement et par témoin. Des informations supplémentaires, provenant d'essais avec des composés similaires ou tirées d'études déjà publiées, concernant la toxicité aiguë et/ou chronique pour *Daphnia* et/ou d'autres organismes aquatiques peuvent également être utiles pour décider de la gamme de concentrations à utiliser dans l'essai de détermination des concentrations. La production de la deuxième portée doit par ailleurs être assurée dans un délai approximatif de 7 jours (10 jours au plus) afin d'observer la proportion de mâles parmi les descendants de cette deuxième portée.

31. Si aucun effet n'est observé à la plus forte concentration utilisée lors de l'essai de détermination des concentrations (p. ex. 100 mg/L), ou s'il est probable que le produit chimique d'essai présente une toxicité faible ou nulle du fait de son innocuité pour d'autres organismes et/ou parce que ces derniers l'absorbent peu ou pas du tout, il est possible de mener l'essai reposant sur la méthode JHASA comme un essai limite, en utilisant une concentration limite du produit chimique d'essai (p. ex. 100 mg/L) et le témoin. Il convient alors d'utiliser dix réplicats pour les groupes exposés et pour les témoins. Un essai limite permettra de démontrer l'absence d'effet statistiquement significatif à la concentration limite. Néanmoins, si des descendants mâles sont recensés à la concentration limite, un essai complet sera normalement nécessaire.

Alimentation

32. Dans les essais semi-statiques, on préconise d'administrer une ration quotidienne, ou au moins trihebdomadaire (ce qui correspond au renouvellement du milieu). Si l'essai commence un vendredi et que les animaux ne sont pas nourris le week-end, il convient de doubler le volume de la ration administrée au début de l'essai. Une dilution éventuelle des concentrations d'exposition due à l'administration de nourriture sera prise en considération et évitée autant que faire se peut grâce à une concentration adéquate de suspensions d'algues. Il convient d'administrer une suspension d'algues suffisamment concentrée aux *Daphnia* afin de réduire au minimum le volume du milieu de culture des algues transféré dans les récipients d'essai. La concentration des algues s'obtient par centrifugation, suivie d'une remise en suspension dans le milieu de culture des *Daphnia*. Les écarts à ce régime (p. ex. dans les essais dynamiques) sont signalés.

33. Au cours de l'essai, le régime alimentaire des animaux parents sera de préférence composé d'algues unicellulaires vivantes appartenant à une ou plusieurs espèces parmi les suivantes : *Chlorella* sp., *Raphidocelis subcapitata* (anciennement *Pseudokirchneriella subcapitata*) et *Desmodesmus subspicatus* (anciennement *Scenedesmus subspicatus*). La nourriture est dispensée en fonction de la teneur en carbone organique (C) fournie à chaque animal parent. La recherche (35) a montré que pour *D. magna*, des teneurs comprises entre 0.1 et 0.2 mg de C/*Daphnia*/jour dans la ration alimentaire suffisent pour produire le nombre de descendants vivants requis pour remplir les critères de validité de la LD 211 (13). On peut fournir des rations à teneur constante tout au long de l'essai. La limitation de l'alimentation constitue l'un des facteurs environnementaux induisant la production de mâles (4-6) ; il a cependant été confirmé que cette ration était suffisante pour empêcher la production de mâles (12)(24).

34. Si des paramètres de remplacement, comme le nombre de cellules d'algues ou l'absorbance de la lumière, sont utilisés pour doser la teneur en carbone requise dans la ration alimentaire (notamment pour des raisons pratiques, si la mesure de la teneur en carbone est trop longue), chaque laboratoire est tenu de produire son propre nomogramme reliant le paramètre de remplacement à la teneur en carbone de la culture d'algues (des conseils concernant l'établissement d'un nomogramme sont donnés à l'annexe 4). Il convient de vérifier les nomogrammes au moins une fois par an, voire plus fréquemment si les conditions

de culture des algues changent. Il a été démontré que l'absorbance de la lumière donne une meilleure indication de la teneur en carbone que le nombre de cellules (36).

35. Il est en outre possible de donner aux animaux un mélange de levure, de Cerophyll et de nourriture pour truite (p. ex. 50 µL/daphnie dans 50 mL /jour) en vue de favoriser une reproduction suffisante.

Lumière

36. Seize heures de lumière à une intensité ne dépassant pas 15-20 µE·m⁻²·s⁻¹ mesurée au niveau de la surface de l'eau du récipient. En ce qui concerne les instruments de mesure de la lumière étalonnés en lux, la gamme de 1000-1500 lux pour la lumière blanche froide correspond étroitement à l'intensité lumineuse recommandée de 15-20 µE·m⁻²·s⁻¹. Les animaux ne doivent pas se trouver dans des conditions d'obscurité constante, car une légère augmentation du nombre de descendants mâles en condition de culture a été signalée chez les souches NIES et Clone A (24).

Température

37. La température du milieu d'essai sera comprise entre 18 °C et 22 °C. Toutefois, dans un même essai, la température ne varie pas, si possible, quotidiennement de plus de 2 °C à l'intérieur de cet intervalle (p. ex. 18-20 °C, 19-21 °C ou 20-22 °C). Il peut être utile d'utiliser un récipient d'essai supplémentaire pour surveiller la température.

Aération

38. Les récipients d'essai ne sont pas aérés durant l'essai.

Renouvellement du milieu d'essai

39. La fréquence de renouvellement du milieu dépendra de la stabilité du produit chimique d'essai, mais devrait être au moins trihebdomadaire. Pour un produit chimique facilement dégradable, un renouvellement fréquent (c'est-à-dire tous les jours) est recommandé jusqu'à l'ovulation des œufs de la deuxième portée (ou la libération des descendants de la première portée) pour garantir l'exposition aux produits chimiques pendant la période de détermination du sexe (soit 7 à 10 heures avant l'ovulation dans la chambre incubatrice) (15, 17).

40. Lors du renouvellement du milieu dans les essais semi-statiques, on prépare une deuxième série de récipients d'essai en vue d'y transférer les animaux parents avec, par exemple, une pipette en verre d'un diamètre approprié. Le volume de milieu transféré avec les *Daphnia* doit être réduit le plus possible. Si le régime d'exposition dynamique avec un flux continue de solution d'essai est utilisé, un minimum de 4 renouvellements de solution d'essai par jour peut être requis (37).

Observations

Descendance

41. Il convient de préférence de noter la première portée née de chaque animal parent (mais il n'est pas obligatoire de compter les descendants) et de la retirer chaque jour afin qu'elle ne consomme pas la nourriture destinée à l'animal parent. Compter les descendants de la deuxième portée et déterminer leur sexe. Aux fins de la présente LD, on ne compte que les descendants vivants de la deuxième portée, mais la présence d'œufs avortés ou de descendants morts est signalée de préférence.

Détermination du sexe des descendants

42. Après le début de l'exposition, vérifier la proportion de mâles parmi les descendants vivants de la deuxième portée. La manière la plus pratique et la plus simple de différencier les sexes chez les *Daphnia* est d'observer leurs caractéristiques phénotypiques. Les mâles et les femelles diffèrent par leur longueur et par la morphologie de leurs premières antennes qui sont plus longues chez les mâles que chez les femelles (figure 2). Cette différence est reconnaissable dès la naissance, bien que d'autres caractéristiques sexuelles secondaires se développent à mesure que les animaux grandissent (38). Afin d'observer le sexe morphologique, transférer les descendants produits par chaque parent (au moyen d'une pipette) et les placer dans une boîte de pétri contenant le milieu d'essai. Maintenir le milieu d'essai au minimum pour limiter autant que possible les mouvements des animaux. L'observation de la première antenne peut être effectuée au stéréomicroscope ($\times 10-60$). Les descendants morts est exclue des observations parce que la différenciation de sexe est parfois rendue difficile à cause de la perte de la première antenne après la mort.

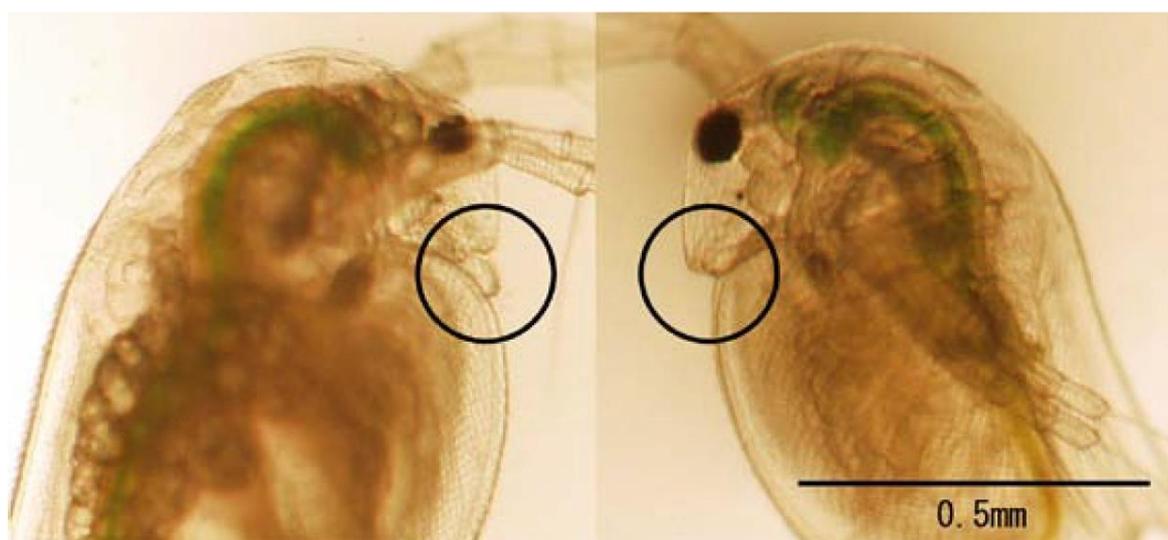


Figure 2. mâle (à gauche) et femelle (à droite) de *D. magna* âgés de 24 heures.

Les mâles peuvent être distingués des femelles par la longueur et la morphologie de leur première paire d'antennes, visible dans les cercles (39).

Mortalité des parents

43. Noter la mortalité des animaux parents, de préférence quotidiennement et au moins à chaque comptage des descendants.

Autres paramètres

44. L'ecdysis de chaque animal parent peut également servir à distinguer la première et la deuxième portées.

Dosages analytiques

Concentration du produit chimique d'essai

45. Pendant l'essai, déterminer les concentrations du produit chimique d'essai dans la solution au minimum dans le(s) témoin(s) pour connaître les concentrations d'essai la plus basse et la plus élevée ; de préférence, cependant, déterminer ces concentrations pour chacun des traitements. Dans les essais en régime statique, effectuer les analyses au début et à la fin de l'essai. Pour les essais en régime semi-statique, réaliser les analyses au moment de la préparation du milieu frais et au moment du renouvellement au moins une fois pendant l'essai (p. ex., un échantillon est prélevé sur une même solution lorsqu'elle vient d'être préparée et est étiqueté « échantillon neuf », puis lors du renouvellement et est étiqueté « échantillon vieux »). S'il s'agit d'un essai en dynamique, il est recommandé de mesurer la concentration du produit chimique d'essai réelle deux fois, notamment au début de l'essai dans un récipient par traitement, au minimum.

46. Il est recommandé de baser les résultats sur les 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. Si l'écart par rapport à la concentration initiale mesurée ou nominale est supérieur à $\pm 20\%$, exprimer les résultats par rapport à la moyenne géométrique ou par rapport à la moyenne pondérée en fonction du temps (voir les détails à l'annexe 5).

Paramètres physico-chimiques

47. Mesurer la concentration d'oxygène dissous, la température et le pH au moins une fois par intervalle de renouvellement, dans le milieu frais et vieux, dans le(s) témoin(s) et dans le

milieu contenant la concentration de produit chimique d'essai la plus élevée. La concentration d'oxygène dissous doit être supérieure ou égale à 3 mg/L au début de l'essai et durant celui-ci, dans le(s) témoin(s) et dans les récipients d'essai. Enregistrer la température de préférence en continu tout au long de l'essai, ou au minimum au début et à la fin de l'essai ; si possible, la température ne doit pas varier de plus de 2°C pendant l'essai. Le pH doit être compris entre 6 et 9. Il est recommandé de mesurer la dureté de l'eau dans le(s) témoin(s) et dans un récipient d'essai contenant la plus haute concentration de produit chimique, au début et à la fin de l'essai.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

48. L'effet mesuré le plus important de cet essai est la proportion de mâles dans la deuxième portée. Cette proportion (nombre de descendants mâles/nombre total de descendants) dans la deuxième portée est calculée pour chaque animal parent (c.-à-d., chaque réplicat) et la proportion moyenne de mâles est calculée par condition d'essai (par concentration d'essai et pour le(s) témoin(s)). Le nombre moyen de descendants femelles et mâles par animal parent peut être calculé respectivement pour chaque condition d'essai. Il convient de rapporter ce qui est observé pendant l'essai, à savoir l'ecdysis des individus parents, la présence d'œufs avortés et de descendants mort-nés.

49. Si, dans certains récipients, aucune portée de deuxième génération n'est présente en raison de la mort de l'animal parent ou d'effets néfastes pour la reproduction (y compris si l'on relève la présence d'œufs avortés ou de descendants morts), ces récipients (réplicats) sont exclus de l'analyse de la proportion de mâles dans la deuxième portée.

50. Le nombre total de descendants vivants par animal parent peut être calculé en partant du nombre de descendants vivants engendrés par les animaux parents toujours vivants. Cependant, la variable de réponse la plus pertinente du point de vue écologique est le nombre total de descendants vivants par animal parent qui n'est pas mort de manière accidentelle ou fortuite au cours de l'essai. Si un animal parent meurt, soit accidentellement, soit de manière fortuite, le réplicat est exclu de l'analyse. L'analyse reposera alors sur un nombre réduit de réplicats. Si un animal parent meurt dans un récipient recevant le produit chimique d'essai, il convient d'examiner si la mortalité suit une fonction concentration-réponse, notamment s'il existe une régression importante de la réponse en fonction de la concentration de produit chimique d'essai avec une pente positive (on pourra appliquer un test statistique comme le test de tendance de Cochran-Armitage à cette fin). Si la mortalité parentale ne suit pas de courbe concentration-réponse, alors les réplicats montrant une mortalité parentale sont exclus de l'analyse des résultats. Si la mortalité suit une fonction concentration-réponse, la mortalité parentale est considérée comme un effet du produit chimique d'essai et les réplicats concernés ne sont pas exclus de l'analyse des résultats de l'essai. Le même critère de validité (20 %) peut s'appliquer pour la mortalité parentale aléatoire ou accidentelle dans le(s) témoin(s) ainsi que pour chacune des concentrations d'essai.

51. Le nombre de parents survivants dans le(s) témoin(s) non traités constitue un critère de validité, et il convient qu'il soit documenté et consigné. Par ailleurs, on indiquera dans le rapport tout autre signe indiquant un effet nocif, par exemple un comportement anormal.

52. Pour mettre en évidence une éventuelle activité du produit chimique d'essai analogue à l'hormone juvénile, la proportion de mâles est comparée entre les groupes traités avec le produit chimique et témoins. Si, pour exprimer l'effet, il est nécessaire d'utiliser la CSEO/CME0 correspondant à la proportion de mâles, il faut procéder à une analyse statistique comme expliqué à l'annexe 6.

Rapport d'essai

53. Le rapport d'essai devra mentionner les informations suivantes :

Produit chimique :

- état physique et propriétés physicochimiques pertinentes ;
- données relatives à l'identification chimique, dont la pureté.

Espèce d'essai :

- souche (préciser si le génotype du clone a été déterminé), fournisseur ou source (quand elle est connue) et conditions de culture appliquées. Si l'on utilise une espèce autre que *D. magna* il convient de le signaler et de le justifier.

Conditions de l'essai :

- mode opératoire utilisé (par exemple, semi-statique ou dynamique, volume;
- photopériode et intensité lumineuse ;
- plan de l'essai (par exemple, nombre de réplicats) ;
- détails du milieu de culture employé ;
- informations détaillées concernant l'alimentation, dont la quantité (en mg de *C/Daphnia*/jour) et l'horaire (p. ex. le type d'aliment(s), y compris, pour les algues, le nom de l'espèce et, si elles sont connues, la variété et les conditions de culture) ;
- méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (la nature et la concentration du solvant ou du dispersant sont indiquées, le cas échéant).

Résultats :

- résultats des éventuelles études préliminaires sur la stabilité du produit chimique d'essai ;
- résultats d'un essai d'immobilisation aigüe, si disponible ;
- concentrations nominales et résultats de toutes les analyses pour déterminer la concentration du produit chimique testé dans les récipients d'essai ; l'efficacité de récupération de la méthode et la limite de détection doivent également être consignés ;

- qualité de l'eau dans les récipients d'essai (c.-à-d., pH, température, concentration d'oxygène dissous, et si nécessaire dureté) ;
- rapport complet de la production de descendants vivants et le sexe de la deuxième portée produite pendant l'essai par chaque parent ; temps de production des descendants de la deuxième portée ; présence d'œufs avortés et descendants morts ;
- nombre et dates des décès chez les animaux parents ;
- graphique représentant la proportion de mâles des descendants vivants par animal parent pour chaque réplicat, à l'exception des animaux parents morts de manière accidentelle ou fortuite, en fonction de la concentration de produit chimique testé ;
- moyenne du nombre de descendants dans la deuxième portée et proportion de mâles dans les témoins (témoin eau et témoin solvant) et dans les groupes exposés ;
- CSEO et CMEO pour la proportion de mâles (si demandé) ; méthode d'analyse statistique et de traitement des données ;
- Explication pour toute déviation de la LD et si ces déviations ont pu affecter les résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OECD (2018). Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264304741-en>.
- (2) Toyota K, Watanabe H, Hirano M, Abe R, Miyakawa H, Song Y, Sato T, Miyagawa S, Tollefsen KE, Yamamoto H, Tatarazako N, Iguchi T. (2022). Juvenile hormone synthesis and signaling disruption triggering male offspring induction and population decline in cladocerans (water flea): Review and adverse outcome pathway development. *Aquatic Toxicology* 243: 106058.
- (3) LeBlanc GA, Medlock EK. (2015). Males on demand: The environmental-neuro-endocrine control of male sex determination in daphnids. *FEBS Journal* 282(21): 4080–4093.
- (4) Hobaek A, Larsson P. (1990). Sex determination in *Daphnia magna*. *Ecology* 71: 2255–2268.
- (5) Kleiven OT, Larsson P, Hobaek A. (1992). Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. *Oikos* 65: 197–206.
- (6) Hebert PDN. (1978). The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biological Reviews* 53: 387-426.
- (7) Olmstead AW, LeBlanc GA. (2002). Juvenoid hormone methyl farnesoate is a sex determinant in the crustacean *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Zoology* 293: 736–739.
- (8) Olmstead AW, LeBlanc GA. (2003). Insecticidal juvenile hormone analogs stimulate the production of male offspring in the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Health Perspectives* 111: 919–924.
- (9) Tatarazako N, Oda S, Watanabe H, Morita M, Iguchi T. (2003). Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*. *Chemosphere* 53: 827–833.
- (10) Oda S, Tatarazako N, Watanabe H, Morita M, Iguchi T. (2005a). Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. *Chemosphere* 61: 1168–1174.
- (11) Tanaka Y, Nakamura K, Oda S, Watanabe H, Tatarazako N. (2018). Estimation of population-level effect of the endocrine disruptor pyriproxyfen in *Daphnia magna* by using changes in sex ratio and reproductive output. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 156: 463–475.
- (12) OECD (2008). Report of the validation of an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.93, [ENV/JM/MONO\(2008\)20](#), OECD, Paris.
- (13) OECD (2012). Test No. 211: *Daphnia magna* reproduction test, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris,
- (14) Wang HY, Olmstead AW, Li H, LeBlanc GA. (2005). The screening of chemicals for juvenoid-related endocrine activity using the water flea *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 74: 193–204.
- (15) Abe R, Watanabe H, Yamamuro M, Iguchi T, Tatarazako N. (2015). Establishment of a short-term, *in vivo* screening method for detecting chemicals with juvenile hormone activity using adult *Daphnia magna*. *Journal of Applied Toxicology* 35(1): 75-82.
- (16) Abe R, Toyota K, Miyakawa H, Watanabe H, Oka T, Miyagawa S, Nishide H, Uchiyama I, Tollefsen KE, Iguchi T, Tatarazako N. (2015). Diofenolan induces male offspring

- production through binding to the juvenile hormone receptor in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 159: 44-51.
- (17) Kato, Y., Kobayashi, K., Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H. and Iguchi, T., 2010. Sequence divergence and expression of a transformer gene in the branchiopod crustacean, *Daphnia magna*. *Genomics* 95: 160-165.
 - (18) OECD (1992). Test No. 301: Ready Biodegradability. OECD Guideline for Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris.
 - (19) OECD (2014). Test No. 310 Ready biodegradability - CO₂ in sealed vessels (Headspace test). OECD Guideline for Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris.
 - (20) OECD (2019). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Test Chemicals, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23 (Second Edition), [ENV/JM/MONO\(2000\)6/REV1](#), OECD, Paris.
 - (21) OECD (2004). Test No. 202: *Daphnia* sp., acute immobilization test, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.
 - (22) Miyakawa H, Toyota K, Hirakawa I, Ogino Y, Miyagawa S, Oda S, Tatarazako N, Miura T, Colbourne JK, Iguchi T. (2013). A mutation in the Methoprene tolerant alters juvenile hormone response in insects and crustaceans. *Nature Communications* 4: 1856.
 - (23) Tanaka T, Iguchi T, Miyakawa H. (2019). Establishment of a high-sensitivity reporter system in mammalian cells for detecting juvenoids using juvenile hormone receptors of *Daphnia pulex*. *Journal of Applied Toxicology* 39(2): 241–246.
 - (24) OECD (2024). Validation of short-term juvenile hormone activity screening assay using *Daphnia magna* (JHASA), Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.393.
 - (25) Oda S, Tatarazako N, Watanabe H, Morita M, Iguchi T. (2005). Production of male neonates in 4 cladoceran species exposed to a juvenile hormone analog, fenoxycarb. *Chemosphere* 60: 74–78.
 - (26) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 6, [OCDE/GD\(97\)19](#).
 - (27) Elendt BP. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma* 154: 25–33.
 - (28) USEPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC.
 - (29) Vigano L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 47: 775–782.
 - (30) ASTM (2008). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA.
 - (31) Baird DJ et al. (1989). The longterm maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144–148.

- (32) Parkhurst BR, Forte JL, Wright GP. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 26: 1–8.
- (33) Cowgill UM, Milazzo DP. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Archiv für Hydrobiologie* 120(2): 185–196.
- (34) Oda S, Tatarazako N, Dorgerloh M, Johnson R, Kusk O, Leverett D, Marchini S, Nakari T, Williams T, Iguchi T. (2007). Strain difference in sensitivity to 3,4-dichloroaniline and insect growth regulator, fenoxycarb, in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 399-405.
- (35) Sims IR, Watson S, Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12: 2053-2058.
- (36) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *für Hydrobiologie* 128: 459-466.
- (37) ASTM (2012) Standard Guide for Conducting *Daphnia magna* Life-Cycle Toxicity Tests. E1193-97. ASTM International, PA, United States.
- (38) Olmstead AW, LeBlanc GA. (2000). Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 2107-2113.
- (39) Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). *Environmental Science* 17, 439-449.
- (40) OECD (1993). OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.
- (41) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. *Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54*. OECD, Paris.
- (42) Green J W, Springer T A, Holbech H (2018) *Statistical Analysis of Ecotoxicity Studies*, Wiley, New York.
- (43) Cameron AC, Trivedi PK. (2013). *Regression analysis of count data*, second edition, *Econometric Society Monographs, Series Number 53*, Cambridge University Press.

ANNEXE 1: Définitions

Les définitions suivantes sont utilisées dans le cadre de la présente Ligne directrice :

Animaux parents : *Daphnia* femelles présentes au début de l'essai.

Descendants : jeunes *Daphnia* engendrées par les animaux parents au cours de l'essai.

Portée : groupe de descendants éclos dans une chambre de portée et relâchés de cette chambre en une fois.

Proportion de mâles : nombre de descendants vivants mâles divisé par le nombre total de descendants vivants dans la portée.

Ecdysis : mue périodique où la carapace de la daphnie tombe.

Mortalité accidentelle : mortalité non liée au produit chimique d'essai, et causée par un incident (c'est-à-dire par une cause connue).

Mortalité fortuite : mortalité non liée au produit chimique d'essai, et de cause inconnue.

Mortalité : un animal est noté comme mort lorsqu'il est immobile, autrement dit lorsqu'il n'est pas capable de nager ou si aucun mouvement des appendices ou du postabdomen n'est observé dans un délai de 15 secondes après l'agitation douce du récipient d'essai. (Si on utilise une autre définition, il convient que celle-ci soit stipulée avec sa référence.)

CEx : concentration du produit chimique d'essai dissous dans l'eau qui entraîne une diminution de x pour cent de la reproduction chez *Daphnia*, durant une période d'exposition définie.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO) : concentration d'essai la plus basse d'un produit chimique à laquelle on observe un effet statistiquement significatif (à $p < 0.05$) par comparaison avec le témoin. Cependant, il convient que toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO produisent un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Si ces deux conditions ne peuvent être remplies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la CMEO (et donc de la CSEO).

Concentration sans effet observé (CSEO) : concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO qui, comparée au témoin, n'a pas d'effet statistiquement significatif (à $p < 0.05$), durant une période d'exposition définie.

ANNEXE 2: CONDITIONS POUR L'ESSAI DE DÉPISTAGE À COURT TERME DE L'ACTIVITÉ DE L'HORMONE JUVÉNILE SUR DAPHNIA MAGNA (JHASA)

1. Espèce testée (recommandée)	<i>Daphnia magna</i>
2. Type d'essai	Système semi-statique, régime dynamique
3. Température de l'eau	20±2°C (p. ex. 18-20, 19-21 ou 20-22 °C)
4. Qualité d'illumination	Ampoules fluorescentes (spectre large) 15-20 µE/m ² /s ⁻¹ , 1000-1500 lux
5. Photopériode	16 heures de lumière, 8 heures d'obscurité
6. Taille de la chambre d'essai	50-100 mL
7. Âge des organismes au début de l'essai	10-17 j
8. Nombre d'organismes par réplicat	1 <i>Daphnia</i> /réplicat (récipient)
9. Nombre de traitements	Au moins 3 traitements par le produit chimique d'essai plus témoin(s) approprié(s)
10. Nombre de réplicats par traitement	Minimum 10 réplicats par traitement avec le produit chimique d'essai et par témoin
11. Nombre d'organismes par essai	Minimum 40 <i>Daphnia</i> (minimum 50 <i>Daphnia</i> si un témoin solvant est pratiqué)
12. Régime alimentaire	Suspension d'algues (recommandation : entre 0.1 et 0.2 mg C/ <i>Daphnia</i> /jour) En complément, une alimentation quotidienne avec 0.05 mL de levure-Cerophyll-nourriture pour truite (YCT) par récipient d'essai est recommandée Si l'essai commence un vendredi et que les animaux ne sont pas nourris le week-end, il convient de doubler le volume des rations de ces deux éléments administrées au début de l'essai
13. Aération	Aucune (La concentration d'oxygène dissous doit être supérieure à 3 mg/L au début et pendant toute la durée de l'essai)
14. pH	Compris entre 6 et 9
15. Eau de dilution	Eau douce calcaire reconstituée (p. ex.,

- milieux Elendt M4 et M7, voir l'annexe 2)
16. Durée de l'exposition chimique 7 jours (aucune période de pré-exposition n'est requise)
- La durée peut être réduite ou augmentée jusqu'à ce que toutes les *Daphnia* survivantes aient engendré une deuxième portée
17. Mesures biologiques Proportion de descendants mâles vivants dans la deuxième portée
- Nombre de descendants vivants femelles et mâles (facultatif)
18. Critères de validité de l'essai Mortalité des *Daphnia* parents < 20 % dans le(s) témoin(s)
- Le(s) témoin(s) doivent remplir les critères suivants pour garantir la puissance de détection statistique concernant la proportion de mâles :
- le nombre moyen de descendants vivants par animal parent vivant est ≥ 12 ;
 - il n'y a pas plus d'un animal parent qui ne produit pas de descendants mâles ;
- la proportion moyenne de mâles ne dépasse de préférence pas 5 %.

ANNEXE 3: PRÉPARATION DE MILIEUX ELENDT M7 ET M4 ENTIÈREMENT DÉFINIS

Acclimatation aux milieux Elendt M7 et M4

Certains laboratoires ont éprouvé des difficultés à transférer directement les *Daphnia* dans les milieux M4 (40) et M7. Ils sont toutefois parvenus à un certain résultat en les acclimatant progressivement, c'est-à-dire en les transférant de leur milieu vers un milieu à 30 % d'Elendt, puis à 60 % d'Elendt et enfin à 100 % d'Elendt. La période d'acclimatation peut prendre jusqu'à un mois.

Préparation des solutions mères

La première publication relative au milieu M4 se trouve dans Elendt, B.P. (27). Le milieu M7 est préparé comme le milieu M4, à ceci près que les concentrations de certaines substances énumérées au tableau 1 sont quatre fois moindres dans le milieu M7 que dans le M4. Tout d'abord, préparer différentes solutions mères (I), contenant chacune une seule substance en traces, avec une eau d'une pureté adéquate, par exemple de l'eau désionisée, distillée ou obtenue par osmose inverse. Préparer une solution mère combinée (II) (50 fois la concentration finale) à partir de ces solutions mères (I) (voir le tableau 1). Préparer chaque solution mère de macronutriment en ajoutant chacun des macronutriments à 1 L d'eau, comme indiqué au tableau 2. Préparer une solution mère de vitamines en ajoutant trois vitamines à 1 L d'eau, comme indiqué au tableau 3. Congeler la solution mère de vitamines combinées par petites parties aliquotes.

Préparation des milieux M4 et M7.

Préparer les milieux M4 et M7 au moyen de la solution mère combinée (II), des solutions mères de macronutriments et de la solution mère de vitamines combinées. Pour préparer les deux milieux, prélever 50 mL de la solution mère combinée (II), les volumes de chaque solution mère de macronutriments indiqués au tableau 2, et 0.1 mL de la solution mère de vitamines combinées, puis compléter avec de l'eau jusqu'à atteindre 1 L de solution. Afin d'éviter que les sels ne précipitent lorsqu'on prépare le milieu complet, ajouter les parties aliquotes de solution mère à quelque 500 à 800 mL d'eau désionisée et amener le volume à un litre. Ajouter les vitamines au milieu peu avant son utilisation. Ensuite, laisser le milieu s'aérer et se stabiliser.

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

Solutions mères (II)	Quantité (mg) avant d'amener le volume à 1 L d'eau (mg/L)	Concentration (par rapport au milieu M4)	Pour préparer la solution mère combinée II, ajouter la quantité suivante (mL) de solution mère I et amener à 1 L d'eau (mL/L)		Concentrations finales dans les solutions d'essai (mg/L)	
			M4	M7	M4	M7
H ₃ BO ₃ ⁽¹⁾	57 190	20 000 fois	1.0	0.25	2.86	0.715
MnCl ₂ •4 H ₂ O ⁽¹⁾	7 210	20 000 fois	1.0	0.25	0.361	0.090
LiCl ⁽¹⁾	6 120	20 000 fois	1.0	0.25	0.306	0.077
RbCl ⁽¹⁾	1 420	20 000 fois	1.0	0.25	0.071	0.018
SrCl ₂ •6 H ₂ O ⁽¹⁾	3 040	20 000 fois	1.0	0.25	0.152	0.038
NaBr ⁽¹⁾	320	20 000 fois	1.0	0.25	0.016	0.004
Mo Na ₂ O ₄ •2 H ₂ O ⁽¹⁾	1 260	20 000 fois	1.0	0.25	0.063	0.016
CuCl ₂ •2 H ₂ O ⁽¹⁾	335	20 000 fois	1.0	0.25	0.017	0.004
ZnCl ₂	260	20 000 fois	1.0	1.0	0.013	0.013
CoCl ₂ •6 H ₂ O	200	20 000 fois	1.0	1.0	0.010	0.010
KI	65	20 000 fois	1.0	1.0	0.0033	0.0033
Na ₂ SeO ₃	43.8	20 000 fois	1.0	1.0	0.0022	0.0022
NH ₄ VO ₃	11.5	20 000 fois	1.0	1.0	0.00058	0.00058
Na ₂ EDTA•2 H ₂ O ⁽¹⁾⁽²⁾	5 000	2 000 fois	20.0 ⁽²⁾	5.0 ⁽²⁾	2.5	0.625
FeSO ₄ •7 H ₂ O ⁽¹⁾⁽²⁾	1 991	2 000 fois			1.0	0.249

(1) Les concentrations de ces substances sont différentes dans le M4 et le M7, comme indiqué précédemment.

(2) Les solutions de Na₂EDTA et de FeSO₄ sont préparées séparément, puis mélangées et immédiatement autoclavées. Cette solution de Fe-EDTA est ajoutée à la solution mère II comme indiqué ci-dessus.

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

Macronutriment	Quantité (mg) avant d'amener le volume à 1 L d'eau (mg/L)	Concentration (par rapport aux milieux M4 et M7)	Quantité de solution mère de macronutriment ajoutée pour préparer le M4 et le M7 (mL/L)	Concentrations finales dans les solutions d'essai M4 et M7 (mg/L)
CaCl ₂ •2 H ₂ O	293 800	1 000 fois	1.0	293.8
MgSO ₄ •7 H ₂ O	246 600	2 000 fois	0.5	123.3
KCl	58 000	10 000 fois	0.1	5.8
NaHCO ₃	64 800	1 000 fois	1.0	64.8
Na ₂ SiO ₃ •9 H ₂ O	50 000	5 000 fois	0.2	10.0
NaNO ₃	2 740	10 000 fois	0.1	0.274
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000 fois	0.1	0.143
K ₂ HP O ₄	1 840	10 000 fois	0.1	0.184

Tableau 3. Solutions mères de vitamines pour les milieux M4 et M7

	Quantité avant d'amener le volume à 1 L d'eau (mg/L)	Concentration (par rapport aux milieux M4 et M7)	Quantité de solution mère de vitamine ajoutée pour préparer les milieux M4 et M7 (mL/L)	Concentrations finales dans les solutions d'essai dans le M4 et M7 (mg/L)
Chlorhydrate de thiamine	750	10 000 fois		0.075
Cyanocobalamine (B12)	10	10 000 fois	0.1	0.0010
Biotine	7.5	10 000 fois		0.0075

Les trois solutions de vitamine sont combinées pour produire une seule solution mère de vitamines.

ANNEXE 4; ANALYSE DU CARBON ORGANIQUE TOTAL (COT) ET PRODUCTION D'UN NOMOGRAPHE POUR LE COT DANS L'ALIMENTATION EN ALGUES

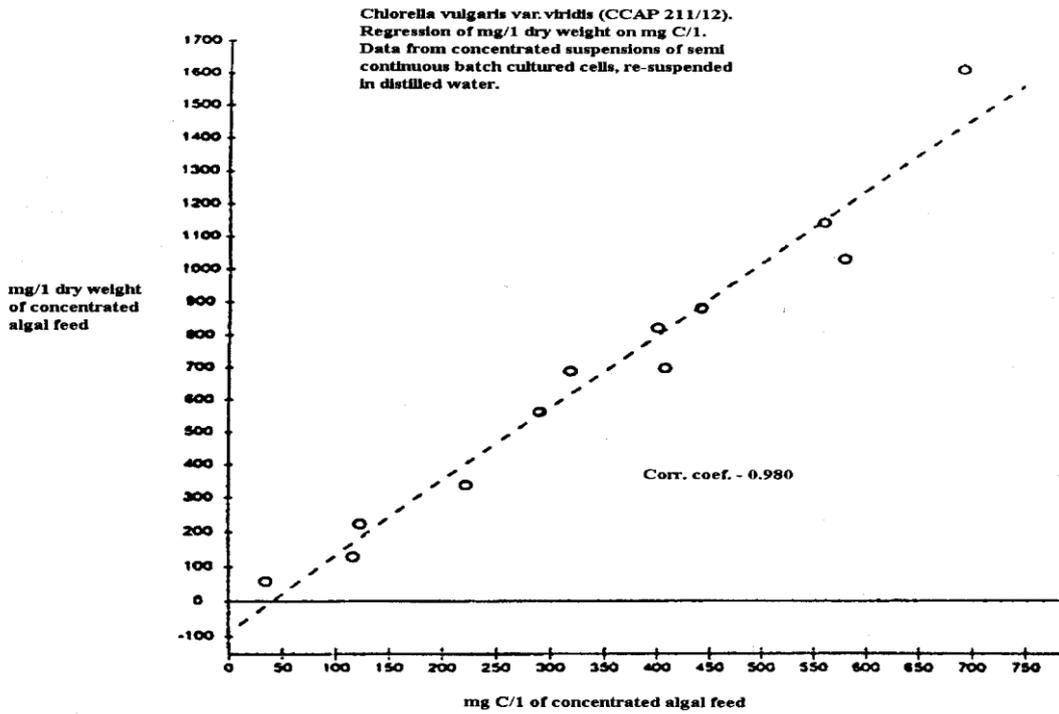
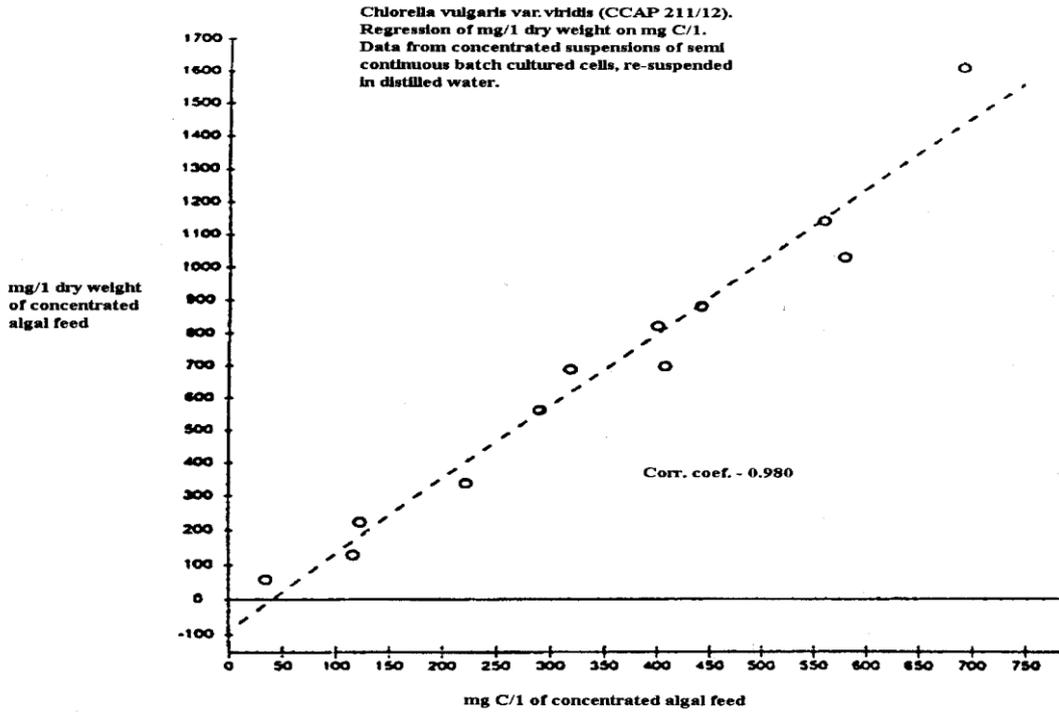
Il est reconnu que le contenu en carbone de l'alimentation en algues ne sera normalement pas mesuré directement, mais plutôt par corrélations (c.à.d. nomogrammes) avec des mesures de substitution telles que le nombre de cellule d'algues ou l'absorbance de la lumière.

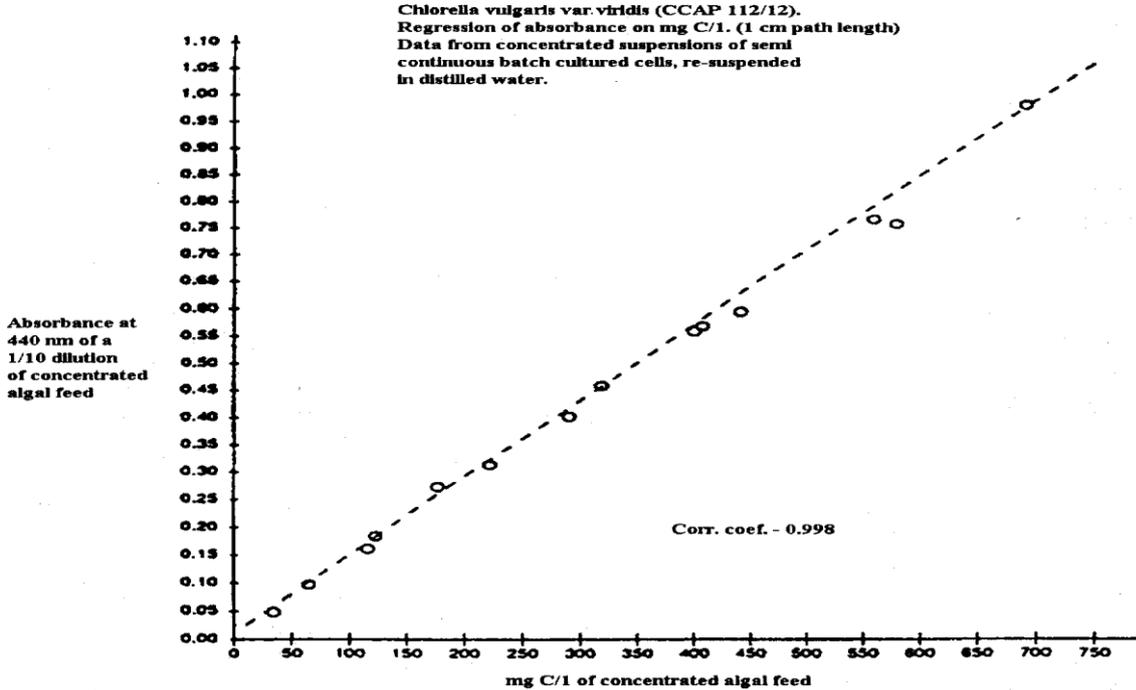
Le COT devra être mesuré par oxydation à haute température plutôt que par les méthodes par UV ou persulfate. Pour des plus amples conseils, consulter *The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB*.

Concernant la production d'un nomogramme, les algues doivent être séparées du milieu de croissance par centrifugation suivie de re-suspension dans de l'eau distillée. Mesurer le paramètre de substitution et la concentration de COT dans chaque échantillon en triplicat. Les blancs d'eau distillée doivent être analysés et la concentration de COT déduite de celle contenue dans l'échantillon d'algues.

Les nomogrammes doivent être linéaires sur une gamme requise de concentrations en carbone. Des exemples suivent ci-dessous.

NB : CES EXEMPLES NE DOIVENT PAS ÊTRE UTILISÉS POUR LES CONVERSIONS : IL EST ESSENTIAL QUE LES LABORATOIRES PRÉPARENT LEURS PROPRES NOMOGRAPHERS.

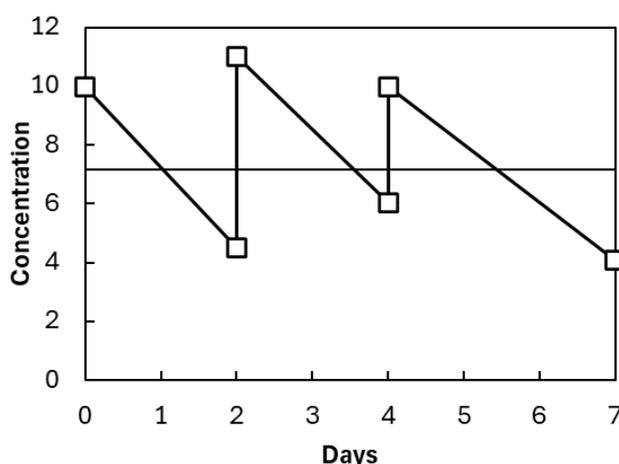




ANNEXE 5: CALCUL DE LA MOYENNE PONDÉRÉE DANS LE TEMPS

Moyenne pondérée dans le temps

Étant donné que la concentration du produit chimique testé peut décliner sur une période entre deux renouvellement de milieu, il est nécessaire de considérer quelle concentration doit être choisie comme représentative de la gamme de concentrations à laquelle sont soumises les daphnies. La sélection doit se fonder sur des considérations biologiques ainsi que statistiques. Par exemple, si l'induction de descendants mâles est jugé découler d'un pic de concentration subi, alors la concentration maximum devrait être utilisée. Cependant, si les effets accumulés ou long-terme du produit chimique toxique sont considérés comme plus importants, alors une concentration moyenne est plus pertinente. Dans ce cas, une moyenne appropriée est la moyenne pondérée dans le temps de la concentration, puisqu'elle prend en compte la variation des concentrations instantanées sur la durée.



Graphique 1 : exemple de moyenne pondérée dans le temps

Le Graphique 1 montre un exemple d'un test simplifié d'une durée de 7 jours avec un renouvellement du milieu d'essai aux jours 0, 2 et 4.

- Le petit zig-zag représente la concentration à tout moment. La chute de concentration est supposée suivre un processus exponentiel.
- Les six points représentent les concentrations mesurées observées au début et à la fin de chaque période de renouvellement.
- La ligne horizontale continue indique la position de la moyenne pondérée dans le temps.

La moyenne pondérée dans le temps est calculée de façon à ce que l'aire sous la moyenne pondérée dans le temps soit égale à l'aire sous la courbe de la concentration. Le calcul pour le graphique ci-dessus est illustré dans le tableau 1.

Tableau 1 : Calcul de la moyenne pondérée dans le temps

Renouvellement No.	Jours	Conc 0	Conc 1	Ln (Conc 0)	Ln (Conc 1)	Area	
1	2	10.000	4.493	2.303	1.503	13.766	
2	2	11.000	6.037	2.398	1.798	16.544	
3	3	10.000	4.066	2.303	1.403	19.782	
Total Jours :					7	Aire totale:	50.092
						Moy. pond. dans le temps:	7.156

Les « Jours » sont le nombre de jours entre deux renouvellement de milieu d'essai

« Conc 0 » est la concentration mesurée au début de la période

« Conc 1 » est la concentration mesurée à la fin de la période

« Ln (Conc 0) » est le logarithme naturel de Conc 0

« Ln(Conc 1) » est le logarithme naturel de Conc 1

« Aire totale » est l'aire sous la courbe exponentielle pour chaque période de renouvellement. Elle est calculée comme suit :

$$Aire = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Jours$$

La moyenne pondérée dans le temps est l'aire totale divisée par le nombre de jours total.

Il est clair que quand les observations sont faites uniquement au début et à la fin de chaque période de renouvellement, il n'est pas possible de confirmer si le processus de chute est effectivement exponentiel. Une courbe différente résulterait en un calcul différent pour l'aire. Cependant, un processus de chute exponentiel est plausible et probablement la meilleure courbe à utiliser en l'absence d'autres informations.

Cependant, une attention est demandée si l'analyse chimique échoue à trouver une trace du produit chimique testé à la fin de la période avant un renouvellement. A moins qu'il soit possible d'estimer la rapidité avec laquelle le produit chimique disparaît, il est sinon impossible d'obtenir une moyenne pondérée dans le temps raisonnable.

ANNEXE 6: ANALYSE STATISTIQUE

Le principal but de cet essai de dépistage est de mettre en lumière l'éventuelle activité d'un produit chimique d'essai analogue à celle de l'hormone juvénile (1). Par conséquent, on utilisera l'annexe 7 de la LD n° 211 (12) lorsque la CMEO et la CSEO sont nécessaires. Cependant, si la production de descendants mâles est également observée dans le(s) témoin(s) ou si elle n'est pas remarquable dans les récipients traités, déterminer la signification statistique de la proportion de descendants mâles dans ces récipients permet d'aider à interpréter les résultats.

Un logigramme expliquant l'analyse de la proportion de descendants mâles dans l'essai JHASA est fourni ci-dessous.

Si un solvant est utilisé, il convient de comparer la réponse dans le témoin de l'eau de dilution et dans le témoin solvant (p. ex., test de Student) et, si aucune différence significative n'est observée, de rassembler les deux témoins avant de mener une analyse statistique ; dans le cas contraire, le témoin solvant sert à déterminer la CSEO.

Si l'hypothèse est que les données (normalement, les moyennes des réplicats) suivent une tendance monotone (à la hausse ou à la baisse), il est recommandé d'analyser les données suivant des méthodes séquentielles fondées sur des tests de tendance (p. ex., les tests de Williams ou de Jonckheere-Terpstra). Pour vérifier la monotonie, il est possible d'effectuer un contrôle visuel d'un nuage de points, mais il est préférable d'évaluer les données au moyen de contrastes linéaires et quadratiques. Sauf si le contraste quadratique est significatif alors que le contraste linéaire ne l'est pas, le test de tendance est réalisé. Si les données ne sont pas monotones, le test de Dunnett permet de déterminer les effets du traitement, à condition que les données soient normalement distribuées et que l'homogénéité de la variance soit vérifiée. Le test de Tamhane-Dunnett est utilisé si les données sont normalement distribuées mais qu'il existe une hétérogénéité de la variance. Si ces conditions ne sont pas remplies, on utilise le test de Dunn avec la correction de Bonferroni-Holm. Tous les tests indiqués sont réalisés indépendamment de tout test global F ou de Kruskal-Wallis. On trouvera dans OCDE 2006 (41, 420) plus de précisions sur ces différents tests.

Il est possible d'employer d'autres méthodes, par exemple un modèle linéaire généralisé (MLG) ou un modèle linéaire généralisé à effets mixtes (GLMM) avec distribution d'erreur binomiale pour analyser la proportion de mâles, si cela peut être justifié du point de vue statistique (43). Cependant, étant donné que la proportion de mâles dans les témoins est quasiment nulle dans tous les réplicats (variance zéro), cette analyse sera informelle. Il n'est pas recommandé de mélanger les réplicats de chaque traitement avant de recourir au test Cochran-Armitage séquentiel ni au test exact de Fisher avec correction de Bonferroni-Holm, car la détermination du sexe est effectuée par portée et ainsi la proportion de mâles doit être calculée par réplicat.

