



n° 16644

**DEVELOPPEMENT DU TEST
"CERODAPHNIA DUBIA"**

**Etude Interagences
Rapport des phases 1 et 2**

Juin 1993

SOMMAIRE

1. CADRE DE L'ETUDE	1
2. Objectifs de l'étude.....	2
3. Contenu de l'étude	2
3.1 Implantation des tests dans plusieurs laboratoires.....	2
3.2 Intercalibration.....	4
4. Avancement de l'étude	5
4.1 Calendrier.....	5
4.2 Fiches de visite de laboratoires et d'entretiens.....	8
4.3 Situation des laboratoires au 24 juin 1992.....	15
5. synthese bibliographique	18
5.1. Résumé.....	18
5.2. Description de l'organisme	18
5.2.1. Taxonomie et morphologie.....	18
5.2.2. Mode de vie et d'alimentation	19
5.2.3. Origine de la souche d'essai.....	20
5.2.4. Utilisation dans les essais de toxicité	21
5.2.5. Description de l'essai (protocoles et résultats).....	21
5.2.5.1. Phases du cycle étudiées.....	21
5.2.5.2. Protocole d'essai.....	22
5.2.5.3. Mesures biologiques mises en oeuvre.....	22
5.2.5.4. Critères de validité.....	23
5.2.5.5. Expression des résultats.....	23
5.2.6. Caractéristiques de la méthode utilisée.....	24
5.2.6.1. Catégorie d'essai "chronique".....	24
5.2.6.2. Maintenance de la souche et disponibilité en jeunes.....	24
5.2.6.3. Sensibilité.....	24
5.2.6.4. Rapidité.....	25
5.2.6.5. Fiabilité (ring-test).....	25
5.2.6.6. Représentativité	25
5.2.6.7. Portabilité.....	25
5.2.6.8. Facilité de mise en place.....	25
5.2.7. Besoins en personnel.....	26
6. Développement du test <i>Ceriodaphnia dubia</i>	28
6.1. Rédaction d'un mode opératoire pour l'essai.....	28
6.1.1. Compréhension du déroulement de l'essai	28
6.1.2. La nouvelle rédaction.....	29
6.1.3. La version "provisoire".....	30
6.1.4. Comparaison entre le mode opératoire de l'PEPA et la version "provisoire"	31
6.1.4.1. Aspect général.....	31
6.1.4.2. Rangement aléatoire des récipients d'essais.....	31
6.1.5. Les sources de variation inter-laboratoires.....	32
6.2. Réalisation d'un questionnaire.....	34
6.3. Planning d'implantation du test dans les laboratoires.....	35
6.3.1. Appréciation de l'état d'avancement des laboratoires.....	35
6.3.2. Choix des substances à tester.....	36
6.3.3. Définition d'un planning.....	36
6.4. Traitement des données.....	37
7. BIBLIOGRAPHIE	38

8.	Glossaire	40
9.	Annexes	41
	Annexe 1: Lettre aux laboratoires.....	41
	Annexe 2: Mode opératoire . version provisoire	43
1.	objet et DOMAINE D'APPLICATION	44
2.	Principe	44
3.	environnement de l'essai.....	44
4.	milieux	45
	4.1. Milieu d'Elendt M4	45
	4.1.1. Préparation (voir annexe).....	45
	4.2. Nourriture	45
	4.3. Solution nutritive.....	46
	4.4. Milieu de croissance	46
5.	réactif biologique	47
	5.1. Souche.....	47
	5.2. Elevage de masse	47
	5.3. Elevage intermédiaire.....	47
	5.4. Production du réactif biologique.....	47
6.	substance de reference	48
7.	PROTOCOLE D'ESSAI.....	49
	7.1. Description générale.....	49
	7.2. Préparation des solutions d'essai	49
	7.3. Mise en route de l'essai	49
	7.4. Conduite de l'essai	50
	7.5. Mesures physico-chimiques	50
	7.6. Mesures biologiques	50
	7.7. Fin d'essai.....	51
8.	validation.....	51
9.	présentation des résultats	51
	9.3. Annexe 3: Questionnaire.....	56

1. CADRE DE L'ETUDE

Dans le cadre de leur IIIème programme d'étude, les Agences de l'**Eau** ont décidé d'examiner l'intérêt de tests simples permettant de mettre en évidence les effets toxiques chroniques des effluents, en vue de **compléter** l'approche actuelle **basée** sur un test de toxicité aiguë (daphnie 24 heures).

Dans une première phase, il a été **réalisé** une étude préliminaire dans le but de recenser les méthodes existantes et les applications déjà réalisées, et d'autres part, de procéder **à** un premier choix en fonction des éléments recueillis.

A l'issue de cette phase préliminaire, le test de toxicité chronique *Ceriodaphnia dubia* 7 jours a été sélectionné par le groupe de travail inter-agences, sachant que ce test ne saurait décrire à lui seul la totalité de la toxicité chronique d'un **effluent**, et que d'autres tests resteront indiqués pour des études ou des approches particulières.

La mise au point du protocole a été réalisée dans le cadre du programme de recherche "ECOTOX - Rhône" soutenu par l'Agence de l'Eau **Rhône-Méditerranée-Corse**. Le protocole établi par le Comité de Pilotage du Programme, en concertation avec les laboratoires du CEMAGREF et de l'Institut Pasteur de Lyon, a été retenu pour la présente étude.

Un protocole définitif sera présenté à **l'AFNOR**, selon des modalités **à** définir par les agences, pour l'élaboration d'une norme expérimentale.

2. OBJECTIFS DE L'ETUDE

- Coordonner l'implantation des tests dans un certain nombre de laboratoires (désignés par les Agences de l'Eau) ; l'implantation comprend la mise au point de l'élevage et l'apprentissage du protocole (fourni aux laboratoires).
- Réaliser une ou plusieurs opérations d'intercalibration, par rapport à des substances de référence, entre ces laboratoires et ceux que désireraient s'y associer, jusqu'à obtention d'une dispersion acceptable.

3. CONTENU DE L'ETUDE

3.1 Implantation des tests dans plusieurs laboratoires

La liste des laboratoires participant à l'étude, **fixée** par l'agence pilote, comprend les laboratoires suivants :

- CEMAGREF - GROUPEMENT DE LYON
3 Quai **Chauveau**
69336 LYON Cedex 09

Correspondant : Madame J. GARIC - tél. : 72 20 87 39

- CENTRE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT
1 rue des **r&collets**
57040 METZ Cedex

Correspondant : Monsieur FERARD - tél. : 87 76 22 60

- INERIS
Rue Lavoisier
B.P. **N81**
91710 **VERT** LE PETIT

Correspondant : Monsieur DESCHAMPS - tél. : (1) 64 99 03 76

Les **tâches à** réaliser lors de l'implantation du test, détaillée dans le C.C.T.P. sont les suivantes :

- analyse du protocole opératoire et définition d'un protocole de suivi de la **phase**,
- visite des laboratoires avec établissement des fiches détaillées par laboratoire, et d'un échéancier de mise au point des moyens nécessaires (**rapport N°1**),
- définition de l'exécution du planning et information régulière des agences; fourniture d'un rapport intermédiaire (**rapport N°2**) en fin de phase.

3.2 Intercalibration

Durant cette partie, le chargé d'étude assurera la préparation de 8 substances de référence, conditionnées en concentré avec conservation de témoins, et la distribution de formes diluées dans les délais compatibles avec la conservation de ces solutions.

L'étiquetage des solutions sera codé (secret sur la substance, à confirmer).

Le chargé d'étude organisera la collecte et la mise en forme des résultats (base de donnée informatique selon un format unique convenu avec les laboratoires).

Une note sur la réalisation de l'essai sera fournie au comité de pilotage comportant un compte-rendu d'exécution et un tableau des données collectées (**rapport N°3**).

Par la suite, le chargé d'étude réalisera les traitements statistiques courants pour les essais d'intercalibration, et organisera une réunion des laboratoires pour examiner les résultats.

Les résultats auront été communiqués **à** l'avance aux laboratoires, ainsi qu'un commentaire portant sur la variabilité et la dispersion (interne et externe) des résultats.

Un rapport détaillé de l'essai (**rapport N°4**) sera remis au groupe de pilotage **à** l'issue de la réunion ; il comportera le cas échéant la **proposition** d'une nouvelle série d'essais, après ajustement des protocoles, en fonction des enseignements tirés de la première série.

4. AVANCEMENT DE L'ETUDE

Ce rapport présente le bilan de la phase d'implantation du test ; il correspond aux rapports intermédiaires N°1 et 2 tels que précisés dans le C.C.T.P.

Ce bilan sera évoqué en présence de l'ensemble des laboratoires et des représentants du groupe **inter-agences** durant la réunion qui se tiendra le 24 juin 1992 à l'Agence de l'Eau Seine Normandie.

4.1 Calendrier

- 17 Janvier 1992:

Notification de l'étude

- 11 Février 1992 :

Réception de la liste des laboratoires retenus pour l'étude

- 25 Février 1992 :

Transmission par l'Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse du protocole "... établi en concertation avec le CEMAGREF et l'Institut Pasteur de Lyon, sous la responsabilité de Monsieur CADRIDENC (INERIS) qui fixe les conditions de réalisation technique des épreuves sur eau du fleuve et sur rejet, effectuées dans le cadre du Programme ECOTOX RHONE ; les modalités précises d'interprétation des résultats seront définies à l'issue des analyses en cours...".

Le courrier précise en outre : "... Il y a lieu d'assurer une cohérence technique entre ce protocole et les propositions qui seront formulées au cours de l'étude..." (cf. Annexe).

A l'heure actuelle les résultats obtenus lors du programme ECOTOX RHONE n'ont pas pu nous être communiqués.

- 3 Mars 1992:

Réception de la liste définitive des 8 laboratoires participant à l'étude.

- 10 Mars 1992 :

Visite du laboratoire de l'INSTITUT PASTEUR DE LYON, entretien avec Mademoiselle **BAZIN**.