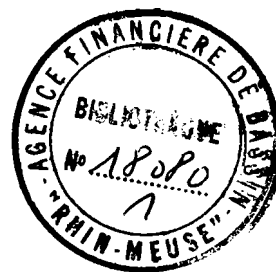


SOMMAIRE



1. INTRODUCTION	5
1.1. Cadre de l'étude	5
1.2. Objectifs de l'étude	5
1.3. Déroulement de l'étude	6
1.3.1. Mise au point du mode opératoire de l'essai	6
1.3.2. Visite et implantation de l'essai chez les laboratoires participants	6
1.3.3. Réalisation d'un logiciel de saisie	6
1.3.4. Essais inter-laboratoires	6
1.3.5. Synthèse et analyse des résultats	7
2. MISE EN PLACE DE L'ESSAI TOXIQUE CHRONIQUE SUR MICRO-CRUSTACE CERIODAPHNIA DUBIA 7 JOURS	7
2.1. Utilisation dans les essais de toxicité	7
2.2. L'essai <i>Ceriodaphnia dubia</i> 7 jours	7
2.2.1. Principe	8
2.2.2. Mode opératoire	8
2.2.3. Intérêt de l'essai	8
2.2.4. Facilité de mise en place	8
2.3. Développement de l'essai en France	9
2.3.1. Mise au point d'un mode opératoire	9
2.3.1.1. Le clone	10
2.3.1.2. Le milieu d'élevage	10
2.3.1.3. La nourriture	10
2.3.2. Implantation de l'essai	11
2.3.2.1. Laboratoires participants	11
2.3.2.2. Visite des laboratoires	11
2.3.2.3. Mise en place des élevages	11

2.3.3.	Réunion inter-laboratoires du 24 Juin 1992	12
2.3.4.	Réunion inter-laboratoires du 11 Septembre 1992	12
2.3.5.	Réalisation d'un logiciel de saisie	12
2.3.6.	Niveau de préparation des laboratoires	12
2.3.7.	Les manipulations effectuées	14
2.3.7.1.	Le matériel utilisé	14
2.3.7.2.	Préparation de l'eau E.M.D.	14
2.3.7.3.	Culture des algues	14
2.3.7.4.	Nourriture apportée	14
2.3.7.5.	Le réactif biologique	15
2.3.7.6.	Disposition aléatoire des récipients de l'essai	15
2.3.7.7.	Dénombrement des jeunes	15
2.3.7.8.	Mesures et résultats	16
2.3.8.	Déroulement des essais	16
2.3.8.1.	Préparation des dilutions	16
2.3.8.2.	Planning et concentration des substances testées	17
2.3.8.3.	Analyse chimique des substances testées	17
2.3.8.4.	Critères de réception	18
3.	ANALYSE DES RESULTATS	21
3.1.	Résultats des lots témoins	21
3.1.1.	Analyse des résultats des témoins	21
3.1.2.	Explication des variations observées	22
3.1.2.1.	Manipulation d'organismes vivants	22
3.1.2.2.	Eau de dilution	22
3.1.2.3.	Brièveté de l'essai	22
3.1.2.4.	Variations au cours des essais	23
3.1.2.5.	Expérience du laboratoire	23
3.1.2.6.	Présentation graphique de la reproduction des témoins	23
3.1.2.7.	Bilan	25
3.2.	Analyse des résultats concernant la survie	25
3.2.1.	Résultat de l'essai n°1	25
3.2.2.	Résultat de l'essai n°2	26
3.2.3.	Résultat de l'essai n°7	26

3.3.	Analyse de la reproduction	27
3.3.1.	Réponse à l'essai	27
3.3.2.	Résultats des essais inter-laboratoires: la NOEC	28
3.3.3.	Comparaison inter-laboratoires pour chaque essai	29
3.3.4.	Comparaison intra-laboratoire	30
3.3.5.	Développements statistiques souhaitables	31
3.3.6.	Choix d'une substance de référence	32
4.	BILAN	33
4.1.	Modifications envisageables du mode opératoire	33
4.2.	Réunion du 16 mars 1993	34
4.2.1.	Point de vue des laboratoires	34
4.2.2.	Développements ultérieurs	35
4.3.	Comparaisons avec d'autres expériences similaires	35
5.	CONCLUSION	37
6.	BIBLIOGRAPHIE	38
7.	ANNEXES	41
7.1.	Annexe 1: Mode opératoire de l'essai <i>Ceriodaphnia dubia</i> 7 jours	41
7.2.	Annexe 2: Présentation du logiciel de saisie des résultats	50
7.3.	Annexe 3: Préparation du milieu M4	57

1. INTRODUCTION

Pendant un an, à l'initiative des Agences de l'Eau, une expérience originale a été conduite en France: il s'agissait d'essayer de développer un nouveau test de toxicité chronique: *l'essai Ceriodaphnia dubia* à 7 jours; cet essai devra permettre en effet de mieux contrôler les rejets toxiques et la qualité des cours d'eau. **BETURE-SETAME** a été chargé de l'encadrement et du suivi de ce travail; ce rapport est l'occasion pour lui de présenter sa démarche et d'en faire le bilan.

1.1. Cadre de l'étude

Le troisième programme d'études inter-agences prévoit l'examen de tests simples pour mesurer les effets toxiques chroniques des effluents, en vue de compléter l'approche actuelle basée sur un essai de toxicité aiguë (*Daphnia magna* 24 h). Une première étude réalisée par le **CEMAGREF**¹ de Lyon à la demande des Agences, a permis de recenser les tests existants pour la mesure des effets toxiques chroniques; à l'issue de ce travail, *l'essai Ceriodaphnia dubia* 7 jours a été sélectionné par le groupe de travail inter-agences, tout en sachant bien que cet essai ne peut en aucun cas décrire à lui seul la totalité de la toxicité chronique d'un effluent et que d'autres essais restent aussi indiqués. Pour réaliser cette étude, huit laboratoires ont été choisis; leurs résultats lors de l'implantation de l'essai constituent une première approche de la faisabilité de développement de cet essai de toxicité.

1.2. Objectifs de l'étude

La mission de **BETURE-SETAME** était de développer en France *l'essai Ceriodaphnia dubia*, elle a comporté les étapes suivantes :

- Implanter dans huit laboratoires un mode opératoire déjà utilisé lors du programme de recherche "ECOTOX-Rhône". L'implantation comprend la mise en place de l'élevage des céridaphnies et l'apprentissage du mode opératoire de l'essai,
- Coordonner plusieurs essais inter-laboratoires pour les substances de référence et suivre les laboratoires jusqu'à l'obtention de résultats acceptables,
- Traiter et évaluer les résultats des essais inter-laboratoires. Faire le bilan de l'expérience.

¹Centre National du Machinisme Agricole, du Génie Rural, des Eaux et des Forêts

1.3.5. Synthèse et analyse des résultats

Une fois, tous les résultats collectés, un rapport a publié les résultats ainsi que les remarques du chargé d'études concernant le déroulement des essais; ce rapport a permis l'organisation d'une réunion inter-laboratoires finale pour faire le bilan de cette expérience. Il est à noter la très grande satisfaction des laboratoires ayant participé, satisfaction due à la rapidité d'implantation de l'essai, au respect par chacun d'un mode opératoire et d'un planning exigeant ainsi que par un bon travail en commun.

2. MISE EN PLACE DE L'ESSAI TOXIQUE CHRONIQUE SUR MICRO-CRUSTACE *CERIODAPHNIA DUBZA* 7 JOURS

Avant de préciser les étapes de l'étude, rappelons quelques caractéristiques importantes de l'essai biologique étudié.

2.1. Utilisation dans les essais de toxicité

La première publication faisant référence à un essai de toxicité sur la reproduction des cériodaphnies en 7 jours date de 1984. Il existe maintenant une bibliographie assez importante fournissant des résultats d'essais aigus et chroniques avec cette espèce. En France, un document du CEMAGREF de Lyon fait le point sur l'essai; aux Etats Unis, de précises mises au point du protocole d'essai ont été faites par l'US EPA³ (par Environnement CANADA pour le Canada).

L'essai *Ceriodaphnia dubia* 7 jours est utilisé en routine pour la mesure de la toxicité chronique des effluents dans plusieurs pays (Amérique du Nord et Scandinavie).

2.2. L'essai *Ceriodaphnia dubia* 7 jours

Cet essai est une épreuve de toxicité chronique, réalisée en milieu aqueux et en conditions **semi-statiques**, qui s'intéresse pendant sept jours à la survie et à la reproduction d'un micro-crustacé cladocère parthénogénétique, *Ceriodaphnia dubia*, face à des eaux de surface ou souterraines, effluents, lixiviats et composés chimiques en solution aqueuse.

Contrairement aux essais sur algues et poissons, cet essai ne dispose pas de protocole normalisé. Il peut être considéré comme l'homologue "accélééré" de l'essai sur la reproduction en 21 jours de *Daphnia magna*, proposé pour la mesure des effets chroniques des polluants.

²D.I. Mount, T.J. Norberg, 1984. A seven day life cycle cladoceran **toxicity** test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol 3, p 425-434.

³United States Environment Protection Agency



en routine de l'essai, l'utilisation d'appareils permettant d'automatiser certaines opérations (transvasement et lecture par exemple...); ceci pourrait permettre une diminution du coût tout en augmentant le nombre de tests pouvant être menés en parallèle par un même laboratoire. Il est intéressant de remarquer que son coût n'en reste pas moins très inférieur à celui d'une recherche chimique "exhaustive" de polluants.

2.3. Développement de l'essai en France

Reprenons les différentes étapes de l'étude.

2.3.1. Mise au point d'un mode opératoire

Comme il a déjà été précisé, il n'existe pas encore à ce jour en France de protocole normalisé pour la réalisation de l'essai biologique *Ceriodaphnia dubia* à 7 jours. Pour les besoins de cette étude, il était prévu l'application d'un mode opératoire utilisé lors d'un programme de recherche ECOTOX Rhône effectué pour le compte de l'Agence Rhône-Méditerranée-Corse: lors de ce travail le CEMAGREF de Lyon et l'Institut PASTEUR de Lyon avaient développé l'essai *Ceriodaphnia dubia* et réalisé quelques essais sur les eaux du Rhône. Le mode opératoire de ce programme nous a été communiqué, mais nous n'avons pas pu obtenir les résultats des essais déjà réalisés. Par ailleurs, ce mode opératoire n'était pas appliqué de la même manière par les deux laboratoires concernés. Il présentait, de plus, de grosses différences avec le protocole déjà appliqué en routine en Amérique du Nord. Une nouvelle rédaction du mode opératoire a donc été entreprise.

Cette nouvelle rédaction a cherché à éviter les incompréhensions liées à un manque de rigueur et de précision dans les manipulations effectuées et à éviter les sources de variation.

Un travail bibliographique a d'abord été entrepris puis le mode opératoire proposé a été décomposé en plusieurs étapes élémentaires où nous nous sommes efforcés de faire apparaître les sources de variation (travail sous forme de story board, cf. rapport des phases 1 et 2). Une visite des différents laboratoires a été effectuée, lors de laquelle ont été examinés les problèmes matériels et humains liés à l'application du mode opératoire; un questionnaire a aussi été rempli par les laboratoires précisant leur savoir faire et le matériel disponible.

Ceci a conduit à proposer un nouveau mode opératoire, dont la rédaction a été faite en accord avec le CEMAGREF de Lyon et aussi avec le CSE de Metz, à qui nous avons demandé un jugement critique. Cette nouvelle version a cherché à éliminer des erreurs de rédaction, des incompréhensions sur le matériel à utiliser (standardisation au maximum lorsque cela nous a paru être une source de variation) et sur les manipulations à effectuer. Par ailleurs, trois sources importantes de variation sont apparues en référence aux développements antérieurs d'autres essais, il s'agit :

- du clone de cériodaphnies.
- de la composition du milieu d'élevage,
- de la nourriture

2.3.2. Implantation de l'essai

Il a incombé à BETURE-SETAME de développer l'essai *Cerioduphnia dubia* 7 jours dans un certain nombre de laboratoires désignés par les Agences de l'Eau.

2.3.2.1. *Laboratoires participant*

Cinq laboratoires ont été proposés par les Agences de l'Eau :

- CEMAGREF de Lyon,
- Institut PASTEUR de Lyon,
- Institut PASTEUR de Lille,
- INERIS⁹,
- I.R.H¹⁰.

Nous y avons ajouté le CSE de Metz qui nous a fait part de nombreux conseils scientifiques. En outre, il était intéressant que se joignent à l'expérience des laboratoires liés à des industriels et souhaitant développer cet essai, ce sont :

- RPI¹¹,
- CTP¹².

2.3.2.2. *Visite des laboratoires*

Une visite en Avril 92 de tous les laboratoires participant a été effectuée par BETURE-SETAME. Cette visite a permis de présenter aux laboratoires, qui ne connaissaient pas encore l'essai, le mode opératoire et de faire le point avec les responsables du laboratoire, des manipulations nécessaires au déroulement de l'essai, ainsi que de discuter du matériel indispensable.

2.3.2.3. *Mise en place des élevages*

Sans être difficile, l'élevage de cériodaphnies peut être un peu délicat, nous avons alors demandé aux laboratoires de mettre au point leur élevage avant la fin Juin 92. Il s'agissait pour eux d'acquérir la souche, d'apprendre à manipuler les cériodaphnies et de réaliser l'élevage dans des conditions qui permettent une correcte reproduction des cériodaphnies, en l'absence de mortalité excessive.

Il faut préciser l'importance de l'environnement pour un tel élevage. En effet certains **contaminants** (solvants, lessives) peuvent perturber, voir détruire les organismes. Face à des difficultés lors de la mise en place des élevages, une réunion inter-laboratoires a été organisée le 24 Juin 92. Il est intéressant à préciser que l'Institut PASTEUR de Lille a pu mettre en place avec succès son élevage en seulement 3 semaines avant le début du premier essai inter-laboratoires.

⁹Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

¹⁰Institut de Recherches Hydrologiques

¹¹ Rhône Poulenc Industrialisation (Décines)

¹²Centre Technique du Papier (Grenoble)

FIG 1: ORGANISATION DES LABORATOIRES

	Début des essais	Personnel responsable	Local d'élevage
LABORATOIRES			
CEMAGREF Lyon	1988	Mme GARRIC, chef de laboratoire M. VOLLAT, technicien	Armoire thermostatique
PASTEUR Lyon	1989	Melle BAZIN, chef de laboratoire Plusieurs techniciens	Armoire thermostatique
I.R.H. Nancy	Avril 92	Mme JOURDAIN, chef de laboratoire	Pièce thermostatique
C.S.E. Metz	1988	M. FERARD, chef de laboratoire, Un étudiant de DEA	Armoire thermostatique
PASTEUR Lille	Sept 92	Mme OGER, chef de laboratoire M. DELOBEL, technicien	Pièce thermostatique
I.N.E.R.I.S	Avril 92	M. DESCHAMPS, chef de laboratoire, Melle HALGAND, technicienne	Pièce thermostatique
R.P.I.	Avril 92	Mme DION, chef de laboratoire Plusieurs techniciens	Pièce thermostatique
C.T.P.	Juin 92	M. LENON, chef de laboratoire Mme DESCHAMPS, technicienne	Phytotron

Il faut signaler quelques difficultés:

L'INERIS a eu de mauvaises reproductions des céridaphnies mises en élevage. Les résultats obtenus sont inexploitable car ils traduisent le plus souvent des incohérences. Il faudrait revoir toutes les manipulations et repartir sur de bonnes bases lors de la mise en place d'un nouveau milieu d'élevage par exemple.

Pour le CTP, l'élevage n'a pas fonctionné jusqu'à la fin Décembre 1992 en respectant les conditions des essais inter-laboratoires; il semble que le milieu EMD ait posé de gros problèmes (l'eau de type ultra-pure semble être de trop bonne qualité à cause de l'eau déjà très pure qui est distribuée à Grenoble). Le CTP est alors allé se former au CANADA, l'utilisation du protocole d'Environnement Canada (avec notamment une eau de source utilisée comme milieu d'élevage) leur a permis d'obtenir d'excellents résultats, ce qui prouve la bonne acquisition des manipulations liées à cet essai. Les résultats obtenus par le CTP sont communiqués par la suite à titre d'information; il faudra toutefois éviter une comparaison directe des différents résultats.

Pour tous les laboratoires l'utilisation de l'eau EMD a le plus souvent entraînée des complications, elles ont été réellement manifestes pour le CSE, l'Institut PASTEUR de Lyon, le CEMAGREF et bien sûr le CTP.

2.3.7.5. *Le réactif biologique*

De bonnes et régulières conditions d'élevage sont nécessaires pour assurer une reproduction uniquement par parthénogenèse et éviter ainsi la production de mâles. Afin de permettre d'avoir la même "parenté" pour les différentes concentrations testées, il est indispensable de sélectionner des mères ayant pondu huit petits; de plus cette condition est une assurance de qualité permettant de vérifier si l'élevage intermédiaire se déroule bien; le nombre de mères à prévoir pour vérifier cette condition reste à l'appréciation du laboratoire, il ne devrait pas dépasser 60 (un dépassement de cette valeur ne peut que signifier de très grosses difficultés dans la conduite de l'élevage). En tout cas, le respect du mode opératoire exige le respect de cette condition (pas toujours vérifiée durant cette expérience).

Le démarrage de l'élevage intermédiaire se fait de plusieurs manières. La méthode consistant à reformer un clone à partir d'une cériodaphnie a été utilisée plusieurs fois par quelques laboratoires et a, semble-t-il, donné satisfaction. Pour certains l'élevage intermédiaire est conduit en récipient individuel, ce qui permet de bien suivre les mères fournissant le réactif biologique. Cette méthode est à préconiser car elle permet d'effectuer rapidement les mêmes manipulations que pour le dénombrement journalier des jeunes; les âges des mères sont bien connus ainsi que leur descendance. Cette méthode pourrait à l'avenir permettre une sélection plus stricte des mères (plus de 15 jeunes par semaine par exemple).

2.3.7.6. *Disposition aléatoire des récipients de l'essai*

Pour éviter qu'un lot entier (c'est à dire une concentration du toxique testé) ne soit exposé pendant une semaine à des conditions environnementales différentes, il avait été proposé lors de la réunion du 11 Septembre 1992, une permutation aléatoire (mais fixe dans le temps) des lots chaque jour. Certains laboratoires ont trouvé cette disposition contraignante et ne l'ont pas effectué, il semble pourtant qu'un minimum d'organisation permette au laboratoire de faire cette manipulation simplement répétitive (ce qui a été le cas pour plus d'un laboratoire sur deux). Au vu des résultats, il n'est pas possible de différencier les résultats entre les différents laboratoires et de mieux préciser l'importance de cette manipulation.

2.3.7.7. *Dénombrement des jeunes*

Les différentes méthodes de dénombrement selon les laboratoires sont nombreuses, la difficulté réside dans la petite taille des cériodaphnies. Il ne semble pas y avoir eu d'erreur ! Le dénombrement se faisant bien si les manipulations sont réalisées avec sérieux; l'expérience permet d'acquérir une bonne dextérité et il est possible d'apprécier la vitalité des organismes d'un simple coup d'oeil.

2.3.8.2. *Planning et concentration des substances testées*

Les concentrations indiquées dans le tableau suivant sont les concentrations auxquelles les cériodaphnies ont été réellement soumises (entre parenthèses figure la concentration de la solution stock fournie).

FIG2: CONCENTRATIONSTESTEESLORSDESSEPTESSAIS .

Substance de réf.	Essai N°(µg/l)	Concentration (en µg/l)				
Dichromate de potassium	1 (12000 en Cr) 9 au 16.10.92'	600	200	66	22	7,4
	4 (2000 en Cr) 11 au 18.12.92	90	45	22	11	5,6
Chlorure de Nickel	2 (2600 en Ni) 13 au 20.11.92	117	35	11	3,2	1
	5 (50 en Ni) 8 au 15.1.93	2,2	1,1	0,5	0,2	0,1
3,4 Dichloroaniline	3 (600) 27.11 au 4.12.92	27	8	2,5	0,8	0,25
	6 (900) 22 au 29.1.93	40	20	10	5	2,5
. Carbofuran	7 (100) 29.1 au 5.2.93	4,5	2,2	1,1	0,6	0,3

Pour les trois premiers essais, une raison de trois a été demandée entre les différentes concentrations testées, pour les suivants une raison de deux a été utilisée. Pour le dernier essai un pré-test a été effectué par le C.S.E. permettant de mieux apprécier la toxicité du carbofuran.

 2.3.8.3. *Analyse chimique des substances testées*

Les solutions envoyées ont été vérifiées par GUIGUES SA.. La deuxième solution n'a pas été préparée selon la concentration souhaitée (2,6 mg/l de Cr au lieu de 0,5 mg/l).

A. Manipulations aux dates prévues

A l'avenir, manipuler aux bonnes dates permettra d'effectuer l'essai dès réception des échantillons prélevés, d'avoir les résultats des essais rapidement, mais surtout la satisfaction de ce critère par le laboratoire permet aussi d'apprécier la qualité de l'élevage des céridaphnies.

FIG 3: ESSAIS EFFECTUES AUX DATES PREVUES.

LABORATOIRES	ESSAIS						
	1	2	3	4	5	6	7
CEMAGREF Lyon	oui	non	-	oui	oui	oui	oui
PASTEUR Lyon	oui	oui	oui	non	non	non	non
I.R.H Nancy	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
C.S.E. Metz	oui	non	non	non	non	non	non
PASTEUR Lille	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
I.N.E.R.I.S	oui		oui	oui	oui	oui	oui
R.P.I.	non	oui	oui			oui	
C.T.P.	non			non	non		

*Oui (non) si essai effectué (ou pas) aux dates prévues.
- si essai non effectué*

Globalement les huit laboratoires ont été prêts pour le premier essai, ce qui montre la bonne préparation des laboratoires. Par la suite des retards ont été pris pour les laboratoires ne passant pas les critères de validité, ce qui les a obligé à refaire certains essais ou à mettre mieux au point leurs manipulations, c'est le cas du C.T.P., mais aussi de l'Institut PASTEUR de Lyon entre autre. M. Ferard du C.S.E. nous avait précisé dès le début qu'il ne pourrait pas respecter les dates du planning. Les résultats seront considérés, par la suite validés, en l'absence de ce critère; environ deux tiers des laboratoires ont cependant passé avec succès ce premier critère.

3. ANALYSE DES RESULTATS

Dans un premier temps, étudions les résultats obtenus sur les témoins. Une bonne régularité de ces résultats est indispensable pour valider l'essai et montrer que l'élevage est au point. Seront ensuite présentés les résultats proprement dit (survie et reproduction).

3.1. Résultats des lots témoins

Le critère de 80 % de survie des lots témoins ayant toujours été satisfait lorsque le nombre moyen de petits par mère survivante est supérieur à 15, nous présentons uniquement les résultats concernant la reproduction. Le critère sur la survie n'en reste pas moins important car il informe du soin apporté aux manipulations.

Nous précisons pour chaque laboratoire et pour un essai, le nombre moyen de petits par mère ainsi que l'écart type correspondant.

3.1.1. Analyse des résultats des témoins

Dans le tableau suivant, on constate des variations importantes du nombre moyen de jeunes produits par mère. Malgré ces variations, la barre des quinze petits est la plus souvent atteinte. Les résultats, ici présentés, sont ceux utilisés pour le traitement statistique, ils ne sont alors pas directement explicites pour la validation du troisième critère (ce sont des pontes des moyennes mères vivantes ou pas qui sont données).

FIG 5: REPRODUCTION DES TEMOINS POUR LES SEPT ESSAIS INTER-LABORATOIRES
(Moyenne et Ecart Type)

LABORATOIRES	ESSAIS														Moy
	1		2		3		4		5		6		7		
	Moy	E Type	Moy	E Type	Moy	E Type	Moy	E Type	Moy	E Type	Moy	E Type	Moy	E Type	Moy
CEMAGREF Lyon	23.7	3.8	22.3	8.1	30.1	-	40.5	5.4	31.5	6.7	34.8	3.4	32.7	2.4	30.90
I. PASTEUR Lyon	33	7.9	33.4	5.9	(12.9)	5.3	19.4	2.9	16.6	5.2	16.5	4.47	22.3	4.8	24.40
I.R.H Nancy	(10,9)	(5,8)	14.1	1.4		(7,0)	14.8	5.3	17.9	6.6	19.1	7.1	18.1	6.5	17.00
C.S.E Metz	19.3	6	(7,8)	(3,2)	16	2.8	(10,9)	(7,5)	(13,6)	(2,6)	(14,8)	(5,7)	(13,8)	(8,7)	17.60
I. PASTEUR Lille	15.2	5.8	18.2	6.2	18.8	8.1	16.9	7.6	(12,6)	(5,7)	17.1	6.1	18.2	3.5	17.40
I.N.E.R.I.S.	(10,4)	(5,5)	-	-	20.4	13.1					-	-	-	-	
R.P.I.	18.7	9	22.9	11.8	(13,3)	(7,7)					19	5.5	-	-	20.20
C.T.P.	(4,7)	(3,4)					21.6 *	5.3 *	22.3 *	5.6 *					22 *

O résultats non validés _ essai non effectué * mode opératoire différent

En l'absence d'une grande régularité entre les laboratoires, les résultats au sein d'un laboratoire sont plus stables: le calcul de la moyenne des nombres moyens de petits obtenus pour chaque essai montre que les variations diminuent (n'ont pas été pris en compte pour les calculs les résultats non validables ce qui minore parfois le nombre d'essais pris en compte). Les essais sont alors bien reproductibles.

3.1.2.4. Variations au cours des essais

On constate une meilleure reproductibilité de l'essai au sein d'un laboratoire que sur l'ensemble des laboratoires, même si sont aussi parfois observées des variations brutales au sein d'un même laboratoire, ces variations sont le plus souvent dues à des difficultés dans l'élevage. La résolution d'une difficulté entraîne un nouveau point de départ pour le laboratoire, d'où des variations dans les résultats des témoins.

3.1.2.5. Expérience du laboratoire

Il a été souvent fait allusion à la nécessité d'une longue phase d'adaptation de l'essai; le terme "expérience" permet d'englober toutes les différences entre laboratoires qui sont non appréciables, "le laboratoire développant l'essai est petit à petit orienté vers les manipulations les plus optimales"; ainsi, l'Institut PASTEUR de Lyon et le CEMAGREF ont de fortes valeurs de reproduction.

3.1.2.6. Présentation graphique de la reproduction des témoins

Pour quatre laboratoires, ayant suffisamment de résultats: le CEMAGREF de Lyon, l'I.R.H. de Nancy, l'Institut PASTEUR de Lille et l'Institut PASTEUR de Lyon a été effectué un traitement statistique avec le logiciel STATGRAPHICS. Ce traitement statistique permet de visualiser la dispersion des résultats: des boîtes à encoches sont dessinées pour chaque essai (1,2,..7), elles représentent autour de la médiane (valeur située au milieu des résultats) les valeurs comprises entre les deux quartiles 25 et 75% (ou inter quartile), ainsi la moitié des résultats est présentée à l'intérieur de la boîte dessinée. **Par ailleurs**, l'extrémité des encoches (ou des cornes) caractérise l'intervalle à 95% (d'une distribution fictive selon la loi normale autour de la médiane). Les valeurs extrêmes ou les individus aberrants sont représentés sous forme de points individuels. Une telle représentation permet d'apprécier "d'un simple coup d'oeil" des informations à la fois sur les valeurs et sur la dispersion de la distribution.

En effet, les boîtes dessinées ont une aire, qui est liée à la dispersion des valeurs (de ponte) obtenues pour chaque essai (les individus ayant des valeurs extrêmes, voire aberrantes ne sont pas pris en compte), de plus la position de la médiane informe sur une disposition symétrique ou non de part et d'autre de la médiane. La représentation de l'intervalle à 95% nous montre en plus, si la prise en considération de seulement la moitié des valeurs est pertinente; c'est dans l'ensemble le cas puisque les boîtes et les cornes sont de taille voisine. En groupant les sept essais sur un même dessin, une telle présentation permet directement une comparaison intra-laboratoire avec définition d'un profil de résultats. Des résultats significativement différents pour un essai ou un laboratoire apparaîtront alors facilement. Ce type de représentation est lié à l'utilisation de la médiane et des quartiles pour caractériser une série **statistique**; c'est un traitement statistique simple, qui fait souvent ses preuves, car **il évite** de mettre en évidence des différences peu explicites par la prise en compte de résultats extrêmes. Dans notre cas, les profils qui sont visualisés peuvent être directement interprétés.



assez variable, mais les résultats représentés sont néanmoins presque toujours compris dans l'intervalle de confiance à 95%.

Pour l'Institut PASTEUR de Lille, on observe des distributions assez différentes d'essais en essais, où par exemple pour l'essai 2, les résultats sont très regroupés avec deux individus aberrants à 3 et à 28. Par ailleurs, observons que les résultats ne sont pas toujours répartis symétriquement de part et d'autre de la médiane, on a alors quelques individus ayant des valeurs assez éloignées de la médiane.

3.1.2.7. Bilan

La barre des quinze petits obtenus par mère en moyenne est à maintenir; quelques modifications du mode opératoire devraient limiter les variations, mais les résultats montrent surtout clairement l'importance du lot témoin qui va servir de référence lors du traitement des résultats et permettre ainsi des comparaisons inter-laboratoires.

3.2. Analyse des résultats concernant la survie

L'essai *Cerioduphnia dubia* sept jours s'intéresse essentiellement à la reproduction des organismes; accessoirement, lorsqu'il y a des mortalités pour une concentration, on a des résultats sur la survie des cériodaphnies. Dans notre cas, seuls les deux premiers essais et le dernier présentent des mortalités. Pour ces essais, calculons les NOEC¹⁷, LOEC¹⁸ concernant la survie.

Ce que l'on peut noter: La survie des cériodaphnies est bien moins importante pour les produits testés que celle de *Daphnia magna*; ainsi par exemple BIESINGER avait proposé une **safe** concentration pour la reproduction des daphnies de 30 µg/l, nos résultats font ressortir une valeur environ dix fois plus faible. Cet essai se révèle très sensible, c'est peut être aussi le milieu testé avec l'eau EMD qui fragilise encore plus les organismes.

3.2.1. Résultat de l'essai n°1

La substance testée est le dichromate de potassium, son action est très bien connue chez les végétaux et il sert de référence pour les essais biologiques effectués sur algues. Pour cet essai, les deux premières concentrations testées ont entraîné une mortalité quasi complète des mères à sept jours.

Les résultats sont les mêmes pour tous les laboratoires, on trouve alors une concentration en dichromate de potassium de 22,2 µg/l sans effet pour la survie des cériodaphnies.

¹⁷No Observed Effect Concentration

¹⁸Lowest Observed Effect Concentration

3.3. Analyse de la reproduction

Les résultats ont été saisis par les laboratoires à l'aide du logiciel CERIO et ils ont été envoyés après chaque essai (sous forme de fichiers dBase). Certains laboratoires n'ont pas pu implanter le logiciel de saisie ou n'ont pas voulu se charger de la saisie; la saisie des données a, dans ce cas, été faite directement par BETURE-SETAME pour permettre le traitement.

Dans le rapport d'annexes¹⁹, sont présentés les résultats obtenus pour les sept essais par les laboratoires, les résultats de deux traitements statistiques y sont aussi joints.

3.3.1. Réponse à l'essai

Les résultats bruts obtenus qui comportent la survie des cériodaphnies mères et le nombre de jeunes pondus par jour ne sont pas directement exploitables. En effet, ils sont fournis de manière individuelle et surtout leur valeur intrinsèque n'a pas de signification car elle dépend des manipulations, des cériodaphnies utilisées et de nombreux facteurs externes.

Le premier traitement statistique de base à effectuer est le calcul des moyennes et des **variances** par lot, ce qui donne une idée des distributions; cela permet aussi de vérifier les conditions à respecter pour le témoin.

Ensuite, il est intéressant d'étudier pour chaque concentration testée les différences par rapport au lot témoin (ce qui va permettre une comparaison inter-laboratoire), il est nécessaire pour cela d'utiliser un traitement statistique pour apprécier si les différences sont réellement significatives. Pour cela, nous avons utilisé un logiciel diffusé par l'US EPA, dans lequel différents traitements statistiques sont proposés; chaque traitement se base sur l'étude des distributions et donne des résultats plus ou moins intéressants selon les données disponibles. Les données prises en compte pour effectuer le test sont les résultats de reproduction des cériodaphnies durant l'essai, que celles-ci soient vivantes ou pas en fin d'essai (c'est la méthode préconisée par l'US EPA). Dans le rapport d'annexe, les résultats de deux tests statistiques proposés par l'US EPA sont donnés. Ces traitements font ressortir les concentrations testées qui diffèrent du témoin. Cela permet de déterminer une concentration sans effet pour la reproduction des cériodaphnies (NOEC ou concentration la plus forte qui n'a pas entraîné de différences avec le témoin). On parle aussi de LOEC, c'est la plus petite concentration ayant eu un effet, elle est le double ou le triple de la NOEC selon la raison de dilution utilisée dans ces essais.

La comparaison des résultats des deux tests de l'US EPA fait apparaître des différences de réponses; en effet ces deux tests ne sont pas basés sur les mêmes hypothèses: par exemple le test de **William's**²⁰ que nous avons appliqué en premier s'intéresse aux effets dus à l'augmentation de la concentration en toxiques, ce qui n'est pas le cas pour le test de "**Steel's Many - One Rank**"²¹, qui se contente d'une

¹⁹Ce rapport rassemble la correspondance entre BETURE-SETAME et les laboratoires, ainsi que toutes les données fournies à chaque essai, avec deux traitements statistiques.

²⁰Ce test paramétrique est proche du test mis au point par **Dunnett**; il est considéré comme puissant, mais nécessite des conditions d'applications assez strictes. Pour plus de précisions voir le document fourni par l'US EPA.

²¹Ce test non paramétrique permet une comparaison deux à deux de chaque concentration avec le témoin (cf. test de **Dunnett's**); il peut s'utiliser même en l'absence d'une loi normale, contrairement au test de **Dunnett's**. Il nécessite des

3.3.3. Comparaison inter-laboratoires pour chaque essai

Les résultats obtenus sont similaires pour tous les laboratoires (il n'est pas possible de comparer les résultats, présentés entre parenthèses, obtenus en l'absence d'une reproduction satisfaisante du lot témoin). Les résultats sont acceptables car d'un laboratoire à l'autre ils ne diffèrent pas plus d'une dilution (à l'exception des essais effectués avec le dichromate de potassium, cf. commentaires qui suivent). Dans une application de routine ces petites différences seront prises en compte dans la marge de sécurité qui sera donnée.

Les résultats du C.T.P. validés sont comparables aux résultats des autres laboratoires (cf. suite), le seuil de toxicité semble un peu plus **élevé**²².

Essai n°1

L'essai évaluait les effets du dichromate de potassium. La plus petite concentration testée est sans effet sur la reproduction pour tous les laboratoires. A l'exception de l'Institut Pasteur de Lille qui obtient une forte valeur de NOEC, les autres résultats sont bien comparables: une seule concentration d'écart.

Essai n°2

La substance testée est le chlorure de nickel; trois laboratoires ont mis en évidence des effets sur la reproduction pour la plus petite concentration testée, mais les résultats sont néanmoins groupés. Des précisions ont été obtenues lors du deuxième essai avec le chlorure de nickel,

Essai n°3 --

Cet essai portait sur une substance organique, la **3,4 dichloroaniline**. Les trois résultats obtenus vont de la deuxième concentration à la cinquième. Le résultat est décevant.

Essai n°4

Nous testons pour la deuxième fois le dichromate de potassium avec cette fois-ci une dilution de seulement deux entre les différentes concentrations testées. Les résultats obtenus sont variables (on a en effet un étalement de la plus forte concentration à la plus faible), l'explication se trouve plus dans le produit testé dont les effets ne semblent pas bien visibles sur la reproduction des cériodaphnies (chevauchement d'effets entre la mortalité et la reproduction) car son mode d'action est sûrement beaucoup lié à l'alimentation. Par **ailleurs** les tests utilisés sont trop sensibles et peuvent faire ressortir des résultats contradictoires pour un même laboratoire. Néanmoins la réponse fournie pour l'Institut PASTEUR de Lille pour cet essai semble aberrante et contradictoire avec les autres résultats. Ce deuxième essai n'a pas permis de gagner en précision sur les effets du dichromate de potassium sur les cériodaphnies.

²²L'explication se trouve peut-être dans le milieu de culture plus complet qui a été utilisé et qui fragilise ainsi moins les cériodaphnies.

par le même laboratoire. Certains laboratoires font apparaître des résultats plus ou moins orientés, ainsi l'Institut PASTEUR de Lyon donne souvent comme réponse (NOEC) la plus petite valeur de tous les laboratoires, par contre l'Institut PASTEUR de Lille ou le CEMAGREF ont tendance à donner des valeurs se trouvant dans le haut de la fourchette: des différences de manipulations inter-laboratoires peuvent être à l'origine de cette constatation.

3.3.5. Développements statistiques souhaitables

Le mode opératoire actuel ne comporte pas encore de méthode statistique permettant le traitement des données obtenues lors du déroulement d'un essai; or ce traitement est indispensable pour fournir une réponse à l'essai, car le nombre de données obtenues est trop important pour permettre une appréciation directe.

Les essais nous montrent l'importance de la gamme de concentrations utilisées. En effet, une raison de dilution trop grande donne une très petite précision sur les concentrations sans effet et avec une gamme plus resserrée, on peut très facilement se trouver en dehors de la zone de transition entre les concentrations entraînant un effet sur la reproduction et celles sans effet, ce qui empêche la détermination précise de la NOEC.

De nombreux traitements des données peuvent être envisagés; le plus simple serait d'utiliser un logiciel de traitement déjà disponible comme STATGRAPHICS (exemple des boîtes à encoches) ou du logiciel de l'USEPA. Néanmoins lors d'un développement ultérieur! il faut essayer de s'affranchir des incertitudes liées à l'utilisation de la NOEC; on peut proposer le calcul de concentration inhibitrice avec des méthodes d'interpolation: on cherche à calculer la concentration qui abaisse de 25% ou de 50% la reproduction du témoin, il faudra mettre au point la méthode informatique.-de détermination (citons par exemple l'utilisation de l'équation de Hills pour l'interpolation); cette méthode présente de nombreux avantages: on augmente la précision sur les résultats et on limite l'influence de la gamme de concentration choisie (ce qui, dans une application de routine, permettra de simplifier les manipulations). Citons aussi le taux intrinsèque d'accroissement ou RM^{23} qui présente l'avantage de croiser les informations de la survie et de la reproduction. De tels logiciels ne sont pas à notre connaissance disponibles actuellement.

Les résultats pour cet essai sont à préciser; la méthode statistique recherchée devra à la fois être juste et précise (prise en compte d'un maximum d'éléments), mais aussi **suffisamment** "robuste" pour éviter des écarts importants lors de la moindre variation. Par ailleurs, le traitement devra pouvoir être réalisé grâce à l'informatique car le nombre de données à traiter est grand (600 à chaque essai). Pour terminer le choix du traitement statistique devra être adapté à l'utilisation envisagée de l'essai biologique; il conditionne entièrement la réponse fournie par cet essai.

²³BETURE-SETAME, rapport des phases 1 et 2.

4. BILAN

4.1. Modifications envisageables du mode opératoire

Le mode opératoire a été appliqué par tous, sa réalisation ne semble pas poser de problèmes particuliers. Il est certain que ce test est long et comprend de nombreuses manipulations très répétitives, qu'il ne semble pas encore possible d'automatiser.

La première modification que l'on pourrait proposer concerne l'eau de dilution pour la fabrication des milieux. Il faut trouver une eau de dilution qui donne satisfaction pour l'essai, ce qui implique que les laboratoires doivent expérimenter une nouvelle solution pour garder la standardisation actuelle; on pourrait s'orienter vers l'utilisation d'un cocktail d'eaux minérales non gazeuses.

Deuxième proposition: une plus grande unité pourrait être recherchée entre l'élevage intermédiaire et l'essai proprement dit: même environnement, même quantité de nourriture apportée avec la même périodicité pour permettre une utilisation plus facile en routine. Il est proposé une reformulation du paragraphe concerné comme suit:

SERVANT D'INTERMEDIAIRE ENTRE L'ELEVAGE DE MASSE ET LE TEST PROPREMENT DIT, IL SERAIT PREFERABLE QUE LES CONDITIONS DE L'ELEVAGE INTERMEDIAIRE SE RAPPROCHENT LE PLUS POSSIBLE DES CONDITIONS DE L'ESSAI LUI MEME, QUOI QU'IL EN SOIT, L'ELEVAGE INTERMEDIAIRE SE DERoule DANS LES CONDITIONS GENERALES DE L'ESSAI DEFINIES AU CHAPITRE 3.

PRENDRE QUELQUES JUVENILES DE MOINS DE 48 HEURES ET LES PLACER (INDIVIDUELLEMENT OU EN GROUPE) DANS UN RECIPIENT CONTENANT DU MILIEU DE CROISSANCE -- A RAISON D'AU MOINS 40 ML PAR CERIODAPHNIES. LE MILIEU EST RENOUELLE AU MOINS TROIS FOIS PAR SEMAINE ET A CETTE OCCASION LES JEUNES SONT SEPARÉS DES MÈRES.

IL FAUT NOTER LES DATES DE DÉMARRAGE DE SÉLEVAGES POUR CONNAÎTRE LE PLUS PRÉCISEMENT POSSIBLE L'ÂGE DES ORGANISMES.

Troisième proposition: pour permettre un ajustement du mode opératoire lors d'une utilisation en routine, il faudrait préciser un pré-test pour tester des eaux de surface ou des effluents.

Quatrième proposition: la condition de fin d'essai peut être formulée de la façon suivante :

RENOUELE LE MILIEU POUR LE LOT TEMOIN ET EN EXAMINER LA DESCENDANCE, DANS LE CAS OÙ LES CRITÈRES DE VALIDITÉ NE SONT PAS SATISFAITS, PROCÉDER A UN RENOUELEMENT DU MILIEU POUR LES AUTRES LOTS ET PROLONGER L'ESSAI D'AU PLUS 18H.

A R.P.I., Madame DION souligne la durée importante de l'essai, qui nécessite d'importants moyens humains.

Pour le C.T.P., de bons résultats ont été obtenus avec un autre protocole, ce qui fait dire à M. LENON que le mode opératoire actuel doit être revu.

4.2.2. Développements ultérieurs

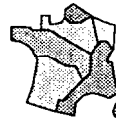
Les principaux points du développement de l'essai ont été repris un à un; la synthèse en a été faite en deuxième partie de ce rapport. Une longue discussion a eu lieu au sujet du milieu d'élevage. Tous les laboratoires sont d'accords pour le changer, mais il n'a pas été possible de faire dès maintenant une proposition pour un nouveau milieu, car il est indispensable de faire d'abord des essais. Les laboratoires souhaitent que le mode opératoire actuel soit maintenu en attendant de nouveaux développements, il a en effet déjà permis l'obtention de résultats intéressants. Le niveau de standardisation atteint entre tous est élevé, il semble même qu'à l'avenir une plus grande souplesse puisse être acceptée.

Les laboratoires ont tenu à souligner le bon déroulement des essais. Tous ont essayé de travailler dans de bonnes conditions; de fructueux échanges ont eu lieu entre les laboratoires pendant cette expérience, ce qui n'est pas toujours facile. En plus les résultats obtenus, très rapidement, sont remarquables: les résultats des témoins et ceux concernant la mortalité sont bien comparables (cela permet d'affirmer que l'on a déjà acquis le niveau de reproductibilité de l'essai *Daphnia magna* 24 heures); les résultats sur la reproduction sont aussi encourageants. Il est alors possible d'envisager le passage à des essais sur effluents.

4.3. **Comparaisons avec d'autres expériences similaires**

Les résultats présentés ici sont les premiers obtenus en France pour la majorité des laboratoires participants, ils sont le plus souvent validés. Pour pouvoir apprécier l'intérêt des résultats obtenus lors de cette expérience, il est bon de se référer à d'autres expériences similaires qui ont déjà eu lieu.

Dans un premier temps, prenons l'exemple du développement de l'essai chronique *Daphnia magna* à 21 jours; des recherches ont été entreprises depuis longtemps avec *Daphnia magna*, elles ont déjà abouti à un protocole normalisé pour un essai biologique de toxicité aiguë à 24h qui est utilisé en routine par les Agences de l'Eau pour l'appréciation de la toxicité aiguë des effluents. Ainsi une bonne connaissance de l'élevage des daphnies a été obtenue, néanmoins la tentative de normalisation à l'échelle européenne actuellement en cours a pris beaucoup de temps et n'a pas permis d'obtenir des résultats plus satisfaisants que ceux présentés, au dire des laboratoires participants aux deux développements.



5. CONCLUSION

Les sept essais qui viennent de se dérouler ont permis un intéressant travail en commun, c'est la première fois qu'une telle expérience avait lieu en France. Les résultats des essais ne font pas ressortir d'incohérences manifestes. Néanmoins avant d'envisager un développement en routine divers points sont à améliorer :

- quelques modifications du mode opératoire doivent avoir lieu,
- un traitement statistique des résultats doit être mis au point avec un logiciel permettant son application.

Pour permettre ces améliorations, il semble nécessaire de continuer une phase de recherche-développement permettant de préciser les modifications à effectuer. Lors de cette phase, il serait intéressant de commencer quelques essais sur des effluents; en effet, on peut considérer que les essais sur substances pures sont satisfaisants.

Par ailleurs, cette phase permettra l'acquisition de résultats plus nombreux, ce qui implique aussi la mise au point d'une banque de données et surtout sa gestion. Les résultats contenus dans cette base seront indispensables à la prise de décision lors d'un développement en routine de l'essai.

Il nous faut aussi remarquer l'intérêt et la très grande motivation des laboratoires quant au développement de cet essai; nous tenons à les remercier pour leur travail et leur coopération.

- B.P Elendt 1990** Influence of water composition on the chronic toxicity of 3,4 dichloroaniline to *Daphnia magna*.
Wat Res Vol 24 No 9 pp 1169-1 172.
- EPA 1989** Short-term Method for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.
EPA/600/4-89/001 Second edition March 1989
- EPA 1989** Culturing of *Ceriodaphnia dubia*. Supplemental report for video training tape
US EPA, WASHINGTON EPA/505/8-89/002a.
- EPRI 1989** Precision of the EPA seven-day *Ceriodaphnia dubia* survival and reproduction test. Intra and interlaboratory study.
EPRI EN-6469 Project 2368-2 Final Report Nov 1989
- J Garric 1992** Essais biologiques pour l'évaluation de la toxicité chronique des rejets.
Laboratoire d'écotoxicologie du CEMAGREF Lyon.
- W. Geller 1981** The filtration apparatus of cladocera filter mesh sizes and their implications on food selectivity.
Oecologia (Berl.) 49 (3) pp 316-321
- Knight 1992** Influence of the addition of cerophyl (R) on the *Selenastrum capricornutum* diet of the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*
Environmental Toxicology and Chemistry vol 11 pp 521-534
- L.A Kszos 1991** Effort allocation analysis of the seven-day Fathead Minnow and *Ceriodaphnia dubia* toxicity test.
Environmental Toxicology and Chemistry Vol 10 pp 67-72
- L.A Kszos 1992** An evaluation of Nickel toxicity to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna* in a contaminated stream and in laboratory tests
Environmental Toxicology and Chemistry vol 11 pp 1001 - 1012
- R. Kühn 1989** Result of the harmful effects of water pollutants to *Daphnia magna* in the 21 days reproduction test.
Water Research Vol 23 No 4 pp 501-5 10

7. ANNEXES

7.1. Annexe 1: Mode opératoire de l'essai *Ceriodaphnia dubia* 7 jours - version du 17.09.92.

Avertissement:

Ce mode opératoire a permis la réalisation d'essais inter-laboratoires. Ce n'est en aucun cas une version sujette à la normalisation; celle-ci se fera lors d'une étape ultérieure lorsque les connaissances de cet essai seront plus approfondies.

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Cet essai est une épreuve de toxicité chronique, réalisée en milieu aqueux et en conditions semi-statiques, qui s'intéresse pendant sept jours à la survie et à la reproduction d'un crustacé cladocère parthénogénétique, *Ceriodaphnia dubia*, face à des eaux de surface ou souterraines, effluents, lixiviats et composés chimiques en solution aqueuse.

II. PRINCIPE

De jeunes cériodaphnies, dont l'âge est compris entre 6 et 24 heures lors de la mise en route de l'essai, sont exposées à plusieurs concentrations de l'échantillon examiné, pendant une période de sept jours correspondant en principe à l'obtention d'au moins trois pontes chez les animaux témoins. A chaque renouvellement du milieu, on note la mortalité des mères et le nombre de juvéniles.

III. ENVIRONNEMENT DE L'ESSAI

La préparation et la conservation des solutions, l'élevage des cériodaphnies ainsi que l'ensemble des manipulations et des essais doivent être réalisés dans un local dont l'atmosphère est exempte de poussières et de vapeurs toxiques.

L'élevage intermédiaire et les essais doivent être réalisés à la température de 25°C \pm 2°C et éclairés avec une lumière type du jour d'une intensité comprise entre 300 et 500 lux²⁶, avec une alternance de 16 heures de jour et de 8 heures de nuit.

²⁶La mesure sera effectuée avec un collecteur 2Π au niveau de la base des récipients

- Algues : les algues proviennent de cultures aérées, en phase exponentielle de croissance, régulièrement repiquées, obtenues en conditions de stérilité suffisante. Les espèces utilisées sont:

- *Chlorella vulgaris* (211 - 11 b) et
- *Selenastrum capricornutum* (278 - 4), qui sont cultivées dans le milieu LC (AFNOR T 90 - 304).

Les cultures d'algues sont sédimentées à + 4°C (si nécessaire elles peuvent être centrifugées à petite vitesse, environ 1500 g pendant 15 mm). Les culots sont remis en suspension dans le milieu EMD, et les algues sont dénombrées (par exemple avec une cellule de Malassez). On peut alors garder les suspensions à 4°C pendant une semaine (pour tous les renouvellements du test).

C. Solution nutritive

C'est une solution mère concentrée qui contient des algues, de la levure et de la nourriture pour poisson. Elle doit être réalisée chaque jour.

Dans un récipient jaugé, mettre dans de l'eau EMD, pour un litre de solution:

- 25 ml de suspension de levure à 5,0 g/l,
- 25 ml de surnageant du mélange nourriture à poisson,
- 12 10⁸ cellules de *Chlorella vulgaris*,
- 6 10⁸ cellules de *Selenastrum capricornutum*.

D. Milieu de croissance

C'est une dilution au 10^{ème} de la solution nutritive (chap IV.C) dans de l'eau EMD.

VI. PROTOCOLE D'ESSAI

A. Description générale

Chaque essai comprend: un lot témoin, différents lots comprenant différentes concentrations de l'échantillon à analyser (au minimum cinq), à raison de dix cériodaphnies par lot, chaque cériodaphnie étant maintenue isolée dans un récipient individuel.

Pour l'essai interlaboratoire, la gamme de concentrations à tester est dans un premier temps donnée.

B. Mise en route de l'essai

1. Préparation des solutions d'essai

Cette préparation s'effectue dans des récipients jaugés.

- Pour le témoin négatif on prend le milieu EMD.
- Pour les tests, introduire le volume calculé d'échantillon pour réaliser les différentes concentrations et compléter jusqu'à presque les neuf dixièmes des récipients avec le milieu EMD. Mélanger.

Placer dans les différents récipients la solution nutritive pour avoir une dilution au dixième de celle-ci et compléter avec le milieu de culture. Mélanger.

Remarque: LA concentration maximale testée ne pourra être supérieure à 90% de la concentration initiale de l'échantillon à tester.

Répartir chacune des préparations ainsi effectuées dans des récipients propres à raison de 40 **ml/récipient**, soit 10 récipients par lot, et porter à la température de 25°C. Chaque récipient d'essai doit être bien identifié pour éviter tout risque de mélange.

E. Mesures biologiques

Après avoir transféré chaque cériodaphnie adulte dans le nouveau milieu, procéder au comptage des juvéniles (cf. annexe), et enregistrer ainsi à chaque renouvellement de milieu :

- la survie de la cériodaphnie mère dans chaque récipient,
- le nombre de juvéniles vivants dans chaque récipient.
- ainsi que l'heure du transfert des mères dans le nouveau récipient.

F. Fin d'essai

Le 7ème jour, procéder à un renouvellement du milieu pour le lot témoin (comme au **chap. 7.4**).

Procéder à l'examen de la descendance, et dans le cas où 3 pontes n'auraient pas été obtenues pour au moins 60 % des mères, procéder à un nouveau renouvellement de milieu, et prolonger l'essai pendant au moins 18 h.

Indiquer, après vérification, le sexe des cériodaphnies sans descendance.

VII. VALIDATION

Pour que l'essai soit considéré comme valide, le pourcentage de survie des animaux dans le lot témoin doit être au moins égal à 80 % et 60 % au moins des mères survivantes doivent avoir effectué 3 pontes, conduisant à un nombre moyen de juvéniles, égal ou supérieur à 15 par mère.

VIII. PRESENTATION DES RESULTATS

Communiquer les dates de début et de fin d'essai, les mesures de pH et d'oxygène dissous et les paramètres biologiques déjà mesurés.

Les valeurs statistiques représentatives sont en cours de mise au point.

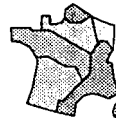
X. ANNEXE2

Propositions pour le décompte des juvéniles

Les cériodaphnies étant très petites, le décompte des juvéniles est assez difficile.

- * On peut le réaliser dans le récipient ayant contenu l'élevage. Mettre le récipient à la lumière et sur un fond noir; on pipette alors les jeunes cériodaphnies vivantes pour les compter.
- * Les juvéniles peuvent être tués avec une ou deux gouttes de HC1 (1 N); il faut alors faire attention à ne pas compter les mues de cériodaphnies qui sont parfois présentes.
- * Il est aussi possible d'utiliser un petit filtre en nylon de 5 μm , de vider le contenu du récipient dessus et de compter les juvéniles sous loupe binoculaire.

Il sera intéressant de connaître les conditions de comptage, même si celles-ci ne devraient pas influencer le résultat.



dBase a été choisi car il permet l'utilisation des deux logiciels de traitement ci-dessus :

- STATGRAPHIC est compatible avec dBase,
- dBase a une sortie ASCII utilisable par TOXSTAT.

Par ailleurs, la dernière version de dBase comporte un RUN-TIME permettant l'exécution des programmes dBase directement sous PC avec uniquement les commandes du DOS.

Le travail en programmation sous dBase est possible pour une personne non formée à la programmation, par ailleurs la gestion des bases de données est multiple, il est possible de mettre en relation plusieurs bases de données, ce qui permettra de faire les extractions de données nécessaires.

Le programme

Il a été "baptisé" **CERIO**, c'est en réalité une application sous dBase, elle comporte une vingtaine de pages, ce qui se traduit par un programme compilé de 100.000 octets. Pour les différentes saisies, plusieurs "sous-programmes" ont été réalisés, l'architecture générale de l'application est présentée ci-après.

Le schéma suivant se lit de haut en bas. L'application principale est CERIO.PRG, elle comporte différentes sous-applications,

- CODE.PRG contrôle l'accès à l'application en demandant le code du laboratoire,
- MENU VERTICAL permet le choix entre trois options,
- CARAC.PRG stocke les caractéristiques du laboratoire (le matériel dans CARAC.DBF et le personnel dans PERSONNE.DBF),
- RSAI.PRG s'occupe de la saisie des caractéristiques de l'essai (ESSAI.PRG) et des résultats de l'essai (RESULT.PRG),
- le passage par le programme de sortie FSAI.PRG génère des fichiers de sortie regroupant toutes les informations disponibles sur un essai et effectue une copie sur disquette.

Ce logiciel reste propriété de BETURE-SETAME.

Fonctionnement du programme

Une notice explicative est fournie aux laboratoires en même temps que le logiciel. L'installation se fait automatiquement.

Le programme se déroule en plusieurs parties, la circulation entre les différentes parties se fait à l'aide de menus. Le programme explique au maximum les opérations effectuées et dans certains cas des mises en garde sont affichées pour éviter de fausses-manipulations. Sauf exception, une erreur de manipulation ne remet pas en cause la possibilité de saisie ou de sauvegarde des résultats saisis.

La saisie des résultats se fait sous masques, ceux-ci tiennent sur une page et regroupent les données relatives aux résultats biologiques, physico-chimiques... en incluant la date, l'heure, le code du laboratoire, le numéro de l'essai... Le programme génère automatiquement les fichiers où sont stockés les résultats puis une fois la saisie terminée il effectue la copie des fichiers de données sur disquette.

Certaines informations sont à saisir qu'une fois telles, les caractéristiques du laboratoire, le personnel ou seulement en cas de modifications, ce qui permet de communiquer toute modification au chargé d'étude.

Lecture et traitement des résultats

Les fichiers pouvant être lus simplement sous dBase, les champs ont été choisis pour être **suffisamment** explicites aux non initiés (CD-LAB, CD-ESS, CD-BEC, T, PH, S, NB-JEUN...). Des petits programmes annexes permettent une visualisation des résultats, leur impression, un programme permet aussi de générer une sortie utilisable par le logiciel- TOXSTAT, des passages sont aussi possibles vers STATGRAPHIC.

Les différentes versions

Plusieurs versions du logiciel ont déjà été réalisées avant la diffusion, des améliorations sont toujours possibles, elles résulteront des remarques faites par les manipulateurs et permettront de donner un programme plus convivial et plus complet.

Pour installer CERIO.

Créer un répertoire (par ex. CERIO) dans lequel vous souhaitez installer le logiciel, se positionner dans le répertoire et taper **a:\install** si vous installez à partir du lecteur a: (disquette dans le lecteur a:) ou **b:\install** si vous l'installez à partir du lecteur b.

Par la suite si vous souhaitez travailler à partir d'un répertoire différent de celui, où le logiciel CERIO a été installé, mettre un PATH pour CERIO dans le fichier AUTOEXEC.BAT.

Verifier aussi que dans le CONFIG.SYS le nombre de fichiers utilisables est supérieur à 30 (PILES= 30).

Vous pouvez alors utiliser CERIO. Pour le lancer taper CERIO.

UTILISATION DE CERIO

Saisie du code laboratoire

Dans un premier temps, CERIO vous demande le code de votre laboratoire, il est très important de bien le saisir car c'est celui qui sera partout copié dans les fichiers de base de données et permettra votre identification. Si vous l'avez oublié le logiciel peut à titre exceptionnel vous attribuer un autre code (taper 0) mais ne le changer pas en cours de stockage des résultats d'un essai car les fichiers deviendraient alors inutilisables.

Menu principal

Vous avez le choix entre :

- **CARACTERISTIQUES DU LABORATOIRE,**
- **SAISIEDESRESULTATSD'UNESSAI,**
- **SORTIE.**

A/ CARACTERISTIQUES DU LABORATOIRE

Dans cette procédure, des informations générales concernant votre laboratoire et votre personnel sont mémorisées, ces informations constitueront une présentation de votre laboratoire. Les renseignements sur le personnel permettent d'étudier d'éventuelles variations des résultats selon le manipulateur.

Vous ne devez remplir qu'une seule fois cette rubrique sauf si vous devez saisir du nouveau personnel, suivez alors les indications portées à l'écran.

B/ SAISIE DES RESULTATS D'UN ESSAI

La saisie des résultats se fait essai par essai, les bases de données qui sont créées comportent votre code-laboratoire et le numéro de l'essai (c'est son n° d'ordre).

Vous pouvez saisir plusieurs essais différents à la fois. Lors de la saisie des résultats d'un nouvel essai, l'écran suivant s'affiche :

"Vous voulez saisir les résultats de l'essai n° ?"

CERIO vous demande ensuite des précisions sur les **conditions du début de l'essai** (nom du produit testé (si connu), algues servant à cet essai, nombre de jeunes disponibles, portées de plus de 8 jeunes); n'hésitez pas à nous donner le maximum de renseignements dans la rubrique **COMMENTAIRE**.

7.3. Annexe 3: Préparation du milieu M4

Dans sa publication de janvier 1990, ELENDDT propose différents milieux d'élevage pour les céridaphnies, le milieu appelé M4 a été très souvent retenu. **En voici sa composition:**

	M 4
Oligo-éléments (mg/l)	
B	0.5
Fe	0.2
Mn	0.1
Li	0.05
Rb	0.05
Sr	0.05
Mo	0.025
Br	0.0.0125
CU	0.0063
Zn	0.0063
Co	0.0025
J	0.0025
Se	0.0010
V	0.0003
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	2.5
Macro éléments (mg/l)	
Ca	80.1
Mg	12.2
l	19.8
K	3.2
Si	1.0
Cl	144.9
NO₂	0.2
PO₄	0.2
SO₄	48.4
HCO₃	47.1
Vitamines (µg/l)	
Thiamine	75.0
B12	1.0
Biotine	0.75

Le milieu présente alors les caractéristiques suivantes: pH = 8,2, Dureté totale de 2,5 mmol/l, Alcalinité de 0,9 mmom/l et conductivité de 610 µS cm.