



**INHIBITION DE LA CROISSANCE  
DE LA POPULATION DE  
*CERIODAPHNIA DUBIA***

**Influence de la modification du protocole  
expérimental sur la validité des essais**

Rapport technique

Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable  
Direction de l'Eau  
20, avenue de Ségur – 75302 PARIS 07 SP

Convention DE n° CV03000081 - Opération n°1

*Pascal PANDARD*

*Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques  
Direction des risques chroniques*

**23 DÉCEMBRE 2003**

# INHIBITION DE LA CROISSANCE DE LA POPULATION DE *CERIODAPHNIA DUBIA*

## Influence de la modification du protocole expérimental sur la validité des essais

23 DÉCEMBRE 2003

### PERSONNES AYANT PARTICIPE A L'ETUDE

Jacques GIACALONE – Anne GUILLEMETTE

Ce document comporte 9 pages (hors couverture et annexes).

	<b>Rédaction</b>	<b>Vérification</b>	<b>Approbation</b>
<b>NOM</b>	Pascal PANDARD	Eric THYBAUD	Eric THYBAUD
<b>Qualité</b>	Ingénieur de la DRC – Unité ECOT	Responsable de l'unité ECOT	Responsable de l'unité ECOT
<b>Visa</b>			

## TABLE DES MATIERES

<b>1. CONTEXTE.....</b>	<b>3</b>
<b>2. INFLUENCE DE LA MODIFICATION DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL SUR LA VALIDITÉ DE L’ESSAI.....</b>	<b>4</b>
2.1 Introduction.....	4
2.2 Bilan des essais .....	4
<b>3. SENSIBILITÉ À LA SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE .....</b>	<b>8</b>
<b>4. CONCLUSION.....</b>	<b>9</b>

## 1. CONTEXTE

---

L'essai d'inhibition de la croissance de la population de *Ceriodaphnia dubia* a fait l'objet d'un processus de normalisation au niveau français. Cet essai de toxicité chronique présente en effet de nombreux avantages : durée d'essai relativement courte (7 j) et renouvellement périodique des solutions d'essai. De plus, *Ceriodaphnia dubia* s'est révélée un réactif sensible à un large spectre de substances toxiques. Cet essai possède donc toutes les conditions requises pour s'intégrer dans un programme de suivi, en particulier pour les effluents.

La norme correspondant à cet essai (NF T 90-376) a été publiée par l'AFNOR à la fin de l'année 2000. Ce protocole a ensuite été proposé par la France au niveau international et accepté comme nouveau sujet de travail à l'ISO/TC 147/SC 5. A l'issue des circulations successives du document, de nombreux commentaires, émis pour la plupart par le Canada, ont remis en cause de façon significative le protocole proposé. Les points principaux de discussion étaient les suivants :

- la réduction possible du volume de milieu dans les récipients d'essai (25 ml au lieu de 50 ml),
- la modification de la durée de l'essai (entre 6 et 8 jours par rapport à une durée fixe de 7 jours, la durée effective étant conditionnée par l'obtention de 3 pontes pour 60 % des mères chez les témoins),
- la possibilité d'utiliser un autre milieu d'essai que le milieu M4 d'Elendt.

Les travaux réalisés sur ce sujet dans le cadre de la présente convention avaient pour but de vérifier, dans quelle mesure, ces modifications des conditions expérimentales pouvaient affecter :

- les conditions de validité de l'essai,
- le taux de reproduction de *Ceriodaphnia dubia*,
- la sensibilité à la substance de référence.

## 2. INFLUENCE DE LA MODIFICATION DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL SUR LA VALIDITE DE L'ESSAI

---

### 2.1 INTRODUCTION

Afin d'évaluer l'influence des adaptations du protocole expérimental en terme de respect des critères de validité, différents essais témoins ont été réalisés comparant les conditions préconisées dans l'ISO/CD 20665 (1 organisme pour 50 ml de milieu d'essai) et celles proposées par Environnement Canada (1 organisme pour 25 ml de milieu d'essai). Les essais ont été prolongés jusqu'à 8 jours excepté pour l'essai 1. Deux milieux d'essai distincts ont été testés : le milieu M4 d'Elendt (préconisé dans l'ISO/CD 20665) et une eau minérale naturelle.

Les critères de validité proposés sont au nombre de quatre ; ceux-ci sont repris ci-dessous :

- la mortalité des mères dans le lot témoin au septième jour doit être inférieure à 20 %,
- le nombre moyen de jeunes nés par mère vivante dans le lot témoin doit être supérieur à 15.
- Au moins 60 % des mères vivantes en fin d'essai doivent avoir produit un minimum de 3 portées,
- le nombre de mâles dans la génération parente au septième jour ne doit pas excéder 20 % dans chacun des lots.

### 2.2 BILAN DES ESSAIS

Les résultats obtenus lors des différents essais sont présentés dans le tableau 1.

En ce qui concerne les mères, la réduction du volume de moitié n'a pas modifié les niveaux de survie obtenus. Le pourcentage a toujours été compris entre 90 et 100 % (la limite inférieure permettant de valider l'essai se situant à 80 %). Le prolongement de l'essai à 8 jours s'est également révélé sans effet sur ce paramètre.

La comparaison des essais a mis en évidence une réduction du taux de reproduction de *Ceriodaphnia dubia* de façon systématique dans un volume de 25 ml, que l'on considère l'un ou l'autre des milieux d'essai et quelle que soit la durée de l'essai. Les écarts observés se sont échelonnés entre 20 % et 56 %.

Si l'on excepte les essais 4 et 5 respectivement non valide et valide dans tous les cas de figure, la prolongation de l'essai de 24 heures a permis de satisfaire aux critères de validité :

- *essai 2* : pour les deux volumes considérés,
- *essai 3* : pour un volume de milieu de 50 ml.

Deux des quatre critères ont été affectés par cette extension de la durée d'exposition : le nombre moyen de jeunes par mère mais également le pourcentage de mères ayant pondu un minimum de trois portés au cours de l'essai .

En revanche, sur les cinq essais, aucun n'a pu être validé au bout du sixième jour d'exposition.

Tableau 1 : Compilation des résultats obtenus lors des essais témoins

	Essai 1*				Essai 2				Essai 3*			
	Volume 25 ml		Volume 50 ml		Volume 25 ml		Volume 50 ml		Volume 25 ml		Volume 50 ml	
	Lecture J7	Lecture J8										
<b>Réplicat 1</b>	8	-	15	-	11	18	27	35	8	13	21	31
<b>Réplicat 2</b>	11	-	19	-	12	12	19	27	10	10	16	24
<b>Réplicat 3</b>	10	-	22	-	9	12	20	29	10	10	14	22
<b>Réplicat 4</b>	6	-	13	-	17	25	14	14	12	12	17	19
<b>Réplicat 5</b>	8	-	0	-	20	24	20	29	6	6	14	20
<b>Réplicat 6</b>	14	-	12	-	26	34	10	18	9	9	21	30
<b>Réplicat 7</b>	4	-	17	-	17	25	27	27	5	11	19	24
<b>Réplicat 8</b>	7	-	13	-	18	18	30	38	0	0	9	11
<b>Réplicat 9</b>	3	-	14	-	13	13	18	18	12	14	13	19
<b>Réplicat 10</b>	3	-	17	-	17	24	17	19	11	13	17	25
<b>Mortalité des mères</b>	0 %	-	10 %	-	0 %	0 %	0 %	10 %	10 %	10 %	0 %	0 %
<b>Nombre de jeunes cumulé</b>	74	-	142	-	160	205	202	254	83	98	161	225
<b>Nombre moyen de jeunes par mère vivante</b>	7,4	-	15,8	-	16,0	20,5	20,2	28,2	9,2	10,9	16,1	22,5
<b>Pourcentage de mères ayant eu 3 portées</b>	30 %	-	80 %	-	30 %	70 %	30 %	80 %	40 %	60 %	50 %	100 %
<b>Validité de l'essai</b>	<b>NV</b>	-	<b>V</b>	-	<b>NV</b>	<b>V</b>	<b>NV</b>	<b>V</b>	<b>NV</b>	<b>NV</b>	<b>NV</b>	<b>V</b>

\* : Essais réalisés dans un milieu différent du milieu M4 (eau minérale naturelle)

**NV** : Non Valide ; **V** :valide

Tableau 1 (suite) : Compilation des résultats obtenus lors des essais témoins

	Essai 4				Essai 5			
	Volume 25 ml		Volume 50 ml		Volume 25 ml		Volume 50 ml	
	Lecture J7	Lecture J8						
<b>Réplicat 1</b>	5	5	11	11	20	20	19	29
<b>Réplicat 2</b>	8	7	9	9	19	19	28	46
<b>Réplicat 3</b>	6	9	5	5	20	20	19	34
<b>Réplicat 4</b>	6	9	26	26	18	18	27	46
<b>Réplicat 5</b>	6	6	2	5	14	18	16	26
<b>Réplicat 6</b>	6	6	16	17	10	10	25	42
<b>Réplicat 7</b>	10	10	3	3	12	12	21	36
<b>Réplicat 8</b>	14	14	20	20	17	28	12	19
<b>Réplicat 9</b>	9	9	8	8	10	16	24	26
<b>Réplicat 10</b>	4	13	15	15	4	4	26	39
<b>Mortalité des mères</b>	10 %	10 %	0 %	0 %	10 %	10 %	0 %	0 %
<b>Nombre de jeunes cumulé</b>	74	91	115	119	144	165	217	343
<b>Nombre moyen de jeunes par mère vivante</b>	8,2	10,1	11,5	11,9	16,0	18,3	21,7	34,3
<b>Nombres de mères ayant eu 3 portées</b>	10 %	20 %	40 %	40 %	80 %	80 %	80 %	100 %
<b>Validité de l'essai</b>	<b>NV</b>	<b>NV</b>	<b>NV</b>	<b>NV</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>V</b>

NV : Non Valide ; V :valide

### 3. SENSIBILITE A LA SUBSTANCE DE REFERENCE

Deux essais ont été effectués avec le pentachlorophénate de sodium (NaPCP) dans les conditions suivantes : milieu d'essai M4 d'Elendt, flacon d'une capacité de 60 ml, volume de milieu 25 ml, durée d'essai 8 jours. Les résultats de ces essais sont présentés dans le tableau 2.

*Tableau 2 : Résultats des essais de croissance de la population de Ceriodaphnia dubia pour le NaPCP*

	Essai 1		Essai 2	
	Lecture J7	Lecture J8	Lecture J7	Lecture J8
<b>Mortalité des mères dans les témoins</b>	0 %	0 %	10 %	10 %
<b>Nombre de jeunes cumulé dans les témoins</b>	200	317	154	225
<b>Nombre moyen de jeunes par mère vivante dans les témoins</b>	20,0	31,7	15,9	23,8
<b>Nombres de mères ayant eu 3 portées dans les témoins</b>	100 %	100 %	100 %	100 %
<b>Validité de l'essai</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>V</b>
<b>CE<sub>c</sub> 50 (intervalle de confiance à 95 %)</b>	0,20 mg/l (0,19 – 0,21)	0,18 mg/l (0,18 – 0,19)	0,20 mg/l (0,18 – 0,23)	0,18 mg/l (0,15 – 0,22)

Les essais effectués sur la substance de référence se sont révélés valides dès une durée d'exposition de 7 jours.

Les valeurs de CE<sub>c</sub> 50 (concentration entraînant 50 % d'inhibition de la croissance de la population), obtenues en utilisant un volume de milieu de 25 ml, sont apparues cohérentes avec les données de l'essai inter laboratoire réalisé dans le cadre de la normalisation de ce protocole à l'AFNOR. Pour mémoire, les résultats de cet essai inter laboratoire étaient les suivants : valeur moyenne : 0,28 mg/l ; étendue : 0,17 – 0,33 mg/l (données obtenues sur 8 laboratoires).

La prolongation des essais de 24 heures n'a pas modifié de façon significative les résultats obtenus. (Cf. tableau 2), les valeurs de CE<sub>c</sub> 50 restant dans la gamme déterminée à l'issue de l'essai circulaire.

## 4. CONCLUSION

---

Les essais effectués dans le cadre de la présente convention ont permis de vérifier la faisabilité des essais d'inhibition de la croissance de la population de *Ceriodaphnia dubia* en utilisant un volume de milieu réduit de moitié (25 au lieu de 50 ml) dans le milieu M4. Même si le taux de reproduction s'est révélé inférieur, comparativement au volume initialement proposé, trois essais sur les sept ont été validés dès 7 jours d'exposition.

La prolongation de l'essai de 24 heures a amélioré le pourcentage d'essais validés en permettant d'atteindre : soit un nombre moyen de jeunes supérieur à 15 par mère vivante en fin d'essai, soit un pourcentage de mères ayant pondu un minimum de trois portées au cours de l'essai supérieur à 60 %.

En terme de sensibilité, les essais avec le pentachlorophénate de sodium n'ont pas mis en évidence de différence pour une prolongation de l'essai de 24 heures.

Ces essais, même si leur nombre est réduit, permettent de confirmer le bien fondé des modifications proposées dans le cadre des travaux à l'ISO sur cet essai de toxicité chronique. La prochaine version du texte (rédigée par la France en tant que chef de projet) intégrera ces modifications ; ce qui devrait assurer l'obtention d'un consensus international rapide sur ce sujet.