

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

Essai de reproduction chez l'enchytrée

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice est destinée à évaluer les effets des produits chimiques sur la reproduction d'un ver enchytrée, *Enchytraeus albidus*, Henle 1873, dans le sol. Elle repose pour l'essentiel sur une méthode développée par l'Umweltbundesamt (Allemagne) (1) qui a été soumise à un essai tournant (2). D'autres méthodes d'évaluation de la toxicité des produits chimiques sur les enchytrées et les lombrics ont aussi été prises en considération (3)(4)(5)(6)(7)(8).

CONSIDÉRATIONS INITIALES

2. Les annélides pédocoques du genre *Enchytraeus* sont des espèces écologiquement pertinentes pour les essais d'écotoxicité. Bien que fréquents dans les sols à lombrics, les enchytrées colonisent souvent en abondance de nombreux sols qui n'abritent pas de lombrics. Les enchytrées se prêtent à des essais en laboratoire, ainsi qu'à des essais sur le terrain et en partie sur le terrain. Sur le plan pratique, de nombreuses espèces d'*Enchytraeus* sont faciles à manipuler et à élever et leur génération est nettement plus courte que celle des lombrics. Aussi la durée d'un essai de reproduction chez l'enchytrée n'est-elle que de 4 à 6 semaines, contre 8 semaines chez les lombrics (*Eisenia fetida*).

3. Des notions de base sur l'écologie et l'écotoxicologie des enchytrées en milieu terrestre sont fournies par les références (9)(10)(11)(12).

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. Les enchytrées adultes sont exposés à une gamme de concentrations du produit chimique testé mélangé à un sol artificiel. Cet essai peut être divisé en deux étapes : a) un essai de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations, si des informations manquent, où la mortalité constitue le principal résultat évalué après deux semaines d'exposition et b) l'essai de reproduction proprement dit dans lequel on évalue le nombre total de vers juvéniles produits par animal parent et la survie des animaux parents. L'essai proprement dit dure six semaines. À la fin des trois premières semaines, on enlève les vers adultes et on note leurs changements morphologiques. Au terme des trois semaines suivantes, le nombre de descendants éclos des cocons engendrés par les adultes est compté. On compare le taux de reproduction des animaux exposés au produit chimique testé à celui du(des) témoin(s), afin de déterminer i) la concentration sans effet observé (CSEO) et/ou ii) la CE_x (par exemple CE_{10} , CE_{50}), à l'aide d'un modèle de régression pour

estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x% du taux de reproduction. Les concentrations expérimentales doivent couvrir la CE_x (par exemple CE_{10} , CE_{50}), de façon à ce que la CE_x soit interpolée plutôt qu'extrapolée.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

5. Il est préférable de connaître l'hydrosolubilité, le $\log K_{oe}$, le coefficient de partage entre l'eau et le sol (Lignes directrices 106 ou 121 de l'OCDE, par exemple) et la pression de vapeur du produit chimique testé. Des informations supplémentaires sur le devenir de la substance d'essai dans le sol, notamment sa vitesse de photolyse et d'hydrolyse, seraient souhaitables.

6. Cette Ligne directrice convient à l'essai de substances hydrosolubles ou insolubles ; néanmoins, le mode d'application du produit chimique testé variera en conséquence. Cette Ligne directrice peut ne pas s'appliquer aux substances dont le coefficient de partage air/sol est supérieur à un, ou les substances dont la pression de vapeur dépasse 300 Pa à 25°C. D'autres facteurs tels que la forte solubilité dans l'eau ou une adsorption au sol élevée, limitant le potentiel de volatilisation, doivent être pris en compte dans la décision de conduire ou non l'essai. Pour les substances instables, volatiles ou facilement dégradables (par exemple identifiées au moyen de données issues d'un essai selon la Ligne directrice 307), ou quand il existe par ailleurs une incertitude sur le maintien de la concentration nominale dans le sol, des mesures analytiques des concentrations d'exposition au début, en cours et en fin d'essai devraient être considérées.

7. Avant l'utilisation de cette Ligne directrice pour des essais sur les mélanges à des fins réglementaires, il faudra prendre en compte et justifier que les résultats générés fourniront des résultats appropriés à cette fin. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand il existe une exigence réglementaire de tester le mélange.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

8. Pour que l'essai soit valide, les témoins doivent satisfaire aux critères suivants :

- la mortalité des adultes n'excédera pas 20% à la fin de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations (si celui-ci est effectué) et à la fin des trois premières semaines de l'essai de reproduction.
- si dix adultes ont été déposés dans chaque récipient au début de l'essai, on doit retrouver en moyenne au moins 25 vers juvéniles par récipient à la fin de l'essai.
- le coefficient de variation autour du nombre moyen de vers juvéniles ne doit pas dépasser 50% à la fin de l'essai de reproduction.

Un essai qui ne remplirait pas les critères de validité susmentionnés doit être arrêté, à moins que la poursuite de l'essai puisse être justifiée. Cette justification doit figurer dans le rapport d'essai.

SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

9. Afin de vérifier que la réaction des organismes d'expérience ne change pas de façon significative au cours du temps, une substance de référence sera soit testée à intervalles réguliers, soit incluse dans chaque essai. La carbendazime, qui affecte la survie et la reproduction des enchytrées (13)(14), est une substance de référence appropriée, tout comme d'autres produits chimiques dont la toxicité est bien connue. Le Derosal™, fourni par AgrEvo (Francfort, Allemagne), est un produit renfermant de la carbendazime à raison de 360 g/l (32,18%) d'ingrédient actif, qui a été utilisé dans un essai tournant (2). La CE_{50} pour la

reproduction déterminée au cours de l'essai tournant s'élevait à $1,2 \pm 0,8$ mg d'ingrédient actif/kg de masse sèche (2). Si un étalon toxique positif est inclus dans la série d'essais, on n'applique qu'une seule concentration et un nombre d'expériences identiques égal à celui des témoins. En ce qui concerne la carbendazime, on recommande l'essai de 1,2 mg d'ingrédient actif/kg de poids sec (testé sous forme liquide).

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Matériel

10. Les récipients expérimentaux doivent être composés de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte. On utilisera des bocaux en verre (volume : 0,20 – 0,25 litre ; diamètre \pm 6 cm, par exemple) munis de couvercles transparents (en verre ou en polyéthylène, par exemple) afin de réduire l'évaporation de l'eau, tout en autorisant les échanges gazeux entre le sol et l'atmosphère. Les couvercles doivent être transparents pour laisser passer la lumière.

11. Cet essai requiert du matériel de laboratoire courant et en particulier :

- armoire à séchage ;
- stéréomicroscope ;
- pH-mètre et photomètre
- balances suffisamment précises ;
- instruments appropriés permettant de réguler la température ;
- instruments appropriés permettant de réguler l'humidité (pas essentiel si les récipients expérimentaux ont des couvercles) ;
- incubateur ou petite chambre équipée d'un conditionnement de l'air ;
- pinces, crochets ou anses ;
- cuve de développement photographique

Préparation du sol artificiel

12. Dans cet essai, on utilise un sol artificiel (5)(7) composé comme suit (en poids secs, séchés à 105°C jusqu'à obtention d'un poids constant) :

- 10% de tourbe à sphaigne, séchée à l'air et finement broyée (une dimension des particules de 2 ± 1 mm est acceptable) ; il est recommandé de vérifier qu'un sol préparé avec un lot frais de tourbe convient à la culture des vers, avant de l'utiliser dans un essai ;
- 20% d'argile kaolinique (taux de kaolinite de préférence supérieur à 30%) ;
- environ 0,3 à 1,0% de carbonate de calcium (CaCO_3 pulvérisé, de qualité pour analyse) pour obtenir un pH de $6,0 \pm 0,5$; la quantité de carbonate de calcium à ajouter peut dépendre principalement de la qualité/nature de la tourbe ;
- environ 70% de sable quartzique (selon la quantité de CaCO_3 nécessaire) séché à l'air, composé en majorité de sable fin (plus de 50% des particules mesurant entre 50 et 200 μm).

Avant d'utiliser le sol artificiel dans l'essai proprement dit, il est conseillé de démontrer que ce sol convient à la culture des vers et qu'il permet de répondre aux critères de validité de l'essai. Cette précaution vise en particulier à vérifier que le bon fonctionnement de l'essai ne sera pas compromis si la teneur en carbone organique du sol artificiel est réduite, par exemple si le pourcentage de tourbe est ramené à 4-5% et que le taux de sable est augmenté en conséquence. Cette réduction de la teneur en carbone organique est susceptible de diminuer les possibilités d'adsorption de la substance d'essai sur le sol (carbone organique) et d'augmenter la disponibilité de la substance d'essai pour les vers. Il a été démontré qu'*Enchytraeus*

albidus peut satisfaire aux critères de validité concernant la reproduction lorsqu'il est testé sur le terrain sur des sols dont la teneur en carbone organique est inférieure à celle mentionnée ci-dessus (2,7%, par exemple) (15), et on a constaté (bien que l'expérience en la matière soit limitée) que ce ver peut aussi satisfaire aux critères de validité lorsqu'il est mis à l'essai sur un sol artificiel renfermant 5% de tourbe.

Remarque : Lorsqu'on utilise un sol naturel dans un essai supplémentaire (réalisé à un niveau supérieur dans le cadre d'essais séquentiels, par exemple), l'adéquation du sol à la culture des vers et au respect des critères de validité doit aussi être démontrée.

13. Les ingrédients secs du sol sont mélangés complètement (par exemple, dans un grand mélangeur de laboratoire), et ce au moins une semaine avant le début de l'essai. Le sol mélangé doit être entreposé durant deux jours pour que l'acidité s'équilibre/se stabilise. Pour déterminer le pH, on mélange le sol avec une solution 1 M de chlorure de potassium (KCl) ou 0,01 M de chlorure de calcium (CaCl₂) dans des proportions de 1/5 (voir (16) et Annexe 3). Si l'acidité du sol dépasse les valeurs incluses dans la gamme requise (voir paragraphe 11), elle peut être ajustée par l'addition d'une quantité appropriée de CaCO₃. Si le sol est trop alcalin, il peut être rééquilibré par l'ajout d'un mélange comprenant les ingrédients cités au paragraphe 11, à l'exclusion du CaCO₃.

14. La capacité maximale de rétention d'eau du sol artificiel est déterminée conformément aux procédures décrites à l'Annexe 2. Un ou deux jours avant le début de l'essai, le sol artificiel sec est préhumidifié par l'ajout d'une quantité suffisante d'eau désionisée pour atteindre environ la moitié de sa teneur en eau finale, à savoir 40 à 60% de la capacité maximale de rétention d'eau. Au début de l'essai, le sol préhumidifié est divisé en autant de portions que de concentrations expérimentales, témoins et substance de référence utilisés dans l'essai. La teneur en humidité est ajustée à 40-60% de la capacité maximale de rétention d'eau par l'addition de la solution contenant le produit chimique testé et/ou d'eau distillée ou désionisée (voir paragraphes 19-21). La teneur en humidité est déterminée au début et à la fin de l'essai (par séchage à 105°C jusqu'à obtention d'un poids constant) et doit se situer dans la gamme optimale pour la survie des vers. Il est possible d'estimer en gros le taux d'humidité du sol en pressant doucement une poignée de sol dans une main : si le taux d'humidité est correct, de petites gouttes d'eau apparaissent entre les doigts.

Sélection et préparation des animaux d'essai

15. L'espèce recommandée dans cet essai est *Enchytraeus albidus*, Henle 1837 (ver blanc), de la famille des *Enchytraeidae* (ordre des *Oligochaeta*, phylum des annélides). *E. albidus* est l'un des plus grands représentants des enchytrées, des spécimens mesurant jusqu'à 35 mm de long ayant été recensés (17)(18). Espèce à répartition mondiale, *E. albidus* colonise des habitats marins, dulcicoles et terrestres, constitués la plupart du temps de matière organique en décomposition (algues, compost), et fréquente rarement les prairies (9). Le fait qu'il tolère une gamme étendue de conditions écologiques et certaines variations morphologiques indiquent qu'il pourrait exister différentes races.

16. *E. albidus* est vendu dans le commerce, comme nourriture pour les poissons. Il y a lieu de vérifier si la culture est contaminée par d'autres espèces, généralement plus petites (1)(19). Dans l'affirmative, tous les vers doivent être lavés à l'eau dans une boîte de Petri. On sélectionne ensuite les grands spécimens adultes d'*E. albidus* (au moyen d'un stéréomicroscope), afin de lancer une nouvelle culture et on jette tous les autres vers. *E. albidus* s'élève facilement sur des matières organiques très diverses (voir Annexe 4). Le cycle de vie d'*E. albidus* est court : il met entre 33 jours (à 18°C) et 74 jours (à 12°C) à atteindre sa maturité (1). Seules les cultures qui auront pu être maintenues en laboratoire durant au moins cinq semaines (1 génération) sans poser de problème seront utilisées dans l'essai.

17. D'autres espèces du genre *Enchytraeus* conviennent également, par exemple *E. buchholzi*, Vejdovsky 1879, ou *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 (voir Annexe 5). Si on utilise d'autres espèces d'*Enchytraeus*, il faut les identifier clairement et justifier ce choix dans le rapport.

18. Les animaux utilisés dans les essais sont des vers adultes. Il doivent porter des oeufs (points blancs) dans la région du clitellum et mesurer à peu près la même taille (environ 1 cm de long). La synchronisation de la culture d'élevage n'est pas nécessaire.

19. Si les enchytrées ne sont pas élevés sur un type de sol et dans des conditions (y compris alimentaires) identiques à celles de l'essai final, ils doivent passer par une période d'acclimatation comprise entre 24 heures et 3 jours. Il convient d'acclimater au départ un plus grand nombre d'adultes que ne le requiert l'essai, afin de pouvoir rejeter les individus blessés ou inutilisables pour une autre raison. Au terme de la période d'acclimatation, seuls les vers portant des oeufs et ne manifestant aucun comportement anormal (par exemple, essayant d'échapper du sol) sont sélectionnés pour l'essai. Les vers sont prélevés soigneusement à l'aide d'une pince de bijoutier, de crochets ou d'anses et placés dans une boîte de Petri contenant une petite quantité d'eau douce. À cet effet, il est préférable d'utiliser une eau douce reconstituée, telle que décrite dans la Ligne directrice 211 de l'OCDE : «*Daphnia magna*, Essai de reproduction», l'eau désionisée, déminéralisée ou du robinet risquant d'être néfaste aux vers. Les vers sont examinés au stéréomicroscope et tous ceux qui ne portent pas d'oeufs sont éliminés. On veillera à éliminer toutes les mites ou les collemboles qui auraient pu infecter les cultures. Les vers sains qui ne serviront pas à l'essai sont remis dans la culture mère.

Préparation des concentrations expérimentales

Produit chimique testé hydrosoluble

20. Une solution du produit chimique testé dans de l'eau désionisée est préparée en quantité suffisante pour toutes les expériences identiques d'une concentration expérimentale. Il est recommandé d'utiliser la quantité d'eau nécessaire pour obtenir le taux d'humidité requis, à savoir 40 à 60% de la capacité maximale de rétention d'eau (voir paragraphe 13). Chaque solution du produit chimique testé est mélangée complètement avec un lot du sol préhumidifié, avant d'être introduite dans le récipient expérimental.

Produit chimique testé non soluble dans l'eau

21. Les produits chimiques testés solubles dans l'eau mais solubles dans des solvants organiques peuvent être dissouts dans le plus petit volume possible d'un véhicule approprié (par exemple de l'acétone). Seuls des solvants volatils peuvent être utilisés. Le véhicule est pulvérisé sur, ou mélangé à, une petite quantité, 2,5 g par exemple, de sable quartzique fin. Ensuite, le véhicule est éliminé par évaporation sous une hotte durant au moins une heure. Ce mélange de sable quartzique et du produit chimique testé est ajouté au sol préhumidifié, auquel il sera mélangé complètement après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est introduit dans les récipients expérimentaux.

22. Pour les substances peu solubles dans l'eau et les solvants organiques, on mélange l'équivalent de 2,5 g de sable quartzique finement broyé par récipient expérimental à la quantité nécessaire du produit chimique testé pour obtenir la concentration expérimentale voulue. Ce mélange de sable quartzique et du produit chimique testé est ajouté au sol préhumidifié, auquel il sera mélangé complètement après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est réparti entre les récipients expérimentaux. On répète la procédure pour chaque concentration expérimentale et on prépare un témoin approprié.

23. En principe, les produits chimiques ne devraient pas être mis à l'essai à des concentrations supérieures à 1 000 mg/kg de masse sèche de sol. Cependant, certains objectifs expérimentaux particuliers pourront exiger des concentrations supérieures.

CONDUITE DES ESSAIS

Groupes traités et témoins

24. Pour chaque concentration expérimentale, une quantité de sol d'essai correspondant à 20 g de poids sec est placée dans le récipient expérimental (voir paragraphes 19-21). On prépare également des récipients témoins sans produit chimique testé. La nourriture est introduite dans chaque récipient selon les procédures décrites au paragraphe 29. Dix vers choisis au hasard sont assignés à chaque récipient expérimental. Les vers sont soigneusement transférés dans les récipients et déposés à la surface du sol à l'aide de pinces, de crochets ou d'anses, par exemple. Le nombre d'expériences identiques pour les concentrations expérimentales et les témoins dépend de la conception de l'essai (voir paragraphe 34). Les récipients expérimentaux sont placés au hasard dans l'incubateur et leurs emplacements sont modifiés au hasard chaque semaine.

25. Si le produit chimique testé est appliqué à l'aide d'un véhicule, une série de témoins contenant du sable quartzique sur lequel le solvant a été pulvérisé ou auquel le solvant a été mélangé devrait être mise à l'essai parallèlement à la série traitée avec le produit chimique testé. La concentration du solvant ou du dispersant devrait être identique à celle utilisée dans les récipients expérimentaux contenant le produit chimique testé. Une série de témoins contenant un supplément de sable quartzique (2,5 g par récipient) devrait aussi être mise à l'essai pour les produits chimiques administrés conformément à la procédure décrite au paragraphe 21.

Conditions expérimentales

26. La température expérimentale est de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Pour dissuader les vers de s'échapper du sol, l'essai est mené sous des cycles réglés de lumière et d'obscurité (de préférence 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité), avec un éclairage de 400 à 800 lux dans la zone des récipients expérimentaux.

27. Pour vérifier l'humidité du sol, on pèse les récipients au début de l'essai, puis une fois par semaine. La perte de poids est compensée par l'ajout d'une quantité équivalente d'eau désionisée. Remarquons que la perte d'eau peut être réduite par le maintien d'un taux d'humidité de l'air élevé (>80%) dans l'incubateur.

28. Le taux d'humidité et le pH sont à mesurer au début et à la fin de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations et de l'essai proprement dit. Les mesures doivent être effectuées sur des échantillons de sol traités (à toutes les concentrations) et témoins, préparés et entretenus de la même manière que les cultures expérimentales, mais ne contenant pas de vers. La nourriture ne sera ajoutée à ces échantillons de sol qu'au début de l'essai, afin de faciliter l'activité microbienne, et ce dans des quantités identiques à celles administrées aux cultures expérimentales. Il n'est pas nécessaire d'ajouter plus de nourriture dans ces récipients au cours de l'essai.

Alimentation

29. On utilisera une nourriture à même de satisfaire aux besoins de la population d'enchytrées. Les flocons d'avoine, de préférence autoclavés avant l'emploi pour éviter une contamination microbienne (un traitement à la chaleur convient également) constituent une nourriture appropriée.

30. La première fois, on administre la nourriture en mélangeant 50 mg de flocons d'avoine moulus au sol de chaque récipient, avant d'y introduire les vers. Par la suite, la nourriture est dispensée une fois par semaine jusqu'au 21^{ème} jour. Aucune nourriture n'est fournie le 28^{ème} jour, car à cette date les adultes auront été enlevés et les vers juvéniles ne demandent désormais qu'un supplément relativement minime de nourriture. Au cours de l'essai, on introduit 25 mg de flocons d'avoine moulus dans chaque récipient, en les déposant soigneusement à la surface du sol de façon à éviter de blesser les vers. Pour réduire la croissance fongique, on enfouit les flocons d'avoine dans le sol en les recouvrant de petites quantités de sol. Si des restes de nourriture subsistent, on diminue la ration.

Conception de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations

31. Si nécessaire, un essai de détermination de l'ordre de grandeur sera mené avec, par exemple, cinq concentrations expérimentales : 0,1, 1,0, 10, 100 et 1 000 mg/kg (masse sèche de sol). Une expérience par concentration et par témoin suffit.

32. L'essai de détermination de l'ordre de grandeur dure deux semaines. À la fin de l'essai, on évalue la mortalité des vers. Un ver est consigné comme mort s'il ne réagit pas à un stimulus mécanique appliqué à l'extrémité antérieure. Outre le taux de mortalité, il pourrait être utile de disposer d'autres informations pour sélectionner la gamme de concentrations à appliquer dans l'essai proprement dit. Des modifications du comportement des adultes (par exemple, s'ils deviennent incapables de creuser le sol, s'ils restent prostrés contre la paroi en verre du récipient) et de leur morphologie (par exemple, des blessures ouvertes) devraient, par conséquent, aussi être notées, de même que la présence de vers juvéniles. Cette dernière peut être déterminée par la méthode de coloration décrite à l'Annexe 6.

33. La moyenne géométrique des données de la mortalité donne une idée approximative de la CL_{50} . On établit la gamme de concentrations pour l'essai proprement dit, en supposant que les effets sur la reproduction sont inférieurs à ceux de la CL_{50} d'un facteur pouvant aller jusqu'à 10. Il ne s'agit toutefois que d'une relation empirique, susceptible de ne pas se vérifier dans des cas particuliers. Les observations supplémentaires effectuées au cours de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur, telles que la présence de vers juvéniles, peuvent permettre d'ajuster plus finement la gamme de concentrations expérimentales à appliquer dans l'essai proprement dit.

34. Pour déterminer la CL_{50} avec précision, on recommande de conduire l'essai en y incluant au moins quatre expériences identiques par concentration expérimentale et un nombre suffisant de concentrations pour obtenir au moins quatre résultats moyens différents et statistiquement significatifs à ces concentrations. Le cas échéant, un nombre identique de concentrations et d'expériences identiques sera mis à l'essai pour les témoins.

Conception de l'essai de reproduction proprement dit

35. Trois conceptions, s'appuyant sur les recommandations émises à l'issue d'un essai tournant sont proposées (2) :

- Pour déterminer la CSEO, tester au moins cinq concentrations formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques par concentration expérimentale et huit témoins. Les concentrations devraient être espacées d'un facteur ne dépassant pas 1,8.

- Pour déterminer la CE_x (CE_{10} , CE_{50} , par exemple), tester au moins cinq concentrations couvrant la CE_x , de façon à interpoler la CE_x au lieu de l'extrapoler. Il est recommandé d'inclure au moins quatre expériences identiques par concentration expérimentale et quatre témoins identiques. Le facteur d'espacement peut varier : il est inférieur ou égal à 1,8 dans la gamme censée produire un effet et supérieur à 1,8 aux concentrations supérieures et inférieures.
- Une approche combinée permet de déterminer à la fois la CSEO et la CE_x . Pour ce faire, on utilise huit concentrations formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques par concentration et huit témoins. Les concentrations sont espacées d'un facteur n'excédant pas 1,8.

36. Chaque récipient expérimental contient dix vers adultes (voir paragraphe 23). La nourriture est déposée dans les récipients expérimentaux au début de l'essai, puis une fois par semaine (voir paragraphe 29) jusqu'au 21^{ème} jour inclus. Le 21^{ème} jour, on prélève soigneusement à la main les échantillons de sol, afin d'observer et de compter les vers adultes vivants et de recenser leurs éventuels changements de comportement (incapacité de creuser le sol, prostration contre la paroi en verre du récipient expérimental, par exemple) et de morphologie (blessures ouvertes, par exemple). Tous les vers adultes sont ensuite retirés des récipients expérimentaux et du sol d'essai. Les adultes sont alors euthanasiés de façon humaine, préférablement par congélation rapide à -80°C ou par cryopréservation. Le sol d'essai renfermant des cocons est incubé durant trois semaines supplémentaires dans les mêmes conditions expérimentales, à ceci près que la nourriture n'est administrée que le 35^{ème} jour (25 mg de flocons d'avoine moulus par récipient).

37. Après six semaines, les vers éclos sont comptés. On recommande d'appliquer la méthode de coloration au rouge de Bengale (voir Annexe 6), bien que d'autres techniques d'extraction et de flottation par voie humide (mais sans chauffage) (voir Annexe 6) aient également fait leurs preuves (4)(10)(11)(20). La coloration au rouge de Bengale est recommandée car l'extraction par voie humide à partir d'un sol peut être gênée par la turbidité causée par les particules d'argile en suspension. À la fin de l'essai, les vers nouvellement émergés sont comptés et euthanasiés de façon humaine, préférablement par congélation rapide à -80°C ou par cryopréservation.

Essai limite

38. Si la concentration la plus élevée (1 000 mg/kg) de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur n'engendre aucun effet, l'essai de reproduction peut être conduit comme un essai limite, à la dose de 1 000 mg/kg pour démontrer que la CSEO sur la reproduction est supérieure à cette valeur.

Résumé et calendrier de l'essai

39. Les étapes de l'essai peuvent se résumer comme suit :

Calendrier	Essai de détermination de l'ordre de grandeur des concentrations	Essai proprement dit
Jour -7 ou précédents	- Préparer le sol artificiel (mélanger les ingrédients secs)	- Préparer le sol artificiel (mélanger les ingrédients secs)
Jour -5	- Vérifier le pH du sol artificiel - Mesurer la capacité de rétention d'eau maximale du sol	- Vérifier le pH du sol artificiel - Mesurer la capacité de rétention d'eau maximale du sol
Jour -5 à -3	- Trier les vers en vue de leur acclimatation	- Trier les vers en vue de leur acclimatation
Jour -3 à 0	- Acclimater les vers durant au moins 24 heures	- Acclimater les vers durant au moins 24 heures
Jour -1	- Préhumidifier le sol artificiel et le diviser en lots	- Préhumidifier le sol artificiel et le diviser en lots
Jour 0	- Préparer les solutions mères - Appliquer le produit chimique testé - Peser le substrat expérimental (sol) dans les récipients expérimentaux - Y incorporer la nourriture - Introduire les vers - Mesurer le pH du sol et le taux d'humidité	- Préparer les solutions mères - Appliquer le produit chimique testé - Peser le substrat expérimental dans les récipients expérimentaux - Y incorporer à la nourriture - Introduire les vers - Mesurer le pH du sol et le taux d'humidité
Jour 7	- Vérifier le taux d'humidité du sol	- Vérifier le taux d'humidité du sol - Administrer la nourriture
Jour 14	- Déterminer la mortalité adulte - Estimer le nombre de vers juvéniles - Mesurer le pH du sol et le taux d'humidité	- Vérifier le taux d'humidité du sol - Administrer la nourriture
Jour 21		- Observer le comportement des adultes - Retirer les adultes - Déterminer la mortalité adulte - Vérifier le taux d'humidité du sol - Administrer la nourriture
Jour 28		- Vérifier le taux d'humidité du sol - Ne pas administrer de nourriture
Jour 35		- Vérifier le taux d'humidité du sol - Administrer la nourriture
Jour 42		- Compter les vers juvéniles - Mesurer le pH et le taux d'humidité du sol

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

40. La présente Ligne directrice ne prescrit aucune démarche statistique stricte pour analyser les résultats de l'essai, bien que l'Annexe 7 en présente les grandes lignes.

41. Dans l'essai de détermination de l'ordre de grandeur, le principal effet observé est la mortalité. Les changements comportementaux (par exemple, l'incapacité de creuser le sol ; la prostration contre la paroi du récipient expérimental) ou morphologiques (par exemple des blessures ouvertes) chez les vers adultes doivent néanmoins aussi être enregistrés, de même que la présence de vers juvéniles. Il faut normalement appliquer l'analyse probit (21) ou la régression logistique pour déterminer la CL_{50} . Toutefois, dans les cas où cette méthode d'analyse ne convient pas (par exemple si l'on obtient moins de trois concentrations engendrant une mortalité partielle), d'autres méthodes peuvent être utilisées, notamment les moyennes mobiles (22), la méthode de Spearman-Kärber simplifiée (23) ou une simple interpolation (par exemple la moyenne géométrique de la CL_0 et de la CL_{100} , calculée en multipliant la racine carrée de la CL_0 par la CL_{100}).

42. Dans l'essai proprement dit, l'effet observé est la fécondité (c'est-à-dire le nombre de vers juvéniles produits). Néanmoins, comme dans l'essai de détermination de l'ordre de grandeur, tous les autres signes de nocivité doivent être consignés dans le rapport final. Pour calculer les résultats de la reproduction, il faut connaître la moyenne arithmétique et l'écart-type par traitement et par témoin afin d'effectuer l'analyse statistique.

43. Si on a pratiqué une analyse de la variance, l'écart-type, s , et les degrés de liberté, dl , peuvent être remplacés respectivement par l'estimation de la variance « fusionnée » obtenue par analyse de la variance (ANOVA) et par ses degrés de liberté, à condition que la variance ne dépende pas de la concentration. Dans ce cas, on utilisera les variances uniques des témoins et des échantillons traités. On calcule généralement ces valeurs à l'aide d'un logiciel statistique commercial, en utilisant les résultats par récipient comme des expériences identiques. Si la fusion des résultats relatifs aux témoins négatifs et au(x) témoin(s) contenant le solvant semble plus pertinente que de calculer les résultats de l'essai comparativement à l'un de ces deux témoins, il faudra vérifier à l'aide d'un test qu'ils ne présentent pas de différence significative (pour les tests appropriés, voir aux paragraphes 45 et à l'Annexe 7).

44. Si les résultats des expériences identiques présentent une distribution normale et des variances homogènes, d'autres tests statistiques et déductions pourront être effectués.

Estimation de la CSEO

45. Il est préférable d'appliquer des tests puissants. Il faudrait savoir si les données ont une distribution à peu près normale, en se reportant, par exemple, aux expériences précédentes (essais tournants) ou à d'autres données antérieures. L'homogénéité de la variance est plus déterminante. On a constaté empiriquement que la variance s'accroît souvent lorsque la moyenne s'accroît. Dans ce cas, une transformation des données pourrait déboucher sur l'homogénéité de la variance. Néanmoins, cette transformation devrait s'appuyer sur des données antérieures plutôt que sur les données en cours d'étude. En présence de données homogènes, il faudrait recourir à des tests t de comparaison multiple, tels que le test de Williams ($\alpha = 0,05$, unilatéral) (24)(25), ou, dans certains cas, le test de Dunnett (26)(27). Remarquons que, dans le cas d'une reproduction inégale, les valeurs de t en tableau doivent être corrigées, comme l'ont suggéré Dunnett et Williams. En présence d'une variation importante, il peut arriver que la

croissance ou la décroissance des résultats ne soit pas régulière. Avec un tel écart à la monotonie, le test de Dunnett est plus approprié. Si la variance n'est pas homogène, il peut être utile d'examiner de plus près les répercussions possibles sur la variance afin de déterminer si les tests *t* peuvent être appliqués sans perdre beaucoup en puissance (28). Sinon, un test *U* de comparaison multiple, par exemple un test *U* de Bonferroni selon Holm (29), ou, si ces données présentent une variance hétérogène, mais concordent par ailleurs avec une relation dose-effet sous-jacente monotone, un autre test non paramétrique [par exemple un test de Jonckheere-Terpstra (30)(31) ou de Shirley (32)(33)] peuvent être appliqués et sont généralement préférables aux tests *t* à variance inégale. (voir aussi le schéma exposé à l'Annexe 7).

46. Si un essai limite a été conduit et que les conditions requises par les tests paramétriques (normalité, homogénéité) sont remplies, le test *t* de Student en paire peut être utilisé ou, sinon, le test *U* de Mann-Whitney (29).

Estimation de la CE_x

47. Pour calculer une quelconque valeur de CE_x , on utilise la moyenne par traitement dans l'analyse de la régression (linéaire ou non linéaire), après avoir obtenu une fonction dose-effet appropriée. S'agissant de la croissance des vers considérée comme une réponse continue, les valeurs de la CE_x peuvent être estimées à l'aide d'une analyse de la régression adéquate (35). Les fonctions appropriées aux résultats épousant une valeur de tout ou rien (mortalité/survie et nombre de descendants produits) sont les fonctions sigmoïdes normales, logistiques ou de Weibull, à deux ou quatre paramètres, dont certaines peuvent aussi modéliser des réponses hormétiques. Si la fonction dose-effet a été ajustée par une analyse de la régression linéaire, il faudrait trouver un r^2 (coefficient de détermination) et/ou une pente significatifs avant d'estimer la CE_x en insérant une valeur correspondant à $x\%$ de la moyenne du témoin dans l'équation obtenue par l'analyse de la régression. Des limites de confiance à 95% sont calculées selon la méthode de Fieller (mentionnée par Finney (21)) ou par une autre méthode récente appropriée.

48. Sinon, la réponse est modélisée comme un pourcentage ou une proportion du paramètre du modèle, paramètre qui est interprété comme le résultat moyen du témoin. Dans ce cas, la courbe sigmoïde normale (logistique, Weibull) peut souvent être facilement ajustée aux résultats à l'aide de la régression probit (21). Dans ce cas, la fonction de pondération doit être ajustée pour les résultats métriques selon Christensen (36). Cependant, si on observe une hormèse, l'analyse probit doit être remplacée par une fonction logistique ou de Weibull à quatre paramètres, ajustée par une régression non linéaire (37). S'il est impossible d'ajuster une fonction dose-effet appropriée aux données, d'autres méthodes peuvent être utilisées pour estimer la CE_x et ses limites de confiance, telles que les moyennes mobiles d'après Thompson (22) et la méthode simplifiée de Spearman-Kärber (23).

Rapport d'essai

49. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

Produit chimique testé : nature physique et propriétés physico-chimiques pertinentes :

- Données d'identification chimique;
- Substance mono-constituant :

apparence physique, hydro-solubilité et autres propriétés physico-chimiques pertinentes ;

identification chimique, telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).

- Substance multi-constituants, UVBC et mélanges :
caractérisés autant que possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), la teneur et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.
Espèce d'expérience
 - animal d'expérience utilisé : espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage.
 Conditions expérimentales :
 - ingrédients et préparation du sol artificiel ;
 - méthode d'application du produit chimique testé ;
 - description des conditions expérimentales, notamment la température, le taux d'humidité, le pH, etc. ;
 - description complète de la conception de l'essai et du mode opératoire.
 Résultats de l'essai :
 - mortalité des vers adultes après deux semaines et nombre de vers juvéniles à la fin de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur ;
 - mortalité des vers adultes après trois semaines d'exposition et recensement complet des vers juvéniles à la fin de l'essai proprement dit ;
 - tout symptôme physique ou pathologique et changement comportemental observé chez les organismes d'expérience ;
 - CL₅₀, CSEO et/ou CE_x (par exemple CE₅₀, CE₁₀) pour la reproduction si certaines d'entre elles sont applicables avec des intervalles de confiance et représentation graphique du modèle ajusté utilisé pour leur calcul, toutes les informations et observations utiles à l'interprétation des résultats.
 Écarts par rapport aux procédures décrites dans la présente Ligne directrice et faits inhabituels survenus au cours de l'essai.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Römcke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen – Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.
- (2) Römcke, J. and Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.
- (3) Westheide, W. and Bethge Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system : guidelines and some results, In : Modern Ecology : Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D., pp 497-508, Elsevier, Amsterdam.

- (4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.
- (5) OCDE (Organisation de Développement et de Coopération Economiques) (1984) Ligne directrice 207 pour les essais de produits chimiques : «Ver de terre, Essais de toxicité aiguë». OCDE, Paris.
- (6) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1993). Qualité du sol – Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) – Partie 1 : Détermination de la toxicité aiguë en utilisant des substrats de sol artificiel. No 11268–1. ISO, Genève.
- (7) ISO (Organisation internationale de normalisation) (2012). Qualité du sol – Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre– Partie 2 : Détermination des effets sur la reproduction de *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. No 11268–2. ISO, Genève.
- (8) Rundgren, S. and A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia shagnetorum* (Vejdovsky 1877). In : Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.
- (9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23, 217-232.
- (10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.
- (11) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- (12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37, 2-29.
- (13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen – Prüfungskategorien der Forschung. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.
- (14) Römbke, J. and Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.
- (15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi, R. (2000). Enchytraeen als Testorganismen. In : Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (16) ISO (Organisation internationale de normalisation) (2005). Qualité du sol – Détermination du pH. No 10390. ISO, Genève.
- (17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. *Ann. Mus. Novitat.* 1902, 1-13.
- (18) Nielsen, C.O. and Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. *Natura Jutlandica* 8-9, 1-160.

- (19) Bouguenec, V. and Giani, N. (1987). Deux nouvelles espèces d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et redescription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9-22.
- (20) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.
- (21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (22) Finney, D.J. (1978). Statistical method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd., London.
- (23) Hamilton, M.A., Russo, R.C. and Thurston, R.V., (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719 ; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.
- (24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.
- (25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.
- (26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.
- (27) Dunnett, C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.
- (28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC : What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7 : 355-361.
- (29) Holm, S., (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.
- (30) Jonckheere, A.R. (1954). A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.
- (31) Terpstra, T.J. (1952). The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in one Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.
- (32) Shirley, E.A. (1979). The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.
- (33) Williams, D.A. (1986). A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.
- (34) Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1981). Biometry. The principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

- (35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18, 213-221.
- (36) Van Ewijk, P.H. and Hoekstra, J.A., (1993). Calculation of the EC₅₀ and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. *Ecotox, Environ. Safety.* 25, 25-32.

ANNEXE 1DÉFINITIONS

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente Ligne directrice :

La CE_x (concentration efficace à x%) est la concentration qui engendre un effet de x% sur les organismes d'expérience durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Dans cet essai, les concentrations efficaces sont exprimées en masse de produit chimique testé par masse sèche de sol expérimental.

La CL₀ (concentration non létale) désigne la concentration de produit chimique testé qui ne tue aucun des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL₀ s'exprime en masse de substance d'essai par masse sèche de sol expérimental.

La CL₅₀ (concentration létale moyenne) correspond à la concentration de produit chimique testé qui entraîne la mort de 50% des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL₅₀ s'exprime en masse de substance d'essai par masse sèche de sol expérimental.

La CL₁₀₀ (concentration totalement létale) correspond à la concentration de produit chimique testé qui entraîne la mort de 100% des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL₁₀₀ s'exprime en masse de substance d'essai par masse sèche de sol expérimental.

La CMEO (concentration minimale avec effet observé) est la plus faible concentration de produit chimique testé qui exerce un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$). Dans cet essai, la CMEO s'exprime en masse de produit chimique testé par masse sèche de sol expérimental. Toutes les concentrations expérimentales supérieures à la CMEO doivent normalement produire un effet statistiquement différent du résultat observé sur le témoin. Tous les écarts à ce qui précède dans la détermination de la CMEO doivent être justifiés dans le rapport d'essai.

La CSEO (concentration sans effet observé) désigne la plus haute concentration de produit chimique testé directement inférieure à la CMEO et à laquelle aucun effet n'est observé. Dans cet essai, la concentration correspondant à la CSEO n'a pas d'effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

Le taux de reproduction est le rapport du nombre moyen de vers juvéniles produits par le nombre d'adultes durant la période de l'essai.

ANNEXE 2DÉTERMINATION DE LA CAPACITÉ MAXIMALE DE RÉTENTION D'EAUDétermination de la capacité de rétention d'eau du sol artificiel

La méthode suivante a fait ses preuves. Elle est décrite à l'annexe C de la norme ISO DIS 11268-2

Prélevez une quantité déterminée (5 g, par exemple) du sol expérimental servant de substrat à l'aide d'un instrument approprié (tarière, etc.). Couvrez le fond de la tarière avec un morceau de papier filtre et, après l'avoir remplie d'eau, placez la sur un support dans un bain d'eau. La tarière doit être progressivement submergée jusqu'à ce que le niveau d'eau dépasse le sommet de la carotte de sol. Laissez la tarière dans l'eau durant environ trois heures. Comme l'eau absorbée par les capillaires du sol ne peut pas être retenue en totalité, laissez l'échantillon de sol dégorger durant deux heures en plaçant le tube sur un lit de sable quartzique fin très humide contenu dans un récipient fermé (pour empêcher le séchage). Pesez l'échantillon et séchez le à 105°C jusqu'à ce qu'il atteigne une masse constante. La capacité de rétention d'eau (CRE) se calcule comme suit :

$$\text{CRE (en \% de masse sèche)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

où :

S = masse du substrat saturé en eau + masse de la tarière + masse du papier filtre

T = tare (masse de la tarière + masse du papier filtre)

D = masse sèche du substrat

Références :

ISO 11268-2 : 2012 Qualité du sol – Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre – Partie 2 : Détermination des effets sur la reproduction de *Eisenia fetida/Eisenia andrei*, No. 11268-2. ISO, Genève.

ANNEXE 3DÉTERMINATION DU pH DU SOL

La méthode de détermination du pH d'un échantillon de sol, décrite ci-dessous, s'appuie sur la norme ISO 10390 (Qualité du sol – Détermination du pH).

Laissez sécher une quantité définie de sol à température ambiante durant au moins 12 heures. Confectionnez une suspension du sol (contenant au moins 5 g de sol) dans cinq fois le volume du sol soit d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M de qualité pour analyse, soit d'une solution de chlorure de calcium (CaCl_2) 0,01 M de qualité pour analyse. Agitez énergiquement la suspension durant cinq minutes. Laissez reposer la suspension durant au moins deux heures, mais pas plus de 24 heures. Mesurez le pH de la phase liquide à l'aide d'un pH-mètre, étalonné avant chaque mesure avec une série appropriée de solutions tampons (pH 4,0 et 7,0, par exemple).

Références :

ISO (Organisation internationale de normalisation) (1994). Qualité du sol – Détermination du pH. n° 10390. ISO, Genève.

ANNEXE 4CONDITIONS DE CULTURE D'*ENCHYTRAEUS* sp.

Les enchytrées de l'espèce *Enchytraeus albidus* (ainsi que d'autres espèces d'*Enchytraeus*) peuvent être cultivés dans de grandes boîtes en plastique (30 x 60 x 10 cm, par exemple) garnies d'un mélange 1/1 de sol artificiel et de sol naturel de jardin non contaminé. L'emploi de compost, qui risque de contenir des substances toxiques, telles que des métaux lourds, est à éviter. La faune doit être éliminée du sol avant utilisation de ce dernier (par congélation, par exemple). Un substrat composé uniquement de sol artificiel peut être utilisé, mais le taux de reproduction risque d'être inférieur à celui obtenu avec un sol mixte. Le substrat destiné à la culture doit avoir un pH de $6,0 \pm 0,5$.

La culture est gardée à l'obscurité à une température de 15 à $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La température ne devrait pas dépasser 23°C . Le sol doit rester humide sans s'engorger. L'humidité du sol est correcte si, lorsqu'on presse doucement une poignée de sol dans une main, de petites gouttes d'eau perlent entre les doigts. On évitera de créer des conditions anoxiques en s'assurant que les couvercles des récipients de culture autorisent suffisamment d'échanges gazeux avec l'atmosphère. Il faudrait retourner soigneusement le sol chaque semaine pour favoriser l'aération.

Les vers peuvent être nourris avec des flocons d'avoine. Les flocons doivent être conservés dans des récipients hermétiquement fermés, et autoclavés ou chauffés avant l'emploi afin de prévenir une infestation par des mites de la farine (*Glyzophagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*, par exemple) ou des mites prédatrices (*Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*, par exemple). Après avoir été chauffés, les flocons doivent être moulus de façon à pouvoir être facilement parsemés à la surface du sol. De temps à autre, la ration de flocons d'avoine pourra être enrichie de vitamines, de lait et d'huile de foie de morue. D'autres aliments, tels que la levure de boulanger et la nourriture pour poissons «Tetramin», conviennent également. La ration alimentaire est administrée environ deux fois par semaine. Une quantité appropriée de flocons d'avoine est répandue à la surface du sol ou délicatement mélangée au substrat lorsqu'on remue le sol pour favoriser l'aération. La quantité absolue de nourriture fournie dépend du nombre de vers peuplant le substrat. À titre indicatif, la ration doit être augmentée si elle est entièrement consommée le jour où elle a été donnée. Par contre, si des restes de nourriture subsistent encore à la surface du sol lors de l'administration de la deuxième ration (une semaine plus tard), la ration doit être diminuée. La nourriture contaminée par des champignons doit être enlevée et remplacée. Après trois mois, les vers sont transférés dans un substrat fraîchement préparé.

Les conditions de culture sont jugées satisfaisantes si les vers : a) ne tentent pas de quitter le substrat, b) se déplacent rapidement dans le sol, c) présentent une surface extérieure brillante sur laquelle les particules de sol n'adhèrent pas, d) ont une couleur plus ou moins blanchâtre, e) présentent diverses tranches d'âge et f) se reproduisent continuellement.

ANNEXE 5 (à titre d'information)CONDUITE DE L'ESSAI AVEC D'AUTRES ESPÈCES D'ENCHYTRAEUSSélection des espèces

Il est possible d'utiliser d'autres espèces qu'*E. albidus*, mais le mode opératoire et les critères de validité doivent être adaptés en conséquence. Comme de nombreuses espèces d'*Enchytraeus* sont faciles à se procurer et supportent bien les conditions de laboratoire, le critère le plus important pour sélectionner une espèce autre qu'*E. albidus*, est sa pertinence écologique et, d'autre part, sa sensibilité comparable. On est parfois obligé d'utiliser une autre espèce. Par exemple, dans les pays où *E. albidus* est absent et impossible à importer (en raison de restrictions imposées par une quarantaine, par exemple).

Exemples d'autres espèces appropriées

- *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe, 1992) : Ces dernières années, cette espèce a souvent été utilisée dans des études écotoxicologiques en raison de sa facilité d'élevage et de mise à l'essai. Néanmoins, elle est petite, ce qui la rend plus difficile à manipuler qu'*E. albidus* (en particulier aux stades précédant l'emploi de la méthode de coloration). L'existence d'*E. crypticus* dans la nature n'est pas certaine, cette espèce n'ayant été décrite que dans les cultures de lombrics. Aussi, ses besoins écologiques sont-ils inconnus.

- *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky, 1879) : Ce nom recouvre probablement un groupe d'espèces très proches, difficiles à distinguer sur le plan morphologique. Son usage à des fins expérimentales est déconseillé si les individus destinés à l'essai ne peuvent être identifiés jusqu'au niveau de l'espèce. *E. buchholzi* fréquente habituellement les prairies et des sites dérangés tels que les bords de routes.

- *Enchytraeus luxuriosus* : Dénommée à l'origine *E. minutus*, cette espèce a été décrite récemment (1). Elle a été découverte pour la première fois par U. Graefe (Hambourg) dans une prairie proche de St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, Allemagne). *E. luxuriosus* atteint environ la moitié de la taille d'*E. albidus*, mais est plus grand que les autres espèces décrites ici ; ce qui pourrait en faire un bon remplaçant d'*E. albidus*.

- *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen, 1963) : Jusqu'à présent, la présence de cette espèce a été signalée dans des sols minéraux allemands et espagnols, où elle est commune, mais généralement pas très abondante. En comparaison avec d'autres petites espèces de ce genre, elle est relativement facile à identifier. On ne sait rien de son comportement dans des essais de laboratoire, ni de sa sensibilité aux produits chimiques. Néanmoins, elle s'est avérée facile à cultiver (E. Belotti, communication personnelle).

Conditions d'élevage

Toutes les espèces d'*Enchytraeus* susmentionnées peuvent être cultivées sur les mêmes substrats qu'*E. albidus*. Comme elles sont plus petites, elles peuvent être cultivées dans des récipients plus petits et recevoir une ration alimentaire de la même composition, mais plus réduite. Ces espèces ayant un cycle de vie plus court qu'*E. albidus*, elles doivent être nourries plus fréquemment.

Conditions expérimentales

Les conditions expérimentales sont généralement identiques à celles qui s'appliquent à *E. albidus*, à ceci près que :

- la dimension des récipients expérimentaux peut (mais ne doit pas) être inférieure ;
- la durée de l'essai de reproduction peut (mais ne doit pas) être plus courte, c'est-à-dire quatre au lieu de six semaines, mais la durée de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur ne doit pas être modifiée ;
- compte tenu de la petitesse des vers juvéniles, l'utilisation de la méthode de coloration est fortement recommandée pour le comptage ;
- le critère de validité relatif au «nombre de vers juvéniles par récipient témoin» doit être porté à 50.

Référence

Schmelz, R.M. and Collado, R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (*Enchytraeidae*, *Clitellata*, *Annelida*). *Carolinae* 57, 93-100.

ANNEXE 6DESCRIPTION DÉTAILLÉE DES TECHNIQUES D'EXTRACTIONColoration au rouge de Bengale

Cette méthode, développée à l'origine en écologie limnique (1) a été proposée la première fois pour le dénombrement des enchytrées juvéniles dans un essai de reproduction des enchytrées par W. de Coen (Université de Gand, Belgique). Une version modifiée (rouge de Bengale mélangé avec du formaldéhyde au lieu de l'éthanol) a été mise au point indépendamment par le RIVM (Bilthoven, Pays-Bas) (2)(3).

À la fin de l'essai proprement dit (après six semaines), le sol des récipients expérimentaux est transféré dans un récipient peu profond. Un récipient Bellaplast ou une cuve de développement photographique munie d'un fond strié sont utiles à cet effet, et ce, dans le cas de la cuve, parce que les stries restreignent le mouvement des vers dans le champ d'observation. Les vers juvéniles sont fixés avec de l'éthanol (environ 5 ml par expérience identique). Ensuite, les récipients sont remplis d'eau sur une hauteur de 1 à 2 cm. On ajoute quelques gouttes (200 à 300 µl) de rouge de Bengale (solution à 1% dans de l'éthanol) ou d'une solution d'éosine à 0,5% et les deux composés sont soigneusement mélangés. Après 12 heures, les vers devraient présenter une coloration rougeâtre et être faciles à compter car ils reposeront à la surface du substrat. Une autre possibilité consiste à tamiser le mélange substrat/alcool (dimension des mailles : 0,250 mm) avant le comptage des vers. De cette manière, la kaolinite, la tourbe et une partie du sable seront évacuées à travers le tamis et les vers colorés en rouge seront plus faciles à voir et à compter. L'utilisation de loupes éclairées (dimension des lentilles : au moins 100 x 75 mm, avec un facteur d'agrandissement de 2 à 3) facilitera également le comptage.

La technique de coloration réduit la durée du comptage à quelques minutes par récipient et, à titre indicatif, une seule personne devrait pouvoir évaluer tous les récipients d'un essai en deux jours maximum.

Extraction par voie humide

L'extraction par voie humide doit être pratiquée immédiatement après la fin de l'essai. Le sol de chaque récipient expérimental est versé dans des tamis en plastique dont les trous mesurent environ 1 mm. Les tamis sont ensuite suspendus dans des bols en plastique sans toucher le fond. On verse doucement de l'eau dans les bols jusqu'à ce que les échantillons contenus dans les tamis soient complètement submergés. Pour obtenir un taux de récupération de plus de 90% des vers présents, la période d'extraction doit durer 3 jours à $20 \pm 2^\circ\text{C}$. À la fin de la période d'extraction, on enlève les tamis et on laisse l'eau décanter lentement (exception faite d'une petite quantité), en prenant soin de ne pas remuer le sédiment au fond des bols. Ensuite, on agite légèrement les bols en plastique pour suspendre le sédiment dans l'eau sus-jacente. L'eau est transférée dans une boîte de Petri et, après le dépôt des particules de sol, les enchytrées peuvent être identifiées, enlevées et comptées sous un stéréomicroscope, à l'aide de pinces souples en acier.

Flottation

Une méthode fondée sur la flottation a été décrite dans une note rédigée par R. Kuperman (4). Après avoir fixé le contenu du récipient expérimental avec de l'éthanol, on submerge le sol en versant du Ludox (silice colloïdale AM-30, suspension aqueuse à 30% en poids) jusqu'à une hauteur de 10 à 15 mm au-dessus de la surface du sol. Après que le sol a été bien mélangé à l'agent de flottation durant 2 à 3 minutes, les vers juvéniles flottant à la surface se comptent aisément.

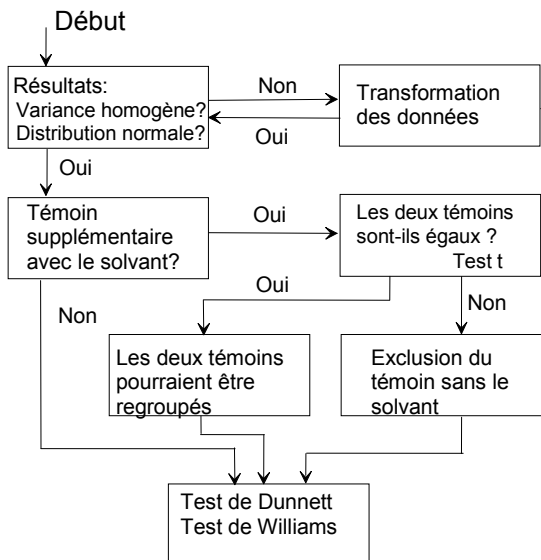
Références

- (1) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom fauna samples before sorting, *Vestnik Československo Spolecnosti Zoologicke* 32, 300-305.
- (2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.
- (3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. en Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. *Ecotox. Envir. Safety* 38, 108-121.
- (4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. and Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, p. 157.

ANNEXE 7

**DESCRIPTION SCHÉMATIQUE DE L'ÉVALUATION STATISTIQUE DES RÉSULTATS
(DÉTERMINATION DE LA CSEO)**

Tests paramétriques



Tests non paramétriques

