

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

## **Essai de reproduction chez le ver de terre (*Eisenia fetida* / *Eisenia andrei*)**

### **INTRODUCTION**

1. La présente Ligne directrice pour les essais est destinée à évaluer les effets des produits chimiques testés dans le sol sur le taux de reproduction (et sur d'autres critères sub-létaux) de deux espèces de lombric : *Eisenia fetida* (Savigny 1826) ou *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2). Cet essai a fait l'objet d'un essai tournant (3). L'OCDE a publié une Ligne directrice pour les essais de toxicité aiguë sur le ver de terre (4). Plusieurs autres lignes directrices nationales et internationales pour les essais de toxicité aiguë et chronique sur le lombric ont été publiées (5)(6)(7)(8).

2. *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* sont considérés comme des représentants de la pédofaune et des vers de terre en particulier. Il existe des informations de référence sur l'écologie des vers de terre et leur utilisation dans les essais d'écotoxicité (7)(9)(10)(11)(12).

### **PRINCIPE DE L'ESSAI**

3. Les vers adultes sont exposés à une série de concentrations du produit chimique testé, soit mélangée au sol, soit, dans le cas des pesticides, appliquée dans ou sur le sol selon des procédures imitant le mode d'emploi du produit chimique testé. La méthode d'application dépend de la finalité de l'essai. La gamme de concentrations choisie doit couvrir les concentrations susceptibles de provoquer des effets à la fois sub-létaux et létaux sur une période de huit semaines. La mortalité et les effets sur la croissance des vers adultes sont déterminés après quatre semaines d'exposition. Ensuite, les adultes sont extraits du sol et on évalue les effets sur la reproduction à l'issue des quatre semaines suivantes en comptant le nombre de descendants présents dans le sol. On compare le taux de reproduction des vers 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  $CE_{10}$ ,  $CE_{50}$ ), en utilisant un modèle de régression pour estimer la concentration qui entraînerait une réduction de x% du taux de reproduction. Les concentrations expérimentales doivent couvrir la  $CE_x$  ( $CE_{10}$ ,  $CE_{50}$ , par exemple) de façon à ce que la  $CE_x$  soit interpolée plutôt qu'extrapolée (voir les définitions à l'Annexe 1).

### **INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE TESTÉ**

4. Il faudrait connaître les informations suivantes sur le produit chimique testé pour pouvoir définir le mode opératoire approprié :

- hydrosolubilité ;

- $\log K_{oe}$  ;
- pression de vapeur ;
- si possible, données sur le devenir et le comportement dans l'environnement (par exemple, vitesse de photolyse et d'hydrolyse si ces paramètres sont pertinents au regard du mode d'application de la substance d'essai).

5. Cette Ligne directrice convient à l'essai de produits chimiques 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 No. 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.

6. 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.

#### **SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE**

7. Il faut déterminer la CSEO et/ou la  $CE_x$  d'une substance de référence pour s'assurer que les conditions expérimentales du laboratoire sont adéquates et vérifier que la réaction des organismes d'expérience ne change pas de façon statistiquement significative au fil du temps. Il est conseillé de tester une substance de référence au moins une fois par an, ou, lorsque les essais sont conduits moins fréquemment, parallèlement à la détermination de la toxicité d'un produit chimique testé. La carbendazime ou le bénomyl, qui affectent la reproduction, conviennent comme substances de référence (3). Des effets appréciables devraient apparaître entre a) 1 et 5 mg d'ingrédient actif/kg de masse sèche ou b) 250-500 g/ha ou 25-50 mg/m<sup>2</sup>. 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.

#### **VALIDITÉ DE L'ESSAI**

8. Les témoins devraient satisfaire aux critères suivants pour que le résultat de l'essai soit considéré comme valide :

- chaque expérience identique (sur 10 adultes) aura produit au moins 30 vers juvéniles à la fin de l'essai ;
- le coefficient de variation de la reproduction est  $\leq$  à 30% ;
- la mortalité adulte durant les quatre premières semaines de l'essai est  $\leq$  à 10%.

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

#### **DESCRIPTION DE L'ESSAI**

**Matériel**

9. Il convient d'utiliser des récipients expérimentaux en verre ou en un autre matériau chimiquement inerte d'une capacité d'un à deux litres. Les récipients doivent avoir une section horizontale d'environ 200 cm<sup>2</sup>, de sorte que l'ajout de 500 à 600 g de masse sèche de substrat donne un volume de substrat humide d'une profondeur de 5 à 6 cm. La forme du récipient doit permettre les échanges gazeux entre le substrat et l'atmosphère et laisser passer la lumière (couvercle transparent perforé, par exemple), tout en empêchant la fuite des vers. Si la quantité de substrat utilisée est nettement supérieure à 500 à 600 g par récipient expérimental, le nombre de vers doit être augmenté proportionnellement.

10. Cet essai requiert du matériel de laboratoire courant, 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 ;
- bain d'eau.

**Préparation du sol artificiel**

11. 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 (pH aussi proche que possible de 5,5-6,0, pas de résidus visibles de plantes, finement broyée, séchée jusqu'à atteindre un taux d'humidité donné, mesuré) ;
- 20% d'argile kaolinique (taux de kaolinite de préférence supérieur à 30%) ;
- 0,3 à 1,0% de carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub> pulvérisé, de qualité pour analyse) pour obtenir un pH initial de 6,0±0,5 ;
- 70% de sable quartzique (selon la quantité de CaCO<sub>3</sub> nécessaire) séché à l'air, composé en majorité de sable fin (plus de 50% des particules mesurent entre 50 et 200 µm).

Remarque 1 : La quantité de CaCO<sub>3</sub> requise dépendra des ingrédients du sol, y compris la nourriture, et devrait être déterminée par des mesures effectuées sur des sous-échantillons de sol immédiatement avant l'essai. Le pH est mesuré sur un échantillon de sol mélangé à une solution 1 M de chlorure de potassium (KCl) ou à une solution 0,01 M de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>)(13).

Remarque 2 : Il est possible de réduire la teneur en carbone organique du sol artificiel, par exemple en ramenant le pourcentage de tourbe à 4-5% et en augmentant le taux de sable en conséquence. Cette

réduction de la teneur en carbone organique est susceptible de diminuer les possibilités d'adsorption du produit chimique testé sur le sol (carbone organique) et d'augmenter la disponibilité de la substance d'essai pour les vers. Il a été démontré qu'*Eisenia fetida* 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 (2,7%, par exemple) (14), et on a constaté expérimentalement 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. Par conséquent, avant d'utiliser ce type de sol dans l'essai proprement dit, il n'est pas nécessaire de démontrer que le sol artificiel permet de répondre aux critères de validité, à moins que le taux de tourbe soit inférieur aux valeurs indiquées ci-dessus.

Remarque 3: 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.

12. Les ingrédients secs du sol sont mélangés complètement (dans un grand mélangeur de laboratoire, par exemple) dans un endroit bien ventilé. Avant d'entamer l'essai, on humidifiera le sol artificiel sec avec suffisamment d'eau désionisée pour lui conférer environ la moitié de sa teneur finale en eau, à savoir 40% à 60% de la capacité maximale de rétention d'eau (équivalant à  $50 \pm 10\%$  d'humidité par masse sèche). De cette manière, on obtient un substrat qui ne rejette pas d'eau libre ou dormante lorsqu'on le presse dans la main. La capacité maximale de rétention d'eau du sol artificiel est déterminée conformément à la procédure décrite à l'Annexe 2 ou à la norme ISO 11274 (15).

13. Si le produit chimique testé est appliqué à la surface du sol ou mélangée au sol sans eau, la quantité finale d'eau peut être mélangée au sol artificiel durant la préparation du sol. Si la substance d'essai est mélangée au sol avec une certaine quantité d'eau, l'eau supplémentaire peut être ajoutée en même temps que la substance d'essai (voir paragraphe 19).

14. Le taux d'humidité du sol est déterminé au début et à la fin de l'essai, conformément à la norme ISO 11465 (16), et le pH du sol, suivant les instructions données à l'Annexe 3 ou la norme ISO 10390 (13). Ces déterminations devraient être conduites sur un échantillon de sol témoin et sur un échantillon de sol de chaque concentration de la substance d'essai. Le pH du sol ne doit pas être ajusté lorsque des substances acides ou basiques sont mises à l'essai. Il faudrait vérifier le taux d'humidité tout au long de l'essai en pesant périodiquement les récipients (voir paragraphe 26 et 30).

### **Sélection et préparation des animaux d'essai**

15. L'espèce utilisée dans cet essai est *Eisenia fetida* ou *Eisenia andrei* (1)(2). Au début de l'essai, les vers sont adultes, âgés de deux mois à un an et pourvus d'un clitellum. Les vers devraient provenir d'une culture synchronisée offrant une structure d'âge relativement homogène (Annexe 4). L'âge des individus d'un même groupe d'essai ne devrait pas s'écarter de plus de 4 semaines.

16. On acclimate les vers sélectionnés pendant au moins un jour dans le type de sol artificiel utilisé pendant l'essai. Durant cette période, les vers reçoivent la même nourriture qu'au cours de l'essai (voir paragraphes 31 à 33).

17. Des groupes de dix vers sont pesés individuellement et répartis au hasard, par groupes de dix, dans les récipients expérimentaux au début de l'essai. Avant la pesée, les vers sont lavés avec de l'eau désionisée, puis l'excès d'eau est éliminé en plaçant les vers sur un papier filtre. Il convient que la masse

humide de chaque ver soit comprise entre 250 et 600 mg pour *E. andrei* et entre 300 et 600mg pour *E. fetida*.

### **Préparation des concentrations expérimentales**

18. Deux méthodes d'application du produit chimique testé peuvent être utilisées : mélanger le produit chimique testé au sol (voir paragraphes 19 à 21) ou l'appliquer à la surface du sol (voir paragraphes 22 à 24). La sélection de la méthode appropriée dépend de la finalité de l'essai. On recommande, en général, de mélanger le produit chimique testé au sol. Cependant, il convient parfois de simuler les pratiques agricoles normales (par exemple, la pulvérisation de préparations liquides ou l'utilisation de présentations spéciales de pesticides telles que les granulés ou des produits de traitement des semences). Les solvants choisis pour faciliter le traitement du sol par le produit chimique testé seront peu toxiques pour les vers de terre et l'essai inclura un témoin traité au solvant, le cas échéant (voir paragraphe 27).

### **Incorporer le produit chimique testé au sol**

#### **Produit chimique testé hydrosoluble**

19. Une solution du produit chimique testé dans de l'eau désionisée est préparée juste avant le début de l'essai, en quantité suffisante pour toutes les expériences menées à la même concentration. Il est parfois nécessaire de faciliter la préparation de la solution expérimentale à l'aide d'un co-solvant. On prépare suffisamment de solution pour atteindre le taux d'humidité final (40 à 60% de la capacité maximale de rétention d'eau). La solution est mélangée complètement au sol avant d'être introduite dans le récipient expérimental.

#### **Produit chimique testé insoluble dans l'eau**

20. Le produit chimique testé est dissoute dans un petit volume d'un solvant organique approprié (par exemple de l'acétone), puis pulvérisée sur, ou mélangée à, une petite quantité de sable quartzique fin. Le solvant est ensuite éliminé par évaporation sous une hotte pendant au moins quelques minutes. Le sable traité est alors mélangé complètement au sol artificiel préhumidifié. On ajoute la quantité d'eau désionisée requise pour atteindre le taux d'humidité final, à savoir 40 à 60% de la capacité maximale de rétention d'eau, en la mélangeant au sol. Après quoi, le sol est prêt à être déversé dans les récipients expérimentaux. On veillera à ce que le solvant ne soit pas toxique pour les vers de terre.

#### **Produit chimique testé insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques**

21. On prépare un mélange composé de 10 g de sable quartzique industriel finement broyé et de la quantité nécessaire de produit chimique testé pour obtenir la concentration expérimentale voulue dans le sol. Ce mélange est ensuite mélangé complètement au sol artificiel préhumidifié. On ajoute la quantité d'eau désionisée requise pour atteindre le taux d'humidité final, à savoir 40 à 60% de la capacité maximale

de rétention d'eau, en la mélangeant au sol. Le sol est alors prêt à être déversé dans les récipients expérimentaux.

#### **Application de la substance d'essai à la surface du sol**

22. Le sol est traité après l'ajout des vers. On verse le sol humidifié dans les récipients expérimentaux avant de déposer les vers, préalablement pesés, à la surface du sol. Normalement, un ver sain s'enfouit immédiatement dans le substrat, si bien que tous les vers subsistant à la surface après 15 minutes seront considérés comme lésés et devront être remplacés. Le cas échéant, les remplaçants et les vers écartés devront être pesés, de telle sorte que le poids vif total du groupe de vers exposés et le poids total du récipient contenant les vers soient connus au départ.

23. Le produit chimique testé est appliqué. Il ne doit pas être ajouté au sol dans la demi-heure qui suit l'introduction des vers dans le récipient (ou si des vers sont présents à la surface du sol) de façon à éviter une exposition directe au produit chimique testé par contact cutané. Si le produit chimique testé est un pesticide, il peut être pertinent de l'appliquer à la surface du sol par pulvérisation. Le produit chimique testé devrait être réparti à la surface du sol de façon aussi régulière que possible, à l'aide d'un épandeur de laboratoire apte à simuler la pulvérisation sur un champ. Avant l'application, on enlève le couvercle des récipients expérimentaux et on le remplace par un revêtement interne protégeant les parois latérales du récipient des projections. Le revêtement peut être confectionné avec un récipient expérimental dont la base a été enlevée. L'application devrait avoir lieu à une température de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  et, s'agissant de solutions aqueuses, d'émulsions ou de dispersions, à un taux compris entre 600 et  $800 \mu\text{l}/\text{m}^2$ . Il convient de vérifier le taux à l'aide d'une technique d'étalonnage appropriée. L'application des présentations spéciales, telles que les granulés ou les produits de traitement des semences, doit reproduire leur mode d'emploi en agriculture.

24. On laissera les récipients expérimentaux sans couvercle durant une heure pour permettre au solvant volatil associé à l'application de la substance d'essai de s'évaporer, le cas échéant, en prenant garde qu'aucun ver ne s'échappe.

#### **MODE OPÉRATOIRE**

##### **Groupes d'essai et témoins**

25. Il est recommandé de déposer 10 vers par 500 à 600 g de masse sèche de sol artificiel (soit 50 à 60 g de sol par ver). Si l'on utilise de plus grandes quantités de sol, comme cela pourrait être le cas pour des pesticides exigeant un mode d'application spécial, tels les produits de traitement des semences, la charge de 50 à 60 g de sol par ver doit être maintenue moyennant l'augmentation du nombre de vers. On prépare dix vers par récipient témoin et traité. Les vers sont lavés à l'eau et essuyés, puis déposés un instant sur un papier absorbant pour éponger l'excès d'eau.

26. Afin d'éviter les erreurs systématiques dans la répartition des vers dans les récipients expérimentaux, on mesure l'homogénéité de la population expérimentale en pesant individuellement 20 vers prélevés au hasard dans la population qui fournira les vers d'expérience. Une fois l'homogénéité établie, des lots de vers sont sélectionnés, pesés et répartis dans les récipients expérimentaux selon un procédé de randomisation. Après l'introduction des vers d'expérience, il faut peser chaque récipient expérimental, de façon à obtenir un poids initial de référence pour la mesure du taux d'humidité du sol tout au long de l'essai, comme décrit au paragraphe 30. Les récipients expérimentaux sont ensuite couverts, comme décrit au paragraphe 9 et placés dans le local expérimental.

27. On prépare des témoins appropriés à chacune des méthodes d'application du produit chimique testé décrites aux paragraphes 18 à 24. Les témoins sont préparés de la même façon que les récipients traités, sauf qu'ils ne contiennent pas le produit chimique testé. Aussi, le cas échéant, les témoins renfermeront un solvant organique, du sable quartzique ou d'autres véhicules à des concentrations/quantités comparables à celles employées dans les récipients traités. Si le produit chimique testé est incorporé à l'aide d'un solvant ou d'un autre véhicule, il convient de préparer un témoin supplémentaire ne contenant ni le véhicule ni le produit chimique testé, afin de s'assurer que le véhicule n'influence pas les résultats.

### **Conditions expérimentales**

28. L'essai est conduit à  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , avec des cycles réglés de lumière et d'obscurité (de préférence 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité) et un éclairage de 400 à 800 lux dans la zone des récipients expérimentaux.

29. Les récipients expérimentaux ne sont pas aérés durant l'essai, mais les couvercles de ces récipients doivent autoriser les échanges gazeux avec l'atmosphère tout en limitant l'évaporation de l'humidité (voir paragraphe 9).

30. La teneur en eau du substrat des récipients expérimentaux est maintenue constante tout au long de l'essai. Pour ce faire, on pèse périodiquement les récipients sans leurs couvercles et on compense toute perte avec de l'eau désionisée. La teneur en eau ne doit pas varier de plus de 10% par rapport à sa valeur au début de l'essai.

### **Alimentation**

31. Toute nourriture dont la composition permet au moins de maintenir le poids des vers durant l'essai est jugée acceptable. Les flocons d'avoine, le crottin de cheval ou la bouse de vache ont fait leurs preuves à cet égard. Il faudra s'assurer que les vaches ou les chevaux dont on recueille les déjections ne font pas l'objet d'un traitement vétérinaire avec des substances telles que des activateurs de croissance, des nématicides ou des produits analogues, susceptibles d'être nocives pour les vers durant l'essai. Il est recommandé de ramasser soi-même la bouse de vache, l'expérience ayant démontré que la bouse de vache vendue dans le commerce comme engrais de jardin risque de nuire aux vers. Les déjections doivent être séchées à l'air, finement broyées et pasteurisées avant emploi.

32. Avant de l'utiliser dans l'essai, on administre chaque nouveau lot de nourriture à une culture de vers non expérimentale, afin de vérifier qu'il est d'une qualité appropriée. La croissance et la production des cocons ne devraient pas diminuer par rapport à celles de vers élevés dans un substrat ne contenant pas le nouveau lot de nourriture (conditions décrites dans la Ligne directrice 207 de l'OCDE (4)).

33. La première fois, la nourriture est administrée un jour après l'introduction des vers et l'ajout du produit chimique testé au sol. Environ 5 g de nourriture sont parsemés à la surface du sol de chaque récipient et humidifiés avec de l'eau désionisée (quelque 5 à 6 ml par récipient). Ensuite, la nourriture est dispensée une fois par semaine au cours des quatre semaines de l'essai. Si des restes de nourriture

subsistent, il faudra diminuer la ration afin d'éviter une croissance fongique, ou des moisissures. Les adultes sont retirés du sol au 28<sup>ème</sup> jour de l'essai. Cinq grammes supplémentaires de nourriture sont fournis à chaque récipient expérimental. Aucune nourriture supplémentaire n'est administrée durant les quatre semaines restantes de l'essai.

### **Sélection de la gamme de concentrations expérimentales**

34. Une connaissance préalable de la toxicité du produit chimique testé, tiré, par exemple, d'un essai de toxicité aiguë (4) et/ou d'une étude de détermination de l'ordre de grandeur, devrait faciliter la sélection des concentrations expérimentales appropriées. Une étude de détermination de l'ordre de grandeur est menée, s'il y a lieu, avec, par exemple, cinq concentrations expérimentales : 0,1, 1,0, 10, 100 et 1 000 mg/kg (masse sèche de sol). Une expérience identique par traitement et témoin suffit. L'étude de détermination de l'ordre de grandeur dure deux semaines et l'on évalue la mortalité à la fin de l'essai.

### **Conception expérimentale**

35. Comme aucun traitement statistique défini ne peut être prescrit pour cet essai, cette Ligne directrice fournit des instructions pour déterminer la CSEO et la  $CE_x$ . La CSEO sera vraisemblablement demandée par les autorités réglementaires dans un avenir proche. L'usage de la  $CE_x$  pourrait se généraliser à court terme, pour des raisons statistiques et écologiques. Aussi, cette Ligne directrice propose-t-elle trois conceptions fondées sur des recommandations émises à l'issue de l'essai tournant d'une méthode d'essai de reproduction chez l'enchytrée (17) :

36. En sélectionnant la gamme de concentrations à appliquer, on tiendra compte des aspects suivants :

- s'agissant de déterminer la CSEO, il faudrait tester au moins cinq/douze concentrations formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques pour chaque concentration expérimentale et huit témoins. Les concentrations devraient être espacées d'un facteur n'excédant pas 2,0.
- s'agissant de déterminer la  $CE_x$  ( $CE_{10}$ ,  $CE_{50}$ , par exemple), il est recommandé de prévoir suffisamment de concentrations différentes pour obtenir au moins quatre réponses moyennes statistiquement différentes à ces concentrations. Il conviendrait d'inclure au moins deux expériences identiques par concentration expérimentale et six témoins identiques. Le facteur d'espacement peut varier : il doit être inférieur ou égal à 1,8 dans la gamme censée produire un effet et supérieur à 1,8 aux concentrations supérieures et inférieures.
- une démarche combinée permet de déterminer à la fois la CSEO et la  $CE_x$ . On utilise huit concentrations formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques par traitement et huit témoins. Les concentrations devraient être espacées d'un facteur n'excédant pas 1,8.

### **Durée de l'essai et mesures**

37. Le 28<sup>ème</sup> jour, les vers adultes vivants sont observés et comptés. Tout comportement inhabituel (incapacité de creuser le sol, prostration, par exemple) et changement morphologique (blessures ouvertes, par exemple) sont également notés. Tous les vers adultes sont ensuite retirés des récipients expérimentaux, comptés et pesés. Le transfert du sol renfermant les vers sur un plateau propre, avant l'évaluation, peut faciliter la recherche des adultes. Avant d'être pesés, les vers extraits du sol devraient être lavés avec de l'eau désionisée et déposés un instant sur un papier filtre qui absorbera l'eau excédentaire. Tous les vers



non retrouvés à cette étape doivent être consignés comme morts, on suppose en effet que ces vers sont morts et ont été décomposés avant l'évaluation. Les vers adultes sont euthanasiés de façon humaine, préférablement par congélation rapide à -80°C ou par cryopréservation.

38. Si le sol a été retiré des récipients, il faut l'y remettre (sans les vers adultes mais avec tous les cocons engendrés, le cas échéant). Le sol est ensuite incubé durant quatre semaines supplémentaires dans les mêmes conditions expérimentales, si ce n'est que la nourriture n'est administrée qu'une seule fois, au début de cette phase de l'essai (voir paragraphe 33).

39. À la fin de la seconde période de quatre semaines, on dénombre les vers juvéniles éclos des cocons dans le sol expérimental et les cocons, en utilisant les procédures décrites à l'Annexe 5. Tous les signes de nocivité ou les lésions observés sur les vers doivent aussi être enregistrés tout au long de la durée de l'essai. A la fin de l'essai, les juvéniles éclos sont dénombrés et euthanasiés de façon humaine, préférablement par congélation rapide à -80°C ou par cryopréservation.

### **Essai limite**

40. Si aucun effet n'est observé à la plus haute concentration de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur (1 000 mg/kg), l'essai de reproduction est à conduire comme un essai limite, avec une concentration expérimentale de 1 000 mg/kg. L'essai limite permettra de démontrer que la CSEO pour la reproduction est supérieure à la concentration limite et de réduire au minimum le nombre de vers utilisés dans l'essai. Cet essai comprend huit expériences identiques à la fois pour le sol traité et pour le témoin.

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### **Traitement des résultats**

41. La présente Ligne directrice ne prescrit aucune démarche statistique stricte pour analyser les résultats de l'essai, bien que l'Annexe 6 en présente les grandes lignes.

42. L'un des effets observés est la mortalité. Les changements comportementaux (par exemple, l'incapacité de creuser le sol, la prostration contre la paroi en verre 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. La  $CL_{50}$  se détermine normalement par analyse probit (18) ou régression logistique. 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 (19), la méthode de Spearman-Kärber simplifiée (20) 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  $CL_{100}$ ).

43. L'autre effet observé est la fécondité (le nombre de vers juvéniles produits). Néanmoins, comme pour l'essai de détermination de l'ordre de grandeur, tous les autres signes de nocivité doivent être

mentionnés dans le rapport final. Pour calculer les résultats de la reproduction, il faut connaître la moyenne arithmétique  $\bar{x}$  et l'écart-type par traitement et par témoin afin d'effectuer l'analyse statistique.

44. Si l'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 récipients témoins et 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 le test approprié, voir au paragraphe 47 et à l'Annexe 6).

45. 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

46. 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 critique. 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 de  $t$  de comparaison multiple, tels que le test de Williams ( $\alpha = 0,05$ , unilatéral) (21)(22), ou, dans certains cas, le test de Dunnett (23)(24). 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 (25). Sinon, un test  $U$  de comparaison multiple, par exemple un test  $U$  de Bonferroni selon Holm (26), 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 (27)(28) ou de Shirley (29)(30)) peuvent être appliqués et sont généralement préférables aux tests de  $t$  à variance inégale. (voir aussi le schéma exposé à l'Annexe 6).

47. Si un essai limite a été conduit et que les conditions requises pour 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 (31).

### Estimation de la $CE_x$

48. 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 (32). Les fonctions appropriées aux résultats épousant une valeur de tout ou rien (mortalité/survie et nombre de descendants) 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 appréciables 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 (18)) ou par une autre méthode récente appropriée.

49. 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 (18). Dans ce cas, la fonction de pondération doit être ajustée selon Christensen (33) pour les résultats métriques. 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 (34). 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 (19) et la méthode simplifiée de Spearman-Kärber (20).

### **Rapport d'essai**

50. 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.

Organisme d'essai :

- animal d'expérience utilisé : espèce, nom scientifique, source et conditions d'élevage ;
- âge, gamme de dimension (masse) des organismes d'expérience.

Conditions expérimentales :

- détails sur la préparation du sol d'essai ;

- capacité maximale de rétention d'eau du sol ;
- description de la méthode d'application du produit chimique testé dans le sol ;
- détails relatifs aux substances auxiliaires utilisées pour administrer le produit chimique testé;
- détails relatifs à l'étalonnage de l'appareil de pulvérisation, le cas échéant ;
- description de la conception expérimentale et du mode opératoire ;
- dimension des récipients expérimentaux et volume du sol d'essai ;
- conditions expérimentales : intensité lumineuse, durée des cycles de lumière et d'obscurité, température ;
- description du régime d'administration de la nourriture, nature et quantité de nourriture fournie au cours de l'essai, dates d'alimentation ;
- pH et teneur en eau du sol au début et à la fin de l'essai.

Résultats de l'essai :

- mortalité adulte (%) dans chaque récipient expérimental, à la fin des quatre premières semaines de l'essai ;
- masse totale des adultes au début de l'essai, dans chaque récipient expérimental ;
- modification du poids corporel des adultes vivants (% du poids initial) dans chaque récipient expérimental, à l'issue des quatre premières semaines de l'essai ;
- nombre de vers juvéniles produits dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai ;
- description des effets évidents ou des symptômes pathologiques ou des changements nets de comportement ;
- résultats obtenus avec la substance de référence ;
- CL<sub>50</sub>, CSEO et/ou CE<sub>x</sub> (par exemple CE<sub>50</sub>, CE<sub>10</sub>) 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 ;
- courbe de la relation dose-effet ;
- résultats obtenus avec chaque récipient.

Écarts par rapport aux procédures décrites dans la présente Ligne directrice et faits inhabituels survenus au cours de l'essai.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Jaenicke, J. (1982). *Eisenia foetida* is two biological species. *Megadrilogica* 4, 6-8.
- (2) Oien, N and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm – III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. *Comp. Biochem. Physiol.* 78c (2), 277-282.
- (3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* – comparison of two ringtests. In : Riepert, F., Kula, C. (1996) : Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. *Mitt. Biol. Bundesamt. f. Land- Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem*, 320, p. 50-82.

- (4) Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : Essai n°207 : «Ver de terre, Essais de toxicité aiguë». Adoptée le 4 avril 1984.
- (5) 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*, N°11268-2. ISO, Genève.
- (6) ISO (Organisation internationale de normalisation) (2012). Qualité du sol – Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre – Partie 1 : Détermination de la toxicité aiguë sur *Eisenia fetida/Eisenia andrei* en utilisant des substrats de sol artificiel, N°11268-1. ISO, Genève.
- (7) SETAC (1998). *Advances in Earthworm Ecotoxicology*. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M. and Posthuma, L. (Eds). SETAC Press, 456 pages.
- (8) EPA (1996). *Ecological effects test guidelines. OPPTS Earthworm Subchronic Toxicity Test*. United States Environmental Protection Agency. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7104). EPA712-C-96-167, avril 1996.
- (9) Bouché, M.B. (1972). *Lombriciens de France, Écologie et systématique*. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.
- (10) Edwards, C.A. (1983). *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*. Report EUR 8714EN, Commission of European Communities.
- (11) Greig-Smith, P.W., Becker, H., Edwards, P.J., and Heimbach, F. (Eds) (1992). *Ecotoxicology of Earthworms*. Intercept.
- (12) Edwards, C.A. and Bohlen, J.P. (1996). *Biology and ecology of Earthworms*, 3<sup>rd</sup> Edition. Chapman and Hall, London.
- (13) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1994). Qualité du sol – Détermination du pH, N°10390. ISO, Genève.
- (14) Hund-Rinke, K., Römbke, J., Riepert, F. & Achazi, R. (2000) : *Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests*. In : *Toxikologische Beurteilung von Böden*. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (Eds). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (15) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1998). Qualité du sol – Détermination de la caractéristique de la rétention en eau – Méthodes de laboratoire, N°11274. ISO, Genève.

- (16) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1993). Qualité du sol – Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau – Méthode gravimétrique, N°11465. ISO, Genève.
- (17) Römbke, J. and Moser, Th. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+223 pp.
- (18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3<sup>rd</sup> ed.), pp 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (19) Finney, D.J. (1978). Statistical method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd., London.
- (20) 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.
- (21) 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.
- (22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.
- (23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.
- (24) Dunnett, C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.
- (25) 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.
- (26) Holm, S., (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.
- (27) Jonckheere, A.R. (1954). A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.
- (28) 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.
- (29) Shirley, E.A. (1979). The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.
- (30) 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.
- (31) Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1981). Biometry. The principle and practice of statistics in biological research. 2<sup>nd</sup> edition. W.H. Freeman and Company. New York.

- (32) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11 : 1485-1494.
- (33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18, 213-221.
- (34) Van Ewijk, P.H. and Hoekstra, J.A., (1993). Calculation of the EC<sub>50</sub> 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<sub>x</sub> (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. Par exemple, la CE<sub>50</sub> est la concentration estimée causer un effet déterminé sur 50% d'une population exposée durant une période définie. Dans cet essai, les concentrations efficaces sont exprimées en masse de produit chimique testé par masse sèche de sol expérimental ou en masse de produit chimique testé par unité de superficie du sol.

La CL<sub>0</sub> (concentration non létale) désigne la concentration d'un produit chimique testé qui ne tue aucun des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL<sub>0</sub> s'exprime en masse de produit chimique testé par masse sèche de sol expérimental.

La CL<sub>50</sub> (concentration létale moyenne) correspond à la concentration d'un produit chimique testé qui entraîne la mort de 50% des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL<sub>50</sub> s'exprime en masse de produit chimique testé par masse sèche de sol expérimental ou en masse de substance d'essai par unité de superficie du sol.

La CL<sub>100</sub> (concentration totalement létale) correspond à la concentration d'un produit chimique testé qui entraîne la mort de 100% des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL<sub>100</sub> s'exprime en masse de produit chimique testé 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 ou en masse de produit chimique testé par unité de superficie du sol. 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 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 engendrés durant la période de l'essai par le nombre d'adultes.



ANNEXE 2DÉTERMINATION DE LA CAPACITÉ MAXIMALE DE RÉTENTION D'EAU DU SOL

La méthode suivante a fait ses preuves. Elle est décrite à l'annexe C de la norme ISO DIS 11268-2 (1).

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

**Référence :**

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*. n° 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) (1).

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 son volume soit d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M de qualité pour analyse, soit d'une solution de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) 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).

**Référence :**

ISO (Organisation internationale de normalisation) (2005). Qualité du sol – Détermination du pH. n° 10390. ISO, Genève.

ANNEXE 4ÉLEVAGE D'*EISENIA FETIDA* / *EISENIA ANDREI*

Il est préférable d'élever ces espèces dans un local climatisé à  $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . À cette température et à condition d'être suffisamment nourris, les vers atteignent leur maturité au bout de 2 à 3 mois.

Ces deux espèces peuvent être élevées dans des déchets animaux très divers. Le milieu de culture recommandé est un mélange 50/50 de crottin de cheval ou de bouse de vache et de tourbe. Il faudra vérifier que les vaches ou les chevaux dont proviennent les déjections ne sont pas traités par des médicaments vétérinaires, tels que des activateurs de croissance, des nématicides ou des produits analogues, susceptibles d'être nocifs pour les vers durant l'essai. Il est recommandé de récolter soi-même les déjections dans un élevage de l'agriculture biologique, l'expérience ayant démontré que les déjections vendues dans le commerce comme engrais de jardin risquent d'être nocives pour les vers. Le milieu devrait avoir un pH d'environ 6 à 7 (ajusté avec du carbonate de calcium), une faible conductivité ionique (une concentration de sels inférieure à 0,5% ou à 6 mg) et ne devrait pas être trop contaminé par de l'ammoniac ou des urines animales. Le substrat doit être humide, mais pas engorgé. Des boîtes d'élevage d'une capacité de 10 à 50 litres conviennent.

Pour obtenir une population de vers homogène quant à l'âge et à la taille (masse), il vaut mieux commencer la culture avec des cocons. Une fois que la culture a été lancée, on la poursuit en transférant les vers adultes dans une boîte d'élevage garnie d'un substrat neuf et en les y laissant durant 14 à 28 jours pour leur permettre d'engendrer de nouveaux cocons. Les adultes sont ensuite enlevés et les juvéniles issus des cocons utilisés comme population de départ pour la prochaine culture. Les vers sont nourris en continu avec des déchets animaux et transférés de temps en temps dans un substrat neuf. On a constaté que les flocons d'avoine, du crottin de cheval ou de la bouse de vache séchés à l'air et finement broyés constituent une alimentation appropriée. Il faudra vérifier que les vaches ou les chevaux dont proviennent les déjections ne sont pas traités par des médicaments vétérinaires tels que des activateurs de croissance, susceptibles d'être nocifs pour les vers durant la culture à long terme. Les vers éclos des cocons sont utilisés dans l'essai dès qu'ils sont âgés de 2 à 12 mois et considérés comme adultes.

Les vers peuvent être considérés comme sains s'ils se déplacent dans le substrat, ne tentent pas de s'en échapper et se reproduisent continuellement. L'épuisement du substrat est révélé par le fait que les vers se déplacent très lentement et présentent une extrémité postérieure jaune. Dans ce cas, il est recommandé de renouveler le substrat et/ou de diminuer la densité de peuplement des boîtes.

ANNEXE 5TECHNIQUES DE COMPTAGE DES VERS JUVÉNILES ÉCLOS DES COCONS

Le tri manuel des vers présents dans le substrat exigeant un temps considérable, deux autres méthodes sont recommandées :

a) Les récipients expérimentaux sont déposés dans un bain d'eau, dont la température initiale de 40°C est portée à 60°C. Après une vingtaine de minutes, les vers juvéniles devraient apparaître à la surface du sol, d'où il est facile de les enlever et de les compter.

b) Le sol d'essai peut être rincé à travers un tamis selon la méthode mise au point par Van Gestel et al. (1), à condition que la tourbe et les déjections ou les flocons d'avoine ajoutés au sol aient été moulus en poudre fine. Deux tamis dont les mailles mesurent 0,5 mm (diamètre 30 cm) sont placés l'un au-dessus de l'autre. Le contenu du récipient expérimental est versé sur un tamis sous un puissant jet d'eau du robinet, de façon à retenir la majorité des jeunes vers et des cocons dans le tamis supérieur. Il importe de noter que toute la surface du tamis supérieur doit rester mouillée durant cette opération de façon que les vers juvéniles flottent sur un film d'eau, ce qui les empêche de se faufiler à travers les mailles du tamis. On obtient le meilleur résultat avec une pomme de douche.

Dès que la totalité du substrat est passée à travers le tamis, le tamis supérieur peut être rincé au-dessus d'un bol de façon à y recueillir les juvéniles et les cocons. On laisse reposer le contenu du bol jusqu'à ce que les cocons vides flottent à la surface et les cocons pleins ainsi que les juvéniles tombent au fond. Après quoi, l'eau du bol est vidée et les jeunes vers et les cocons sont transférés dans une boîte de Petri contenant un peu d'eau. On peut alors compter les vers en les enlevant à l'aide d'une aiguille ou d'une pince.

L'expérience a montré que la méthode a) convient mieux à l'extraction des vers juvéniles, susceptibles de passer à travers les mailles, même avec une ouverture de 0,5 mm.

L'efficacité de la méthode employée pour extraire les vers (et les cocons, le cas échéant) du sol devrait toujours être déterminée. Si les vers juvéniles sont enlevés par tri manuel, on conseille de répéter l'opération une fois sur tous les échantillons.

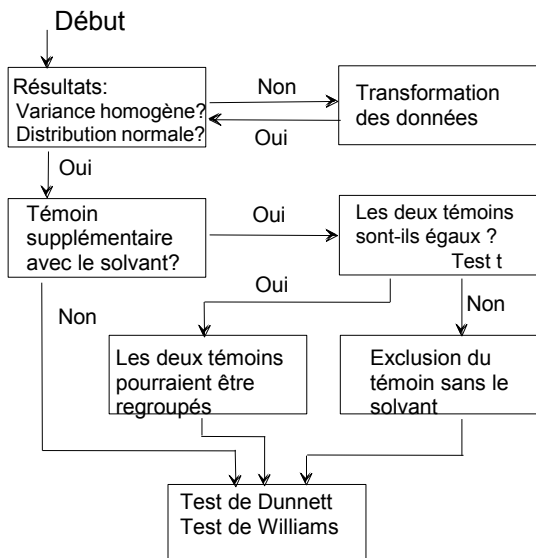
**Référence :**

(1) Van Gestel, C.A.M., van Dis, W.A., van Breemen, E.M., Sparenburg, P.M. (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32 : 367-371.

ANNEXE 6

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

**Tests paramétriques**



**Tests non paramétriques**

