

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

« Ver de Terre, Essais de Toxicité Aiguë »**1. INTRODUCTION**• Connaissances requises

- Solubilité dans l'eau
- Pression de vapeur

• Informations générales

- Formule de structure
- Pureté de la substance d'essai
- Stabilité chimique dans l'eau, dans le sol et à la lumière
- Coefficient de partage n-octanol/eau
- Résultats d'un essai de biodégradabilité dite facile (voir Ligne directrice 301)

• Réserve particulière

- Cet essai peut être utilisé tant pour les substances insolubles que pour les substances solubles dans l'eau, mais la méthode d'application diffère.

• Documents de référence

Il n'existe pas de norme internationale à ce sujet.

2. MÉTHODE**A. INTRODUCTION, OBJET, PORTÉE, PERTINENCE,
APPLICATION ET LIMITES DE L'ESSAI**

De nombreuses méthodes permettent de tester la toxicité des produits chimiques pour les vers de terre, comme les essais d'application locale, d'alimentation forcée et d'immersion.

Cette Ligne directrice pour les essais comprend deux types d'essais : un essai de toxicité par contact sur papier et un essai avec un sol artificiel.

Un essai simple de toxicité par contact sur papier est décrit en tant qu'essai facultatif de sélection initiale pouvant déceler les substances vraisemblablement toxiques pour les vers de terre dans le sol et nécessitant des essais plus détaillés dans un sol artificiel.

L'essai par contact simple est facile à réaliser et donne des résultats reproductibles avec l'espèce recommandée. L'essai sur sol artificiel fournit des données de toxicité plus représentative de l'exposition naturelle des vers de terre aux produits chimiques.

- Définitions et unités

Dans cette Ligne directrice la CL 50 est la concentration létale médiane, c'est-à-dire la concentration de la substance d'essai qui tue 50 pour cent des animaux d'essai pendant la période d'essai.

Pour l'essai par contact simple, la concentration du produit chimique étudié est exprimée en mg/cm^2 . Pour l'essai avec sol artificiel, elle est exprimée en mg/kg (poids sec).

- Substances de référence

La CL 50 d'une substance de référence devrait être déterminée de temps à autre, en tant que moyen de s'assurer que les conditions d'essai de laboratoire sont adéquates et n'ont pas changé de façon importante. La substance de référence recommandée est le chloracétamide.

- Principe de la méthode

L'essai de sélection (essai sur papier filtre) consiste à exposer des vers de terre à des substances sur un papier filtre humide afin d'identifier les produits chimiques potentiellement toxiques pour les vers de terre dans le sol.

« Ver de Terre, Essais de Toxicité Aiguë »

L'essai avec sol artificiel consiste à placer des vers de terre dans des échantillons d'un sol artificiel de composition précisément définie, auxquels on a ajouté une série de doses de la substance d'essai. On évalue la mortalité le 7^{ème} et le 14^{ème} jour après l'application de la substance.

Parmi les concentrations employées, il doit y en avoir une qui ne provoque aucune mortalité et une qui entraîne une mortalité totale.

- Conditions de validité de l'essai

- La mortalité dans le groupe témoin ne doit pas dépasser 10 pour cent à la fin de l'essai.

B. MODE OPÉRATOIRE

- Préparations

Équipement et matériaux

Un équipement normal de laboratoire et l'équipement et les matériaux suivants sont nécessaires :

- Cultures de vers de terre (voir ci-dessous : Animaux d'expérience)
- Papier filtre : 80 à 85 g/m², environ 0,2 mm d'épaisseur, de porosité moyenne
- *Exemple d'un sol artificiel recommandé :*
 - 10 pour cent de tourbe à sphaigne (pH aussi proche que possible de 5,5 à 6,0, pas de résidus végétaux visibles, finement broyée, séchée jusqu'au taux d'humidité choisi).
 - 20 pour cent d'argile kaolinique (taux de kaolinite supérieur à 30 pour cent).
 - 70 pour cent de sable industriel (le sable fin doit prédominer, avec plus de 50 pour cent des particules comprises entre 50 et 200 microns).

- Le pH est ajusté à $6,0 \pm 0,5$ par addition de carbonate de calcium [Voir Référence (6)].
- Les constituants secs sont assemblés en proportions correctes et soigneusement mélangés, soit dans un grand mélangeur de laboratoire, soit dans une petite bétonnière électrique. On détermine alors le taux d'humidité en séchant un petit échantillon à 105°C et en le repesant. On ajoute une quantité suffisante d'eau désionisée pour atteindre un taux d'humidité d'environ 35 pour cent par rapport au poids sec et on mélange soigneusement. Le mélange complet doit être humide, mais pas au point que de l'eau apparaisse quand le substrat est comprimé. Avec certaines tourbes un taux d'humidité supérieur à 35 pour cent peut convenir.
- Des cristallisoirs ou des béciers sans bec d'une contenance d'un litre, fermés par des couvercles de verre ou par un film de plastique perforé.
- L'essai est réalisé dans un cabinet ou un local éclairé dont la température est contrôlée à $\pm 2^\circ\text{C}$ près, avec une intensité lumineuse de 400 à 800 lux.

- Animaux d'expérience

Choix de l'espèce

L'espèce d'essai recommandée est *Eisenia fetida* (Michaelsen). Bien que ce ne soit pas une espèce typique du sol, on la rencontre dans les sols riches en matières organiques. Sa sensibilité aux produits chimiques se rapproche de celle des espèces qui vivent vraiment dans le sol ; elle a un cycle de vie court, sortant des cocons au bout de 3 à 4 semaines et atteignant sa maturité en sept à huit semaines à 20°C. L'espèce est très prolifique, chaque ver produisant deux à cinq cocons par semaine, plusieurs vers émergeant de chacun d'eux. L'espèce est disponible dans le commerce et peut être facilement élevée dans des déchets organiques très divers. Les cocons peuvent être

« Ver de Terre, Essais de Toxicité Aiguë »

achetés dans le commerce ou obtenus auprès d'une source centrale afin de s'assurer qu'on utilise la même souche (voir l'Annexe).

Il existe deux races d'*Eisenia fetida*, que certains taxonomistes ont séparé en espèces [voir référence (1)]. Celles-ci sont morphologiquement semblables, mais l'une, *E. fetida fetida*, a des rayures ou des bandes transversales typiques sur les segments et l'autre, *E. fetida andrei*, n'en a pas et a une couleur rougeâtre aux nuances variées. Quand c'est possible, on doit utiliser *E. fetida fetida*. D'autres espèces peuvent être employées si la méthodologie nécessaire est disponible.

Les vers doivent être adultes (âgés d'au moins deux mois avec un clitellum) et avoir un poids individuel de 300 à 600 mg.

- Exécution de l'essai

Essai sur papier filtre

Il est recommandé d'utiliser des fioles de verre à fond plat d'environ 8 cm de hauteur et 3 cm de diamètre. Les parois de ces fioles sont revêtues de papier filtre coupé à une dimension telle qu'il n'y ait guère de chevauchement. La substance d'essai est dissoute dans l'eau (si elle est soluble jusqu'à une concentration de 1000 mg/l) ou dans un solvant organique convenable (par exemple de l'acétone, de l'hexane ou du chloroforme) de façon à obtenir une série de concentrations connues. Un ml de solution est versé à la pipette dans chaque fiole et évaporé à sec sous un léger courant d'air comprimé filtré ; pendant qu'elle sèche, on fait tourner la fiole selon un axe horizontal (pour les substances qui sont relativement insolubles dans l'eau, ou dans les solvants organiques, il se peut qu'on doive répéter plusieurs fois cette opération pour obtenir les dépôts requis). La fiole du groupe témoin doit être traitée avec 1 ml d'eau désionisée ou de solvant organique suivant le cas. Après séchage il faut ajouter 1 ml d'eau désionisée à chaque fiole afin d'humidifier le papier filtre. Chaque fiole est fermée par un couvercle ou par un film de plastique, avec un petit trou pour la ventilation.

Un essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur peut éventuellement être réalisé avant un essai de sélection plus précis. Cela peut se faire comme suit :

Quantité appliquée sur le papier filtre	Concentration de la solution appliquée
1,0 mg/cm ²	7 x 10 ⁻² g/ml
0,1 mg/cm ²	7 x 10 ⁻³ g/ml
0,01 mg/cm ²	7 x 10 ⁻⁴ g/ml
0,001 mg/cm ²	7 x 10 ⁻⁵ g/ml
0,0001 mg/cm ²	7 x 10 ⁻⁶ g/ml

Pour l'essai principal de sélection, on doit employer cinq doses au moins, choisies dans une série géométrique.

Pour chaque dose, le minimum requis est de dix expériences identiques avec un ver par fiole. On ne doit pas utiliser plus d'un ver par fiole parce que la mort de l'un d'eux peut exercer une influence défavorable sur les autres vers du même récipient. On peut améliorer la précision de l'essai en l'effectuant à un multiple de 20. Dans chaque essai, on utilise une série de doses et dix fioles témoins.

Les vers doivent être gardés sur du papier filtre humide pendant 3 heures avant d'être placés dans les fioles d'essai, de façon qu'ils puissent évacuer le contenu de leur intestin. Les vers sont lavés et séchés avant l'expérience.

Au cours de l'essai, les fioles sont posées sur le côté sur des plateaux. La température d'essai est de 20°C ± 2°C. Les essais sont réalisés dans le noir et pendant une période de 48 heures, avec, facultativement, une évaluation supplémentaire de la mortalité après 72 heures.

On considère les vers comme morts quand ils ne répondent pas à un léger stimulus mécanique appliqué à leur extrémité antérieure. On doit noter tous les symptômes comportementaux ou pathologiques.

Essais avec le sol artificiel

La réalisation d'un essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur, avant un essai principal plus précis, est facultative. Cet essai pourrait faire appel à des doses de l'ordre de

« Ver de Terre, Essais de Toxicité Aiguë »

0,01, 0,1, 1,0, 10,0, 100,0 et 1000,0 mg/kg (poids sec de sol artificiel). Pour l'essai proprement dit, on utilise cinq concentrations d'une série géométrique.

Le milieu d'essai doit, dans la mesure du possible, être préparé de la façon qui suit : immédiatement avant le début de l'essai, une émulsion ou une dispersion de la substance d'essai dans de l'eau désionisée est mélangée au sol artificiel ou projetée de façon uniforme à sa surface à l'aide d'un pulvérisateur fin de chromatographie ou de type analogue. Si le produit chimique est insoluble dans l'eau, il peut être dissous dans un volume aussi petit que possible d'un solvant organique approprié (par exemple de l'hexane, de l'acétone ou du chloroforme). On doit laisser au solvant le temps de s'évaporer. Si la substance d'essai n'est pas soluble, dispersable ou émulsifiable, on mélange pour chaque récipient d'essai 10 g d'un mélange de sable quartzique finement broyé et d'une quantité de substance d'essai correspondant à la dose nécessaire pour 750 g de poids humide de sol artificiel avec 740 g de sol artificiel humide. Pour solubiliser, disperser ou émulsifier la substance d'essai, on ne peut utiliser que des agents qui se volatilisent facilement. Le milieu d'essai doit être ventilé avant utilisation. La quantité d'eau évaporée doit être remplacée. Le groupe témoin doit être traité avec la même quantité d'additifs que les groupes d'essai.

Pour chacun des lots d'essai, 750 g de substrat d'essai humide sont placés dans chacun des récipients de verre ; dix lombrics, qui ont été conditionnés pendant 24 heures dans un substrat similaire, puis lavés rapidement avant utilisation, sont placés à la surface du substrat. Les récipients sont recouverts d'un film de plastique perforé afin d'éviter le dessèchement du substrat et ils sont maintenus dans les conditions d'essai pendant 14 jours.

Il est recommandé d'effectuer quatre expériences identiques à chaque dose d'essai.

Dans chaque essai, on utilise quatre témoins de dix vers et avec du sol traité avec le même solvant que celui qui est employé dans l'essai.

La durée de l'essai est de 14 jours (évaluation de la mortalité le 7^{ème} et le 14^{ème}) et la température d'essai est de 20°C ± 2°C. L'essai est réalisé sous éclairage continu (pour s'assurer que les vers restent dans le milieu d'essai tout au long de la durée de l'expérience).

On évalue la mortalité en vidant le sol sur un plateau ou une plaque de verre, en sortant les vers de la terre et en testant leur réaction à un stimulus mécanique exercé à leur extrémité antérieure. Après l'évaluation du 7^{ème} jour, les vers vivants et le sol sont replacés dans le récipient d'essai. Tous les symptômes comportementaux ou pathologiques observés doivent être consignés.

A la fin de l'essai, on doit évaluer et consigner le taux d'humidité du sol.

3. RÉSULTATS ET RAPPORT

• Traitement des résultats

Les données de mortalité en fonction de la concentration, doivent être portées sur un graphique logarithmique de probabilité et on doit évaluer la concentration létale médiane (CL 50) ainsi que ses limites de confiance (voir la référence (3)). D'autres méthodes d'analyse de probabilité sont également acceptables.

Quand deux concentrations consécutives d'une série géométrique (avec un rapport de 2,0 au maximum) entraînent respectivement une mortalité de 0 et de 100 pour cent, ces deux valeurs sont suffisantes pour indiquer entre quelles limites se situe la CL 50.

• Rapport

Le rapport de l'essai doit comprendre les informations suivantes :

Substance d'essai : données d'identification chimique, méthode d'application

Animaux d'essai : âge, conditions d'entretien et d'élevage, source d'approvisionnement

« Ver de Terre, Essais de Toxicité Aiguë »

Conditions d'essai : description et détails de toute modification des matériaux d'essai et des conditions recommandées.

Informations sur la façon de préparer le milieu d'essai.

Résultats :

- poids moyen vif et nombre de vers vivants par dose au début et à la fin de l'essai
- description des symptômes physiques ou pathologiques évidents ou des modifications nettes du comportement observés chez les organismes d'essai
- méthode utilisée pour déterminer la CL 50, avec mention de toutes les données employées et les résultats des essais
- graphique montrant la courbe concentration-effet
- mortalité chez les animaux témoins
- mortalité avec le produit de référence et avec la substance d'essai
- CL 50 et toutes les données utilisées pour la calculer
- taux d'humidité du sol artificiel au début et à la fin de l'essai, pH au début de l'essai
- concentration la plus élevée ne provoquant pas de mortalité
- concentration la plus faible entraînant une mortalité de 100 pour cent.

4. BIBLIOGRAPHIE

1. M.B. Bouché, *Lombriciens de France, Ecologie et Systématique*. Publ. Institut National de la Recherche Agronomique (1972).
2. C.A. Edwards and J.R. Lofty, *Biology of Earthworms*, 2nd Edition, Chapman and Hall, London (1977).

3. J.T. Litchfield and F. Wilcoxon, *Journal of Pharmacol. Exper. Ther.* 96. 99-113 (1949).
4. C.E. Stephan, in *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink) pp. 66-84, ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials (1977).
5. C.A. Edwards, *Development of a Standardized Laboratory Method for Assessing the Toxicity of Chemical Substances to Earthworms*, Report EUR 8714 EN, Commission des Communautés Européennes (1983).
6. *The Analysis of Agricultural Materials*, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Reference Book 427, HMSO, London (1981).

5. ANNEXE

ÉLEVAGE DES ORGANISMES D'ESSAI

Eisenia fetida peut être élevé dans une large gamme de déchets animaux. Le milieu d'élevage recommandé est constitué par un mélange 50/50 de fumier de cheval ou de bovins et de tourbe, mais d'autres déchets animaux conviennent également. Le milieu doit avoir un pH d'environ 7,0 et une faible conductivité ionique (inférieure à 6,0 milli-Siemens) ; il ne doit pas être trop contaminé par de l'ammoniac ou de l'urine animale. Des boîtes d'élevage en bois d'environ 500 x 500 x 15 cm munies de couvercles bien ajustés sont idéales pour l'élevage à grande échelle et peuvent produire plus de 1000 vers en six semaines. Pour produire suffisamment de vers, un tel milieu supportera jusqu'à 1 kg de vers par 20 kg de déchets et chaque ver pèsera jusqu'à 1 g. Pour obtenir des vers d'un âge et d'un poids normalisés, il est préférable de commencer l'élevage avec des cocons qui prennent trois à quatre semaines pour éclore et sept à huit semaines pour devenir des vers matures à 20°C.