

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

### **Essai de reproduction chez *Lymnaea stagnalis***

#### **INTRODUCTION**

1. Le document d'examen détaillé de l'OCDE sur les essais de toxicité chez les mollusques (1) a mis en évidence la nécessité de soumettre certains produits chimiques à des essais de toxicité pour la reproduction sur des mollusques aquatiques. Il soulignait, en particulier, l'absence de document d'orientation applicable aux essais de toxicité pour un groupe d'une telle importance écologique et économique. De plus, les espèces aquatiques hermaphrodites sont très peu couvertes par les lignes directrices existantes sur les essais de reproduction. La présente Ligne directrice a donc pour objet l'évaluation des effets d'une exposition prolongée aux produits chimiques sur la reproduction et la survie de l'escargot hermaphrodite d'eau douce *Lymnaea stagnalis* (grande limnée, ou limnée des étangs).
2. Les principaux effets mesurés sont la survie et le nombre cumulé de grappes d'œufs pondues par escargot au cours d'une exposition de 28 jours. La croissance individuelle des escargots reproducteurs (augmentation de la longueur de la coquille, par exemple) et le nombre d'œufs produits par escargot peuvent également être mesurés à titre d'effets complémentaires.
3. Avant d'appliquer la présente Ligne directrice à un mélange en vue de générer des données à des fins réglementaires, il convient d'examiner si et, dans l'affirmative, pourquoi cet essai peut fournir des résultats appropriés à cet effet. Ces questions ne se posent pas si l'essai du mélange est prescrit par la réglementation.

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

4. L'objectif premier de l'essai consiste à évaluer l'effet des produits chimiques sur l'efficacité de la reproduction chez *Lymnaea stagnalis*. À cette fin, on expose des adultes reproducteurs à une gamme de concentrations du produit chimique testé et l'on observe leur survie et leur reproduction pendant 28 jours. Avant l'essai, les escargots sont prélevés dans une culture de laboratoire exempte de parasites, calibrés en taille et placés dans les récipients d'essai en vue de leur acclimatation. À partir de l'exposition au produit chimique testé (jour J 0 de l'essai), la survie est consignée quotidiennement lors de l'alimentation des escargots, et les escargots morts sont retirés des récipients d'essai. La fécondité est déterminée au minimum deux fois par semaine. Les grappes d'œufs sont collectées et comptées. Une donnée complémentaire, le nombre d'œufs par grappe, peut également être déterminée.

La longueur de la coquille des adultes peut être mesurée au début et à la fin de l'essai.

5. La survie des animaux parents et le nombre de grappes d'œufs produites par récipient d'essai doivent être consignés. L'efficacité de la reproduction doit refléter la production de grappes par organisme parent survivant. D'autres effets liés au produit chimique testé sur des paramètres tels que le nombre d'œufs produits par organisme parent survivant ou la croissance (augmentation de la longueur de la coquille, par exemple) peuvent aussi être étudiés.

6. L'effet toxique du produit chimique testé sur le nombre cumulé de grappes produites par individu-jour est exprimé sous la forme d'une  $CE_x$ , que l'on établit en appliquant aux données un modèle de régression adapté afin d'estimer la concentration qui produirait une réduction de x % de l'efficacité de reproduction (2). Il est également possible d'exprimer l'effet toxique du produit chimique testé par la concentration sans effet observé et la concentration minimale avec effet observé (CSEO/CMEO) (3). La  $CE_x$  et la CSEO/CMEO peuvent être déterminées au cours de la même étude.

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

7. Les informations sur le produit chimique testé qui peuvent être utiles à l'établissement des conditions de l'essai sont notamment la formule structurale, la pureté, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pKa, le coefficient de partage  $P_{oe}$  et les résultats d'un test de biodégradabilité facile (voir les Lignes directrices de l'OCDE n° 301 et 310).

8. La solubilité dans l'eau et la pression de vapeur du produit chimique testé doivent être connues, et il faut disposer d'une méthode analytique fiable pour le dosage du produit chimique dans les solutions d'essai, avec indication du rendement de récupération et de la limite de quantification.

### **SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE**

9. Il convient de tester périodiquement les substances de référence, afin de vérifier la sensibilité des organismes d'essai et la cohérence des conditions expérimentales. Le chlorure de cadmium est une substance de référence classique qui a été utilisée avec succès dans les études internationales de validation de la présente Ligne directrice, produisant une  $CE_{50, reproduction}$  entre 40 et 230  $\mu\text{g Cd/L}$  (6, 7).

### **VALIDITÉ DE L'ESSAI**

10. Les critères de validité de l'essai sont les suivants :

- la mortalité moyenne chez les témoins (compte tenu de tous les réplicats témoins) ne dépasse pas 20 % à la fin de l'essai ;
- la fécondité individuelle cumulée moyenne chez les témoins à la fin de l'essai est d'au moins quatre grappes d'œufs par individu-jour (cf. § 49) ;
- la teneur en oxygène dissous a été d'au moins 60 % de la valeur de saturation en air (VSA) chez les témoins et les groupes exposés tout au long de l'essai ;
- la température moyenne de l'eau est de  $20 \pm 1$  °C tout au long de l'essai, chez les témoins et les groupes exposés. Des écarts transitoires (pendant 1 à 2 jours) par rapport à cette valeur moyenne peuvent survenir occasionnellement mais ne doivent pas excéder  $\pm 2$  °C.

### **DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**

### Appareillage

11. Les récipients d'essai et autres dispositifs en contact avec les solutions d'essai doivent être en verre ou un autre matériau chimiquement inerte.

12. Il faut disposer de tout ou partie des équipements suivants :

- enceinte climatique, ou local climatisé, ou tout dispositif permettant le contrôle de la température ;
- dispositif adapté permettant de régler le régime d'éclairage et de mesurer l'intensité lumineuse ;
- appareil de mesure de l'oxygène dissous ;
- pH-mètre ;
- conductimètre ;
- matériel pour la détermination de la dureté de l'eau ;
- kits ou autre matériel de mesure de l'ammonium, des nitrites et des nitrates dans l'eau ;
- récipients de 1 L en verre pouvant être couverts d'un couvercle perforé, d'un filet ou de tout autre dispositif empêchant les escargots de s'échapper mais laissant entrer l'air ;
- pompes à air, tuyaux à air, pipettes Pasteur ;
- valves réglables pour le contrôle du débit d'air ;
- pied à coulisse (numérique) ;
- lames de rasoir et/ou cuillères à bord tranchant ;
- stéréomicroscope équipé d'une source lumineuse (pour le comptage des œufs) ;
- flacons volumétriques et autre verrerie de laboratoire pour la préparation des solutions ;
- pipettes en verre.

### Organisme d'essai

13. L'espèce à utiliser pour cet essai est *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758).

14. Les *Lymnaea stagnalis* adultes utilisés pour cet essai doivent provenir d'une culture de laboratoire dûment contrôlée, exempte de parasites. Ils doivent avoir été maintenus dans des conditions de culture similaires aux conditions prévues lors de l'essai (on trouvera à l'annexe 2 le protocole de culture de *Lymnaea stagnalis*). La photopériode et la température, en particulier, doivent être similaires dans les conditions de culture et d'essai. On n'utilisera pas d'organismes prélevés directement en milieu naturel.

15. Les organismes soumis à l'essai doivent avoir une coquille de longueur comprise entre 2.5 et 3.0 cm au début de l'essai. On s'assure du respect de ce critère de longueur en mesurant la longueur maximale de la coquille à l'aide d'un pied à coulisse (numérique), par exemple. Il convient de manipuler les escargots avec précaution, afin d'éviter de casser leur coquille ; on veillera notamment à préserver l'apex de la coquille lors de la mesure/manipulation des escargots.

### Milieu d'essai

16. Pour les essais, il est possible d'utiliser de l'eau du robinet déchlorée par filtration sur charbon actif, de l'eau reconstituée ou toute eau non contaminée conforme aux critères de qualité énumérés ci-

après. L'eau du robinet doit être utilisée avec précaution, les conduites d'eau pouvant contenir/relarguer du cuivre qui peut être extrêmement toxique pour les organismes d'essai et rendre difficile la comparaison des résultats de différents laboratoires (8). Il est recommandé d'utiliser une eau similaire à l'eau utilisée pour la culture (voir l'annexe 2). L'eau utilisée pour l'essai, y compris l'eau servant à renouveler le milieu d'essai, doit atteindre la température d'essai et la concentration en oxygène dissout avant utilisation.

17. Les valeurs suivantes doivent être établies et maintenues pour les paramètres de l'eau :

- pH : plage de 6.5-8.5 ;
- concentration d'oxygène (chez les témoins) :  $> 6 \text{ mg L}^{-1}$  à  $20 \text{ °C}$  ( $> 60 \%$  de la valeur de saturation en air) ;
- conductivité :  $600 \pm 200 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$  ;
- dureté de l'eau : dans la plage de  $140\text{-}250 \text{ mg L}^{-1}$  en  $\text{CaCO}_3$ , de préférence proche de  $250 \text{ mg L}^{-1}$ .

### **Solutions d'essai**

18. Les solutions d'essai sont habituellement amenées aux concentrations voulues par dilution d'une solution mère. On préparera les solutions mères en dissolvant le produit chimique d'essai dans l'eau utilisée pour les essais, par des moyens mécaniques de type agitation, brassage ou ultrasons, ou par d'autres méthodes appropriées. On évitera si possible l'usage de solvants. Pour les produits chimiques difficiles, on consultera le document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges difficiles (9).

19. Si un solvant est nécessaire pour obtenir une solution mère à la concentration voulue et homogène, la concentration finale de solvant doit être maintenue à un minimum, et ne devra pas dépasser  $20 \text{ } \mu\text{l L}^{-1}$  (10). Il faudra alors prévoir un témoin solvant en plus du témoin négatif (eau de dilution seule). La concentration de solvant devra être la même à toutes les concentrations d'essai et chez le témoin solvant (8, 9, 10). Seuls des solvants dont il est établi qu'ils n'ont pas d'effets significatifs sur la réponse des organismes adultes peuvent être utilisés lors de l'essai. Le choix d'un solvant adapté dépend des propriétés physicochimiques du produit chimique testé et de la sensibilité des organismes d'essai (10,12), qu'il est préférable de déterminer par une étude préalable.

## **PROCÉDURE**

### **Conditions d'exposition**

#### **Durée**

20. La durée de l'essai est de 28 jours.

#### **Chargement**

21. Deux jours avant le début de l'essai, les récipients d'essai sont remplis de 1 L d'eau d'essai propre à la température requise. Les *Lymnaea stagnalis* adultes sont prélevés parmi les escargots flottant dans l'eau de culture, et/ou détachés des parois de verre (au moyen par exemple d'une brosse ou d'une fine cuillère plate introduite avec précaution entre le corps de l'escargot et le verre). Hormis le port de gants, aucun équipement spécifique n'est requis pour manipuler les escargots. Les animaux blessés

avant ou pendant la collecte ne doivent pas être inclus dans l'essai. Il convient de vérifier que la longueur de la coquille se situe bien entre 2.5 et 3.0 cm. Des groupes de cinq escargots sont placés de façon aléatoire dans les récipients d'essai contenant de l'eau propre, et nourris *ad libitum*. La longueur moyenne des coquilles ne doit pas différer notablement entre les récipients d'essai (ce qu'il convient de vérifier par une méthode statistique appropriée).

22. Au cours de cette période d'acclimatation de deux jours, il convient de s'assurer que la reproduction a bien lieu, dans les conditions de l'essai, avant de débiter l'exposition au produit chimique testé. Dans le cas contraire, on prolongera la période d'acclimatation jusqu'à ce que la reproduction ait commencé (c'est-à-dire l'observation d'au moins une grappe) dans deux tiers au moins des récipients d'essai. Pendant ce temps, l'eau des récipients d'essai devra être renouvelée au moins deux fois par semaine. Les grappes d'œufs pondus pendant l'acclimatation sont retirées des récipients et écartées. À J 0, les récipients d'essai doivent être randomisés selon le niveau de production de grappes, pour redistribuer les réplicats aux différents traitements expérimentaux de façon équilibrée. L'eau d'essai est renouvelée et le produit chimique testé est ajouté pour la première fois.

### **Alimentation**

23. Les escargots sont nourris de laitue fraîche lavée à l'eau propre. Il est préférable d'utiliser de la laitue de qualité biologique (certifiée par le label européen *ECOCERT* ou un label équivalent). On utilisera si possible de la laitue pommée, ou tout autre variété de laitue à feuilles lisses. Les escargots ne mangent généralement pas les parties dures des feuilles : elles seront retirées pour éviter l'accumulation de résidus dans les récipients d'essai et les pertes de produit chimique testé.

24. Les animaux sont nourris *ad libitum*, de préférence chaque jour ouvré, mais au minimum deux fois par semaine, lors du renouvellement du milieu d'essai. L'alimentation *ad libitum* correspond chez l'adulte à environ 3.5 g de laitue fraîche/individu/semaine. Cependant, cette quantité doit être augmentée si les escargots consomment toute la nourriture entre deux apports. On la réduira si l'on observe une baisse de consommation chez les animaux du fait du produit chimique testé, afin d'éviter une accumulation de résidus pouvant se traduire par des concentrations nocives d'ammoniac et de nitrites. Les résidus sont retirés des récipients d'essai lors du renouvellement de l'eau. La consommation d'aliments influant sur l'efficacité de la reproduction, toute baisse de la prise d'aliments doit être signalée.

### **Régime d'éclairage**

25. On utilisera une photopériode constante de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. La source de lumière (spectre de la lumière naturelle) est positionnée au-dessus des récipients d'essai de façon à assurer une intensité lumineuse de 250 à 500 lux à la surface de l'eau.

### **Température**

26. La température moyenne du milieu d'essai doit être de  $20 \pm 1$  °C pendant toute la durée de l'essai. Des écarts transitoires par rapport à cette valeur moyenne peuvent survenir occasionnellement pendant un ou deux jours, mais ne doivent pas excéder  $\pm 2$  °C.

### Aération

27. L'eau des récipients d'essai doit être aérée en douceur, au moyen de pipettes en verre (pipettes Pasteur) raccordées au système d'aération. Des valves réglables permettent d'assurer un débit d'air continu et constant.

28. La teneur en oxygène dissous doit rester supérieure à 60 % de la VSA, mais il convient d'aérer les récipients d'essai en douceur, pour ne pas provoquer l'évaporation des produits chimiques testés. La volatilisation est réduite quand les récipients sont couverts (voir § 12).

### Conception de l'essai

29. Le protocole d'essai a été validé en conditions semi-statiques, avec renouvellement d'eau deux fois par semaine. Toutefois, lorsque les produits chimiques testés se dissipent rapidement, il est possible de renouveler l'eau plus fréquemment, afin que la concentration d'exposition reste supérieure à 80 % de la valeur nominale (cf. § 36). *Lymnaea stagnalis* peut également s'accommoder d'un essai en conditions dynamiques (13). Dans ce cas, le système, en particulier le débit d'écoulement, doit être ajusté pour que les critères de validité soient respectés (cf. § 10).

30. Il convient de tester au moins cinq concentrations, appliquées chacune à un minimum de six réplicats de cinq escargots (c'est-à-dire au total 30 escargots/concentration), les concentrations formant une série géométrique dans laquelle le facteur entre concentrations nominales adjacentes ne dépasse pas de préférence 3.2. Une justification devra être fournie si l'on utilise moins de cinq concentrations et/ou un facteur multiplicatif supérieur à 3.2 (dans le cas, par exemple, d'une courbe concentration-réponse à faible pente lors des essais de détermination de la gamme de concentrations). Une connaissance préalable de la toxicité du produit chimique testé (grâce, par exemple, à des essais de détermination de la gamme de concentrations) aidera à choisir les concentrations d'essai appropriées. Si l'objectif est d'établir une CSEO, les concentrations étudiées doivent encadrer la valeur attendue. Pour une  $CE_x$ , quel que soit  $x$ , les concentrations d'essai doivent idéalement encadrer la concentration recherchée.

31. Lors de la conception de l'essai, on tiendra compte de l'objectif visé, qui peut être d'établir une CSEO/CMEO, des valeurs  $CE_x$  ou d'autres effets mesurés pertinents issus de modèles mécanistiques, conformément au guide de l'OCDE sur les méthodes d'analyse des données d'écotoxicité (3). La recherche d'une CSEO/CMEO amènera à augmenter le nombre de réplicats, tandis que l'estimation d'une  $CE_x$  exige généralement plus de concentrations. Le nombre de concentrations d'essai ou le nombre de réplicats par concentration peuvent être augmentés si nécessaire pour assurer une puissance statistique adéquate.

32. L'introduction du produit chimique testé dans les récipients d'essai marque le début de l'essai (J 0). Il convient d'introduire le produit avant de nourrir les escargots. On prépare les solutions d'essai aux concentrations choisies en introduisant la quantité adéquate de solution mère dans les récipients d'essai contenant 1 L d'eau d'essai propre à la température requise. Un mélange homogène avec l'eau est ensuite assuré en douceur par agitation manuelle. Il est également possible de préparer les solutions d'essai aux concentrations voulues en introduisant la quantité adéquate de solution mère dans un réservoir contenant au moins 6 L d'eau d'essai propre à la température d'essai. Le mélange homogène avec l'eau est assuré par agitation, puis le liquide est réparti dans les récipients d'essai.

### **Détermination de la gamme de concentrations**

33. L'essai de détermination de la gamme de concentrations doit être conduit conformément aux règles de bonne pratique (14). Les conditions d'exposition (critères de validité compris) doivent être identiques à celles de l'essai proprement dit. Cependant, il est possible de réduire le nombre de concentrations d'essai et/ou d'augmenter le facteur multiplicatif entre concentrations adjacentes. Il est en outre possible de ramener à quatre le nombre de réplicats par traitement ou de réduire la durée de l'essai.

### **Essai limite**

34. Si aucun effet statistiquement significatif n'est observé à la concentration d'essai la plus élevée lors de l'essai de détermination des concentrations, ou s'il est très probable que le produit chimique testé est peu ou non toxique compte tenu de son absence de toxicité pour d'autres organismes et/ou d'une absorption faible/nulle, il est possible de mener l'essai de reproduction comme un essai limite, en testant un témoin et une concentration du produit chimique d'essai de 10 mg L<sup>-1</sup>, par exemple, ou correspondant à la solubilité maximale du produit dans l'eau. Il convient alors d'utiliser dix réplicats pour le groupe exposé et dix réplicats pour le groupe témoin. Un essai limite permettra de démontrer l'absence d'effet statistiquement significatif à la concentration limite, mais si des effets statistiquement significatifs sur le nombre de grappes par individu-jour sont observés, un essai complet sera nécessaire.

### **Témoins**

35. L'essai doit comporter au moins six récipients témoins (ne contenant pas de produit chimique testé). Si un solvant a été utilisé pour l'application du produit chimique testé, six réplicats d'un témoin solvant comportant la même quantité de solvant que les traitements seront en outre nécessaires. Dans le cas d'un test limite, il convient d'étendre le nombre de réplicats dans les témoins à dix (cf. § 34).

### **Renouvellement du milieu d'essai**

36. Pour un essai d'exposition en conditions semi-statiques, il convient de renouveler complètement l'eau de chaque récipient d'essai au moins deux fois par semaine, afin que la concentration d'exposition soit maintenue au-dessus de 80 % de la valeur nominale et que les paramètres physicochimiques demeurent adéquats entre deux renouvellements d'eau. Cette fréquence de renouvellement peut être portée à trois par semaine si le produit chimique testé est facilement dégradable. La dégradabilité sera estimée par des tests de stabilité préliminaires, ou d'après les propriétés physicochimiques du produit chimique testé. Les jours de renouvellement sont choisis de telle sorte que l'intervalle de temps entre deux renouvellements successifs soit constant (par exemple renouvellement le lundi matin et le jeudi après-midi, pour un intervalle de 3.5 jours entre deux renouvellements).

37. La procédure de renouvellement de l'eau est la suivante. On retire avec précaution l'eau des récipients d'essai afin que les escargots ne tombent pas, ce qui risquerait d'endommager leur coquille. Il est possible d'utiliser un tamis pour recueillir les escargots qui pourraient se détacher des parois de

verre, ainsi que les résidus de nourriture. On élimine les résidus de nourriture après s'être assuré qu'il ne reste pas de grappes d'œufs sur ou dans ces résidus. On essuie les récipients d'essai avec du papier absorbant pour éliminer les fèces, les résidus de nourriture et le biofilm. Une autre solution consiste à utiliser des béciers propres. Les récipients d'essai sont ensuite remplis d'eau à la température d'essai. On ajoute immédiatement à l'eau propre le produit chimique testé, en utilisant la solution mère. Le milieu d'essai fraîchement préparé est homogénéisé par agitation manuelle. Les escargots sont alors replacés dans le récipient d'essai. La nourriture est fournie *ad libitum*, une fois l'eau renouvelée et additionnée du produit chimique.

### **Observations**

38. On observe les animaux de préférence une fois par jour, lors de la distribution de nourriture, mais au moins deux fois par semaine, lors d'un examen visuel permettant d'évaluer tout comportement anormal (par exemple évitement de l'eau ou de la nourriture, entassement des escargots, léthargie, altération du réflexe de rétraction ou cannibalisme). Tout comportement anormal doit être consigné.

### **Mortalité**

39. Les escargots morts sont faciles à identifier car leur pied sort anormalement de la coquille. Ils peuvent aussi émettre une odeur désagréable. De plus, l'absence de réaction en cas de stimulation du pied avec une pointe émoussée est une indication fiable de la mort de l'animal.

40. Le nombre d'escargots morts doit être consigné chaque jour lors de la distribution de nourriture. Les escargots morts sont retirés des récipients d'essai et comptés. La mortalité doit être prise en compte dans le calcul de l'efficacité de reproduction (cf. § 49).

### **Reproduction**

41. Le nombre de grappes d'œufs pondues par réplicat est consigné au minimum deux fois par semaine, lors du renouvellement du milieu d'essai. Les grappes sont retirées avec précaution des parois de verre, au moyen d'une lame de rasoir ou d'une cuillère métallique à bord tranchant, et comptées. Le nombre d'œufs par grappe peut également être compté, à titre d'information complémentaire. À cet effet, les grappes sont transférées dans des boîtes de Petri (ou tout autre contenant approprié, plaques six puits, par exemple) et observées au stéréomicroscope, et le nombre d'œufs par grappe est consigné. Si des œufs anormaux sont produits (voir l'annexe 3 pour la définition des anomalies), ils peuvent aussi être comptés et notés. Après comptage des grappes d'œufs (et éventuellement du nombre d'œufs par grappe et de la fréquence des anomalies), les œufs sont tués par congélation rapide des grappes d'œufs.

### **Croissance**

42. On mesure la longueur de la coquille des animaux adultes à la fin de l'essai au moyen d'un pied à coulisse (numérique), si l'on souhaite disposer de cette donnée complémentaire. La croissance moyenne des groupes exposés et témoins est calculée d'après l'augmentation de la longueur de la coquille entre le début et la fin de l'essai. Une fois la taille mesurée et si aucun autre examen (histopathologique, par exemple) n'est pratiqué, les adultes exposés sont tués de préférence par congélation rapide à -80 °C ou par cryoconservation.

### **Fréquence des mesures et analyses**

### **Concentration du produit chimique testé**

43. Au cours de l'essai, le dosage du produit chimique testé est effectué à intervalles réguliers. Les résultats doivent être basés sur les concentrations mesurées. Cependant, si la concentration du produit chimique testé dans la solution a été correctement maintenue dans un intervalle de  $\pm 20\%$  autour de la concentration nominale tout au long de l'essai, les résultats peuvent être basés soit sur les valeurs nominales, soit sur les valeurs mesurées.

44. On détermine au minimum la concentration d'essai la plus élevée et la concentration d'essai la plus basse dans le milieu d'essai fraîchement additionné de produit chimique, au début de l'essai (de préférence dans l'heure suivant l'introduction du produit chimique testé) et dans la solution usagée au moment du renouvellement, et ce une fois au cours de la première semaine d'essai. Pour ces analyses, qui doivent être répétées à intervalles d'une semaine, on regroupe l'eau des différents réplicats.

45. Si l'on prévoit que la concentration du produit chimique testé s'écartera de plus de  $20\%$  de la valeur nominale, il faut analyser toutes les concentrations d'essai, au moment de la préparation et du renouvellement. Dans ce cas, les résultats doivent être exprimés en concentrations moyennes mesurées, ou en concentrations moyennes pondérées dans le temps (MPT) pour les produits chimiques dont la cinétique se traduit par une dissipation rapide (15 ; voir les consignes de calcul à l'annexe 4).

46. Si l'analyse du produit chimique requiert des échantillons volumineux qui ne peuvent être prélevés des récipients sans influencer le système d'essai, les analyses seront pratiquées sur des échantillons provenant de récipients d'essai supplémentaires traités de la même façon (y compris pour ce qui est de la présence des organismes d'essai) mais non utilisés pour les observations biologiques.

### **Paramètres physicochimiques**

47. Le pH, l'oxygène dissous dans l'eau d'essai et la température dans les récipients sont mesurés par des moyens appropriés (cf. § 12) dans un réplicat par traitement, avant et après renouvellement du milieu d'essai, tous les deux renouvellements. La dureté de l'eau est mesurée au minimum dans les récipients témoins et dans un récipient d'essai à la concentration la plus élevée, au début et à la fin de l'essai. La dureté de l'eau peut influencer sur la toxicité des composés ioniques. Si l'essai porte sur ce type de composé, on mesurera la dureté de l'eau au début, au milieu et à la fin de l'essai. L'ammoniac, les nitrites et les nitrates seront dosés si une mortalité anormale est observée chez les témoins ou dans un réplicat aux concentrations les plus basses (cf. § 24). Toutes les valeurs des paramètres physicochimiques seront consignées sur une feuille de calcul, par exemple (voir l'exemple de l'annexe 5).

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### **Traitement des résultats**

48. Cet essai a pour objet de déterminer les effets du produit chimique testé sur l'efficacité de la reproduction. La survie des animaux parents et le nombre de grappes d'œufs produites par récipient d'essai sont notés sur une feuille de calcul, par exemple (voir l'exemple de l'annexe 6). Les autres effets néfastes (altération de la consommation d'aliments ou de la croissance, comportement anormal et résultats toxicologiques importants, par exemple) doivent également figurer dans le rapport final.

49. L'efficacité de la reproduction doit refléter la production de grappes d'œufs par organisme parent survivant sur la durée de l'essai (28 jours). Pour chaque réplicat, l'efficacité de reproduction s'obtient en divisant le nombre cumulé de grappes d'œufs recueillies sur 28 jours dans un récipient d'essai donné par le NIJ de ce récipient (2 ; voir les consignes de calcul de l'annexe 7).

50. D'autres effets liés au produit chimique testé, comme la production d'œufs par organisme parent survivant ou la croissance moyenne, peuvent également être étudiés. Pour chaque réplicat, la production d'œufs s'obtient en divisant le nombre cumulé d'œufs recueillis sur 28 jours dans un récipient d'essai donné par le nombre d'individu-jour (NIJ, cf. annexe 1) de ce récipient (2 ; voir les consignes de calcul de l'annexe 7).

51. Si l'essai comporte des témoins pour l'eau et des témoins solvant, il est suggéré de regrouper l'ensemble des données sur les témoins, à moins qu'il n'existe une différence statistiquement significative entre eux ou que des autorités réglementaires réclament de ne pas regrouper les témoins, auquel cas seul le témoin solvant sera utilisé pour l'évaluation des effets des traitements (11, 16, 17).

### *CE<sub>x</sub>*

52. Les valeurs  $CE_x$ , ainsi que leurs limites de confiance/crédibilité inférieures et supérieures, sont estimées par toute méthode statistique appropriée fondée sur une analyse de régression du nombre de grappes (ou d'œufs) par individu-jour. Bien que tout logiciel statistique convienne pour l'analyse de régression (3), il est recommandé d'utiliser la plateforme web conviviale MOSAIC\_repro, disponible gratuitement à l'adresse <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/mosaic/reproduction/>, car les procédures mises en œuvre dans ce logiciel ont été développées lors du processus de validation de l'essai de reproduction chez *L. stagnalis* (voir l'annexe 7 pour plus de précisions).

53. La conception de l'essai proposée convient bien pour l'estimation des valeurs  $CE_{50}$  et la détermination des valeurs CSEO/CMEO. Elle permet aussi l'estimation des valeurs  $CE_{10}$  ou  $CE_{20}$ , mais la fiabilité statistique et la pertinence biologique des valeurs estimées doivent être minutieusement vérifiées sur toute l'étendue de leurs intervalles de confiance/crédibilité à 95 %. Les concentrations d'essai doivent être choisies avec soin. En effet, les concentrations d'essai encadrant la  $CE_{50}$  peuvent ne pas permettre une estimation correcte des valeurs  $CE_{10}$  ou  $CE_{20}$ , du fait de la nécessité d'extrapoler en-deçà de la concentration d'essai la plus basse. À l'inverse, les concentrations encadrant la  $CE_{10}$  ou la  $CE_{20}$  ne permettront pas une estimation correcte de la  $CE_{50}$ , du fait de la nécessité d'extrapoler au-delà de la concentration d'essai la plus élevée.

### *CSEO/CMEO*

54. Si une analyse statistique est prévue pour déterminer la CSEO/CMEO, on utilisera des méthodes statistiques appropriées conformément au document de l'OCDE n° 54 sur les méthodes actuelles d'analyse des données d'écotoxicité (3). En règle générale, les effets indésirables du produit chimique testé par rapport au témoin sont analysés par des tests d'hypothèse unilatéraux, pour  $p < 0.05$ .

55. Des tests de tendance descendants sont recommandés pour déterminer s'il existe des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre le(s) témoin(s) et les différentes concentrations du produit chimique testé (3). Les comparaisons des nombres de grappes d'œufs par individu-jour sont réalisées par des méthodes paramétriques (test de Williams, par exemple) ou non paramétriques (test de tendance de

Jonckheere-Terpstra, par exemple), pour la détermination de la CSEO et de la CMEO. Pour le calcul d'une CSEO, on analyse le rapport reproduction/NIJ, où la reproduction est le nombre de grappes ou d'œufs par réplicat. On peut utiliser le logiciel R ou d'autres logiciels basés sur R, tels que StatCharrms, disponible à l'adresse [www.epa.gov/med/Prods\\_Pubs/rscabs.htm](http://www.epa.gov/med/Prods_Pubs/rscabs.htm), ou des logiciels du commerce comme ToxRat ([www.toxrat.com](http://www.toxrat.com)) et Cetis (<http://www.tidepool-scientific.com/cetis/cetisstats.html>) (voir l'annexe 7 pour plus de précisions).

### **Rapport d'essai**

56. Le rapport d'essai contient les informations suivantes :

Produit chimique testé :

- Substance mono-constituant :  
apparence physique, solubilité dans l'eau et autres propriétés physicochimiques pertinentes ;  
identification chimique telle que désignation IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si cela est faisable en pratique, etc. (y compris la teneur en carbone organique s'il y a lieu).
- Substance multi-constituants, UVBC et mélanges :  
caractérisés dans la mesure du possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), la teneur et les propriétés physicochimiques pertinentes des constituants.
- méthode analytique de dosage du produit chimique testé s'il y a lieu.

Espèce soumise à l'essai :

- nom scientifique, fournisseur ou provenance, et conditions de culture.

Conditions d'essai :

- méthode utilisée (par exemple semi-statique, volume, charge en nombre d'escargots par litre) ;
- photopériode et intensité lumineuse ;
- conception de l'essai (notamment nombre de réplicats, nombre d'escargots par réplicat, etc.) ;
- caractéristiques du milieu de culture (notamment pH, conductivité, température, concentration d'oxygène dissous, dureté de l'eau, concentration d'ammonium et toutes autres données mesurées) ;
- données précises sur l'alimentation (notamment type d'aliments, provenance, fréquence), y compris quantité (en mg/escargot/jour ou *ad libitum*) ;
- méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (le solvant et sa concentration doivent être indiqués s'il y a lieu).

Résultats :

- résultats de toutes études préliminaires sur la stabilité du produit chimique testé ;
- concentrations nominales d'essai et résultats de tous les dosages du produit chimique testé dans les récipients d'essai ; le rendement de récupération de la méthode analytique et la limite de quantification doivent également être indiqués ;
- qualité de l'eau dans les récipients d'essai (à savoir pH, température, concentration d'oxygène dissous, dureté de l'eau et concentration d'ammonium) (voir l'exemple de feuille de données de l'annexe 5) ;

- nombres d'escargots morts et jours de survenue des décès (voir l'exemple de feuille de données de l'annexe 6) ;
- relevé complet de la production de grappes d'œufs par réplicat au cours de l'essai (voir l'exemple de feuille de données de l'annexe 6) ;
- représentation graphique du nombre total de grappes d'œufs produites par individu-jour dans chaque réplicat selon la concentration du produit chimique testé ;
- s'il y a lieu, CMEO pour la reproduction, avec description des méthodes statistiques utilisées et indication du niveau d'effet attendu (qu'il est possible d'établir en réalisant une analyse de puissance avant le début de l'expérimentation) et CSEO pour la reproduction ; s'il y a lieu, indiquer également la CMEO ou la CSEO pour la mortalité des escargots ;
- s'il y a lieu,  $CE_x$  pour la reproduction, avec intervalle de confiance/crédibilité (à 90 ou 95 %, par exemple), pente de la courbe concentration-réponse avec son intervalle de confiance/crédibilité et un graphe du modèle d'ajustement utilisé pour le calcul ;
- autres effets biologiques observés ou mesurés : signaler tous les autres effets biologiques qui ont été observés ou mesurés (par exemple nombre d'œufs par grappe, proportion d'œufs anormaux dans les grappes d'œufs, croissance des escargots, altérations du comportement) avec justifications appropriées ;
- explication de tout écart par rapport à la Ligne directrice.

**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) OCDE (2010). *Detailed review paper on mollusc life-cycle toxicity testing*. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement, Série sur les essais et les évaluations n° 121. OCDE, Paris.
- (2) Delignette-Muller M.L., Lopes C., Veber P. et Charles S. (2014). Statistical handling of reproduction data for exposure-response modeling. *Environmental Science and Technology* 48, 7544–7551.
- (3) OCDE (2006). *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application*. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement, Série sur les essais et les évaluations n° 54. OCDE, Paris.
- (4) OCDE (1992). *Essai No. 301: Biodégradabilité facile*. Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris.
- (5) OCDE (2014). *Essai No. 310: Biodégradabilité facile- [dégagement de CO2 dans des flacons hermétiquement clos \(essai de l'espace libre au-dessus du liquide\)](#)*. Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris.
- (6) OCDE (2016). *Validation Report of the OECD reproductive toxicity test guideline with the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda)*. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement, Série sur les essais et les évaluations n° 236. OCDE, Paris.
- (7) Ducrot V. *et al.* (2014). Development and validation of an OECD reproductive toxicity test guideline with the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 70, 605-614.
- (8) OCDE (2013). *Essai n° 210 : Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie*. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. OCDE, Paris.
- (9) OCDE (2000). *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement, Série sur les essais et les évaluations n° 23. OCDE, Paris.
- (10) Hutchinson T.H., Shillabeer N., Winter M.J. et Pickford D.B. (2006). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquatic Toxicology* 76, 69-92.
- (11) Green J.W. et Wheeler J. (2013). The use of carrier solvents in regulatory aquatic toxicology testing: Practical, statistical and regulatory considerations. *Aquatic Toxicology* 144-145, 242-249.
- (12) Veauvy C., Minardi D., Tasker J., Morris S. et Hutchinson T.H. (2013). Determination of the effects of methanol and triethylene glycol solvents on the growth and reproduction of the gastropod mollusc (*Lymnaea stagnalis*). CEFAS report for Defra project CB0467, 66 p.
- (13) Munley K.M., Brix K.V., Panlilio J., Deforest D.K. et Grosell M. (2013). Growth inhibition in early life-stage tests predicts full life-cycle toxicity effects of lead in the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic Toxicology* 128-129, 60-66.
- (14) OCDE (2012). *Fish Toxicity Testing Framework*. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement, Série sur les essais et les évaluations n° 171. OCDE, Paris.
- (15) Belgers J.D.M., Aalderink G.H., Arts G.H.P. et Brock T.C.M. (2011). Can time-weighted average concentrations be used to assess the risks of metsulfuron-methyl to *Myriophyllum spicatum* under different time-variable exposure regimes? *Chemosphere* 85, 1017-1025.

- (16) Green J.W. (2014). Power and control choice in aquatic experiments with solvents. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 102C, 142-146.
- (17) van der Hoeven N. (2010). Is it safe to pool the blank control data with the solvent control data? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1480-1483.

ANNEXE 1ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONSABRÉVIATIONS

- CE<sub>x</sub>** Concentration efficace à x%, c'est-à-dire concentration estimée pour laquelle un effet de x % est attendu.
- CMEO** La concentration minimale avec effet observé est la concentration d'essai la plus faible à laquelle on observe que le produit chimique testé exerce un effet statistiquement significatif. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO devraient avoir un effet nocif égal ou supérieur à celui observé à la CMEO.
- CSEO** La concentration sans effet observé est la concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.
- MPT** Moyenne pondérée dans le temps.
- NIJ** Nombre d'individus-jours, calculé en additionnant les périodes d'observation au cours desquelles chaque individu contribue à la reproduction (voir l'annexe 7 pour plus de précisions).
- VSA** Valeur de Saturation de l'Air

DÉFINITIONS

- Animaux parents :** Adultes reproducteurs dont la capacité reproductrice fait l'objet de l'étude
- Efficacité de reproduction :** Production de grappes par les animaux parents survivants au cours de la durée d'essai (28 jours)
- Fécondité :** Taux de reproduction effectif des organismes, mesuré par le nombre d'œufs ou de grappes d'œufs

ANNEXE 2RECOMMANDATIONS POUR LA CULTURE DE *LYMNAEA STAGNALIS*INTRODUCTION

1. Le présent mode opératoire normalisé décrit les modalités d'élevage en laboratoire de l'escargot d'eau douce *Lymnaea stagnalis* (grande lymnée, ou lymnée des étangs) visant à garantir une qualité biologique optimale et reproductible des organismes cultivés destinés à être utilisés dans des essais de toxicité. L'élevage doit donc permettre de produire tout au long de l'année un nombre suffisant d'escargots présentant une santé optimale et une sensibilité reproductible aux substances toxiques de référence. Les escargots cultivés doivent être exempts de parasites, présenter une faible mortalité et être capables de se reproduire toute l'année. Cela suppose un contrôle approprié de l'alimentation, de la photopériode et de la densité de population, conformément au présent mode opératoire normalisé.

ORGANISME D'ESSAITaxonomie

2. *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) appartient au phylum Mollusca, classe Gastropoda, sous-classe Euthyneura, ordre Basommatophora, famille Lymnaeidae. Cette espèce est extrêmement polymorphe, en particulier pour ce qui est de la forme et de la couleur de la coquille (1).

Écologie

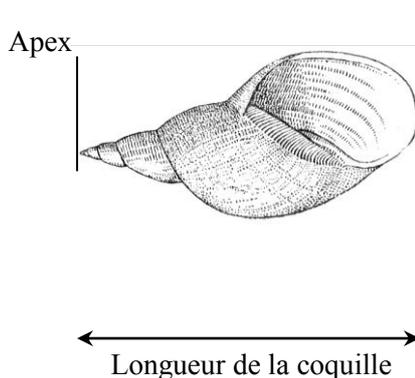
3. *Lymnaea stagnalis* est un escargot commun dans les régions holarctiques d'Europe, du nord de l'Asie et d'Amérique du Nord (2). Il habite les eaux douces stagnantes ou à faible courant (3), où il s'établit en populations de densité généralement faible (4). Essentiellement herbivore, il a un régime alimentaire variable selon sa taille. Les juvéniles se nourrissent principalement de matières/détritus végétaux de petite taille (5), les adultes de plantes vivantes ou mortes. Juvéniles et adultes consomment également des micro-algues, du périphyton, des bactéries et hyphes, et occasionnellement des petits invertébrés morts, y compris des congénères.

Biologie

4. La longévité est comprise entre un et deux ans en milieu naturel, selon les conditions environnementales (2). La longueur moyenne de la coquille chez l'adulte varie entre 2-6 cm (mesure du bord inférieur de l'ouverture à l'apex, cf. figure 1). *L. stagnalis* est un hermaphrodite simultané, mais les organes reproducteurs mâles arrivent à maturité avant les organes femelles (hermaphroditisme protandre). Lors de l'accouplement, un individu ne peut se comporter que comme mâle ou comme femelle. *L. stagnalis*, comme tous les basommatophores, peut s'autoféconder, et semble ne présenter que peu ou pas de dépression consanguine (6, 7). Cependant, la fécondation croisée est le mode de reproduction le plus courant (8). Après l'accouplement, les escargots peuvent stocker le sperme pendant un à trois mois (9). La reproduction intervient le plus souvent au début de l'été (2), les grappes d'œufs étant souvent déposées sur des plantes aquatiques. Le nombre d'œufs par grappe varie généralement entre 50 et 120 (10), selon la taille des adultes. Le taux d'éclosion est généralement supérieur à 70 % en eaux non polluées. Le développement embryonnaire dure habituellement de 10 à 30 jours, selon le nombre d'œufs par grappe et les conditions environnementales.

Spécificités en laboratoire

5. La longévité attendue en laboratoire est également comprise entre un et deux ans, et la longueur maximale de la coquille des escargots est généralement de 30 à 40 mm (mesure du bord inférieur de l'ouverture à l'apex, cf. figure 1). La reproduction a lieu toute l'année, avec une baisse saisonnière de fécondité en février-mars. Le renouvellement de l'eau des aquariums est connu pour favoriser la ponte (11). Les grappes d'œufs sont généralement déposées sur les parois de verre des aquariums. Les embryons (de 20 à 160 par grappe, selon la taille des adultes) sont faciles à observer au stéréomicroscope, à travers leur enveloppe transparente. On peut distinguer quatre étapes successives de développement embryonnaire (12). Le taux d'éclosion dépasse habituellement 90 % au bout de 28 jours.



**Figure 1.** Points de mesure pour la détermination de la longueur de la coquille chez *Lymnaea stagnalis*.

## ÉQUIPEMENT

### Aquariums et accessoires

6. On pourra utiliser les équipements suivants :
- enceintes climatiques ou local climatisé avec indicateur de température ;
  - aquariums de culture (5 L et 35 à 50 L, en verre) ;
  - système de filtration de l'eau (avec anneaux de céramique, sable grossier, coquilles de coques et/ou fragments de coraux, ou ouate filtrante du commerce) ;
  - pompes à eau ;
  - pompes à air ;
  - tubes flexibles à air (avec pipettes en verre) ;
  - électrodes de mesure de la température, de la conductivité, de l'oxygène et du pH ;
  - kits de mesure de l'ammonium, des nitrites et des nitrates dans l'eau ;
  - matériel de mesure de la dureté de l'eau ;
  - pied à coulisse numérique ;
  - cuillères métalliques à bord tranchant ou lames de rasoir.

Les filtres (biologiques ou du commerce) et toutes les matières plastiques utilisés pour la culture doivent être tels que la migration de plastifiants ou d'autres composés soit exclue. Il convient d'éviter le PVC.

**Produits chimiques et produits de conditionnement de l'eau**

7. Si l'on utilise l'eau du robinet, on procédera à une filtration sur charbon actif pour éliminer le chlore. Il est également possible d'utiliser de l'eau reconstituée présentant la dureté requise (environ 250 mg L<sup>-1</sup> en CaCO<sub>3</sub>) (milieu ISO 6341, par exemple (13), préparé selon les indications du tableau I).

**Tableau I.** Préparation du milieu ISO

Solutions mères (une seule substance)		Pour préparer l'eau reconstituée, ajouter les volumes suivants de solutions mères par litre d'eau*
Substance	Quantité ajoutée par litre d'eau*	
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O)	11.76 g	25 mL
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O)	4.93 g	25 mL
Bicarbonate de sodium (NaHCO <sub>3</sub> )	2.59 g	25 mL
Chlorure de potassium (KCl)	0.23 g	25 mL

\* Eau de pureté adéquate, par exemple de l'eau désionisée, distillée ou traitée par osmose inverse, avec une conductivité ne dépassant pas si possible 10 µS cm<sup>-1</sup>.

**Matériel biologique**

8. Les escargots destinés à être cultivés peuvent être prélevés soit dans une culture existante, soit en milieu naturel. Si l'on part d'une culture existante, il faut utiliser au minimum dix grappes d'œufs par aquarium à peupler. Si l'on part de populations en milieu naturel, il convient de trouver un emplacement non pollué présentant une densité suffisante d'escargots. On notera que la capacité de reproduction des escargots peut varier selon les populations naturelles dont ils sont issus. On utilisera au minimum 30 animaux fondateurs. Des taux élevés d'infestation par des parasites ont été rapportés chez *L. stagnalis* à l'état sauvage (14). Ces parasites (principalement cercaires, trématodes, cestodes, protistes et platyhelminthes) peuvent provoquer des maladies chez les escargots infestés. Il importe donc de vérifier l'absence de parasites en disséquant au moins 20 escargots et en observant (au stéréomicroscope) le tractus digestif et des coupes sagittales sur toute la longueur du corps de l'animal, afin d'exclure des cultures les populations infestées. Si aucun parasite n'est trouvé, les fondateurs sont acclimatés aux conditions de culture, lors d'une quarantaine d'au moins 30 jours. La culture de laboratoire est mise en place avec les grappes d'œufs de seconde génération.

9. Les grappes sont incubées à 20 °C dans des aquariums de 1 à 5 L jusqu'à l'éclosion, qui commence une dizaine de jours après la ponte. Les nouveau-nés ont le réflexe de s'échapper de l'eau pour commencer à respirer dans l'air ; il faut donc s'attendre à des pertes importantes (de près de 50 %) au cours du premier mois, car ces jeunes escargots tendent à se dessécher sur les parois des aquariums. L'utilisation d'aquariums de profondeur réduite et la mise à disposition de feuilles de laitue à la surface de l'eau, où les nouveau-nés peuvent se cacher et se nourrir, permettront de réduire ces pertes. Lorsque ce comportement de fuite cesse (trois semaines environ après la naissance), les juvéniles peuvent être transférés dans des aquariums de culture de 35 L, par groupes de 100-120 individus par aquarium.

**CONDITIONS D'ÉLEVAGE****Température et régime d'éclairage**

10. La culture de *L. stagnalis* exige une température constante de l'eau, de 20 ± 2 °C, et une

photopériode constante de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité, pour une intensité lumineuse de 250-500 lux (spectre de la lumière naturelle).

### **Milieu de culture**

11. Il est possible d'utiliser de l'eau du robinet déchlorée par filtration sur charbon actif ou de l'eau reconstituée. Tout milieu reconstitué répondant aux exigences du § 12 ci-après pour la qualité de l'eau peut être utilisé comme milieu de culture. On trouvera des exemples d'eau de culture adaptée dans le document ISO 6341:2012 (13 ; cf. tableau 1) et le document de l'OCDE de 2010 relatif aux essais de toxicité sur le cycle de vie chez les mollusques (15).

12. Les valeurs suivantes doivent être établies et maintenues pour les paramètres de l'eau :

- Température :  $20 \pm 2$  °C ;
- pH : plage de 7 à 8.5 ;
- Concentration d'oxygène :  $> 6$  mg L<sup>-1</sup> à 20 °C ( $> 60$  % de la valeur de saturation en air) ;
- Conductivité : entre 400 et 800  $\mu$ S cm<sup>-1</sup> ;
- Dureté : environ 250 mg L<sup>-1</sup> en CaCO<sub>3</sub>.

Il convient de s'assurer du respect de ces critères avant d'utiliser l'eau dans les aquariums de culture.

### **Nourriture et alimentation**

13. Les escargots sont nourris de laitue fraîche (de qualité biologique certifiée par exemple par le label européen ECOCERT ou équivalent, et lavée à l'eau propre). On ajoutera si nécessaire une source d'alimentation secondaire pour favoriser la croissance (flocons pour poissons du commerce, par exemple). L'adjonction dans chaque aquarium d'une fine couche de sable coralien facilite la digestion chez les escargots et aide à maintenir un pH basique.

14. Il convient de nourrir les organismes de préférence chaque jour ouvré, mais au moins trois fois par semaine. La quantité de nourriture à fournir dépend de la densité de population et du stade de développement. Elle doit être choisie de telle sorte que les animaux atteignent le stade de développement et la taille requis au début des essais de toxicité. Les animaux sont nourris *ad libitum* pendant au moins deux semaines avant les essais de toxicité.

Si les organismes sont nourris de laitue, l'apport minimum est de 160 g d'aliments frais/100 ind./semaine. La quantité à prévoir pour une alimentation *ad libitum* chez l'adulte est de l'ordre de 320 g d'aliments frais/100 ind./semaine.

Il est également possible de nourrir les organismes d'aliments du commerce tels que TetraMin<sup>®</sup> ou une marque équivalente exempte d'activité endocrine. Avec TetraMin<sup>®</sup>, par exemple, l'alimentation *ad libitum* pour des juvéniles de 1.5 cm correspond à 7 g de flocons/100 ind./semaine. Pour des adultes, elle se situe entre 70 et 100 g de flocons/100 ind./semaine (16). Si des particules de nourriture non consommée s'accumulent au fond des aquariums, il convient de les retirer (6 heures au minimum après la distribution de nourriture) pour limiter la croissance des bactéries et champignons. Si l'eau est troublée par des résidus en décomposition, elle doit être entièrement renouvelée.

## **MODE OPÉRATOIRE**

### **Densité de population**

15. La densité de population est généralement de 100 à 120 adultes par aquarium de 35 L. Il est possible de modifier la densité de population pour que les escargots atteignent le stade de

développement et la taille requis en vue des essais de toxicité. En tout état de cause, la densité ne doit pas dépasser cinq adultes par litre.

### Nettoyage et entretien

16. Il convient de surveiller la température, le pH, la concentration d'oxygène, la conductivité et la concentration d'ammonium et de nitrites de tous les aquariums. Des mesures complémentaires d'ammonium et de nitrates ainsi que de dureté de l'eau peuvent être nécessaires (par exemple en cas d'installation récente des aquariums ou si l'on observe une anomalie de l'eau et/ou du comportement des escargots). On nettoiera les électrodes avec soin avant de passer d'un aquarium au suivant, afin d'empêcher un transfert éventuel de maladies ou de pathogènes. Les escargots morts, s'il y en a, seront retirés à cette occasion.

17. L'eau de culture doit être renouvelée chaque semaine si les escargots sont nourris de laitue, ou trois fois par semaine s'ils sont nourris de flocons pour poissons. Un tiers du volume de l'aquarium est remplacé par de l'eau fraîche provenant de l'aquarium de réserve, au moyen par exemple d'un siphon qu'il faut nettoyer avec soin avant de passer d'un aquarium au suivant.

On retirera en même temps les débris (restes de nourriture, en particulier) et les grappes d'œufs pondus par les adultes sur les parois de verre. Les grappes sont détachées des parois de verre avec précaution, au moyen d'une lame de rasoir, par exemple, et peuvent ensuite être aspirées avec le siphon.

Avant de remplacer l'eau des aquariums de culture, on mesurera la température, le pH, la concentration d'oxygène et la conductivité de l'eau dans l'aquarium de réserve. Après le renouvellement, il est possible d'ajouter à chaque aquarium un maximum de 1 mL d'une solution saturée de carbonate de calcium, si nécessaire (par exemple si un grand nombre d'animaux présentent une coquille décalcifiée), pour favoriser la croissance de la coquille chez les escargots. Lors des procédures de nettoyage, on manipulera les escargots avec précautions, afin de limiter/éviter le stress.

18. Un nettoyage approfondi des aquariums et des pompes filtrantes est nécessaire toutes les 6 à 8 semaines. Selon le degré de propreté des filtres, il convient de nettoyer les matériaux filtrants, ou de les remplacer aux deux tiers au maximum, afin de conserver les bactéries utiles telles que les bactéries dénitrifiantes.

### Maladies et mortalité

19. À notre connaissance, aucune maladie n'a jamais été observée dans des cultures de *L. stagnalis* exemptes de parasites, lorsque les conditions ci-dessus sont respectées.

20. Il importe de contrôler quotidiennement les aquariums (lors de la distribution de nourriture) afin de noter toute anomalie dans les conditions d'élevage (développement de bactéries ou de champignons, par exemple) ou dans le comportement/la santé des animaux (comportement de fuite, entassement, absence de réflexe de rétraction ou cannibalisme, par exemple). La manipulation des escargots peut susciter un comportement de fuite : lorsqu'ils sont dérangés ou retirés des aquariums, les animaux éjectent de l'air et/ou de l'hémolymphe. Des phénomènes d'entassement et/ou de cannibalisme occasionnel sont couramment observés lorsque *L. stagnalis* est élevé en masse. Ces comportements ne sont pas un signe de mauvaise santé des escargots. L'absence de réflexe de rétraction et de réponse à une stimulation mécanique indique la mort prochaine de l'animal. Ces symptômes n'affectent généralement que quelques individus, qu'il faut alors retirer de la culture. Cependant, si de tels signes sont fréquemment observés dans un aquarium, ou en cas d'évitement de l'eau, l'aquarium doit être retiré de la culture.

21. On retirera les escargots morts des aquariums de culture une fois par semaine. En cas de

mortalité anormalement élevée (c'est-à-dire de mortalité soudaine affectant environ 15 % des effectifs sur une période de 15 jours (15), l'aquarium doit être exclu de la culture. Les animaux sont tués par exemple par une forte dose de narcotique (exposition de 24 h à une solution à 2.5 % de  $MgCl_2$ ) et éliminés. L'aquarium et tout l'équipement doivent être nettoyés et désinfectés avec soin.

### **Contrôle de la productivité de la culture**

22. On analysera régulièrement le succès reproducteur, pour suivre le cycle reproductif annuel et évaluer la productivité de la culture, en appliquant la procédure suivante :

- Vingt escargots de taille homogène sont délicatement prélevés parmi les escargots flottant librement et/ou retirés des parois de verre;
- La longueur de la coquille est mesurée au pied à coulisse (numérique). Les escargots sont ensuite répartis dans des réplicats par groupes de cinq individus;
- On utilisera au moins cinq réplicats constitués de récipients en verre remplis de 1 L d'eau de culture;
- Les grappes d'œufs produites sur une période de trois jours sont comptées et retirées des récipients au moyen, par exemple, d'une lame de rasoir ou d'une cuillère à bord tranchant. Le nombre d'œufs par grappe est compté (au stéréomicroscope). Les données sont consignées sur une feuille de calcul, par exemple;
- On calcule le nombre d'œufs produits par escargot sur la base des données précédentes, en tenant compte de la mortalité dans les récipients d'essai, s'il y a lieu;
- On calcule la moyenne et les paramètres de variabilité (écart type, par exemple, ou erreur type de la valeur moyenne) pour chacun des effets mesurés;
- On procède à une évaluation statistique du nombre d'œufs produits par escargot et de la longueur des coquilles. Le nombre de grappes et le nombre d'œufs par grappe peuvent également être étudiés à titre complémentaire.

### **Maintenance des populations cultivées**

23. Il importe de renouveler régulièrement les populations pour éviter (i) de mélanger des cohortes dans un même aquarium et (ii) de cultiver de vieux escargots (c'est-à-dire des escargots de plus de dix-huit mois, présentant une faible fécondité) (17). Les grappes utilisées pour ce renouvellement peuvent provenir des adultes à remplacer. Les grappes provenant des différents aquariums à renouveler peuvent être réunies dans des aquariums d'éclosion de 5 L. Les nouveaux aquariums de culture sont ensuite installés selon la procédure décrite au § 8.

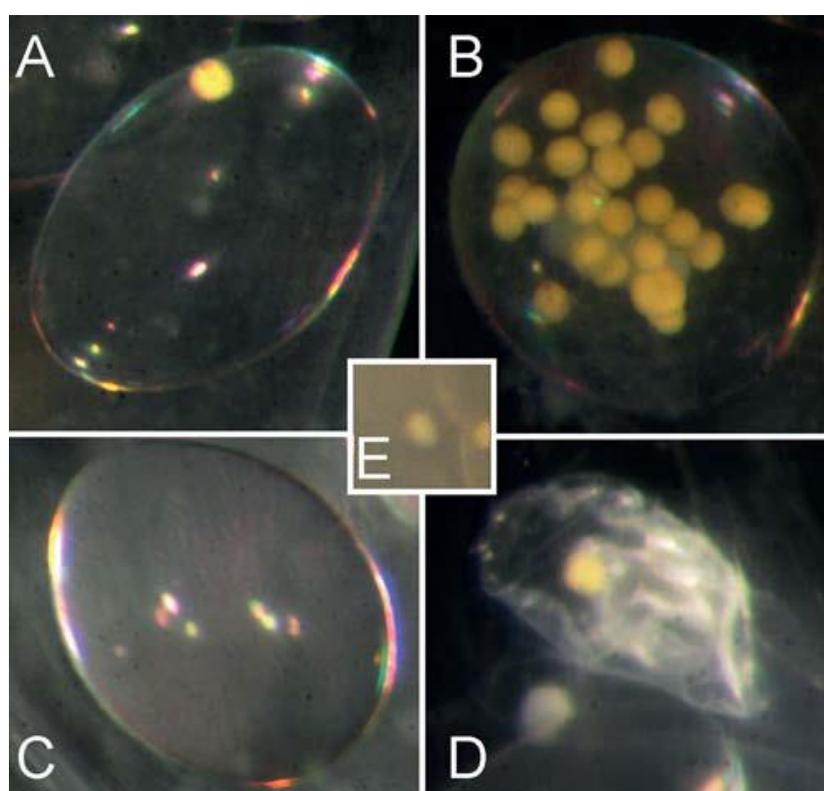
24. Il est recommandé d'introduire de nouvelles ressources génétiques dans la culture (une fois par an, par exemple) en utilisant au moins 30 escargots prélevés dans une autre culture ou recueillis en milieu naturel et élevés en quarantaine, et en ajoutant des grappes de deuxième génération à l'élevage de masse, comme indiqué au § 8. Dans les deux cas, il convient de mélanger de nouvelles grappes aux grappes produites par les adultes issus de la culture, afin d'assurer un mélange de caractéristiques génétiques.

**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Piaget J., 1928. Un problème d'hérédité chez la limnée des étangs; appel aux malacologistes et aux amateurs en conchyliologie. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 53:13-18.
- (2) Berrie A.D., 1965. On the life cycle of *Lymnaea stagnalis* (L.) in the West of Scotland. *Proceedings of the Malacological Society of London* 36: 283-295.
- (3) Adam W., 1960. *Mollusques terrestres et dulçaquicoles (Tome I)*. In: Faune de Belgique, Ed.: Institut Royal des Sciences de Belgique, Bruxelles, pp. 173-174.
- (4) Brown K.M., 1978. The adaptive demography of four freshwater pulmonate snails. *Evolution* 33: 417-432.
- (5) Kolodziejczyk A. et Martynuska A., 1980. *Lymnaea stagnalis* (L.) - Feeding habits and production of faeces. *Ekologia Polska* 28: 201-217.
- (6) Coutellec M.-A. et Lagadic L., 2006. Effects of self-fertilization, environmental stress and exposure to xenobiotics on fitness related traits of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Ecotoxicology* 15: 199-213.
- (7) Puurtinen, M., Knott, K.E., Suonpää, S., Nissinen, K. & Kaitala, V. 2007. Predominance of outcrossing in *Lymnaea stagnalis* despite low apparent fitness costs of self-fertilization. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 901-912.
- (8) Jarne P., David P., Pointier J.-P. et Koene J.M., 2010. *Basommatophoran Gastropods*. In: Cordoba-Aguilar A. et Leonard J.L. (Eds), The evolution of primary sexual characters in animals. Oxford University Press, 173-196.
- (9) Loose M.J. et Koene J.M., 2008. Sperm transfer is affected by mating history in the simultaneously hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis*. *Invertebrate Biology* 127: 162-167.
- (10) Nichols D., Cooke J. et Whiteley D., 1971. *The Oxford book of invertebrates*. Oxford University Press, Oxford.
- (11) ter Maat A., Lodder J. C., et Wilbrink M., 1983. Induction of egg-laying in the pond snail *Lymnaea stagnalis* by environmental stimulation of the release of ovulation hormone from the Caudo-Dorsal cells. *International Journal of Invertebrate Reproduction* 6: 239-247.
- (12) Lalah J. O., Severin G. F. Schramm K. W., Lenoir D., Behechti A., Guenther K. et Kettrup A., 2007. Effects of a branched p-nonylphenol isomer (4(3', 6'-dimethyl-3'-heptyl)-phenol) on embryogenesis in *Lymnaea stagnalis* L. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52: 104-112.
- (13) ISO 6341:2012, 2012. Qualité de l'eau -- Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) -- Essai de toxicité aiguë. ISO, Genève, 24 p.
- (14) Loy C. et Haas W., 2001. Prevalence of cercariae from *Lymnaea stagnalis* snails in a pond system in Southern Germany. *Parasitology Research* 87: 878-882.
- (15) OCDE, 2010. *Detailed review paper (DRP) on molluscs life-cycle toxicity testing*. In: Série de l'OCDE sur les essais et les évaluations n° 121. Ed. : Organisation de coopération et de développement économiques, Paris, 182 pp.
- (16) Tasker J., Veauvy C., Morris S., Askem C., Ducrot V., Lagadic L., Azam D., Coke M., Brown R., Holbech H., Ruppert K., Oehlman J., Weltje L., Roberts M., Hutchinson T.H. 2013. Baseline growth and reproductive parameters in *Lymnaea stagnalis* for OECD test guideline development: optimization of diets and culturing conditions. Society of Environmental Toxicology and Chemistry – Europe. 23rd Annual Meeting. 12-16 mai 2013. Glasgow, Royaume-Uni.
- (17) Janse C., van der Roest M., Jansen R.F., Montagne-Wajer C. et Boer H.H., 1996. Atrophy and degeneration of petidergic neurons and cessation of egg laying in the aging pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Neurobiology* 29: 202-212.

ANNEXE 3ANOMALIES DES ŒUFS

On peut évaluer la qualité des œufs en déterminant la fréquence de quatre types d'anomalies (figure 1B-E ; 1) : polyembryonie (présence de plusieurs embryons par œuf) ; œuf non fertilisé (absence d'embryon dans l'œuf, qui n'est constitué que d'une enveloppe et d'albumen) ; albumen atrophié (enveloppe de l'œuf endommagée contenant une quantité anormalement faible d'albumen) ; embryon isolé (présence d'un embryon qui ne se développe pas, sans enveloppe ni albumen).



**Figure 1.** Anomalies des œufs observées chez *Lymnaea stagnalis*. (A) œuf normal ; (B) polyembryonie ; (C) œuf non fertilisé ; (D) œuf avec albumen atrophié ; (E) cellule embryonnaire isolée. Extrait de Giusti *et al.*, 2013.

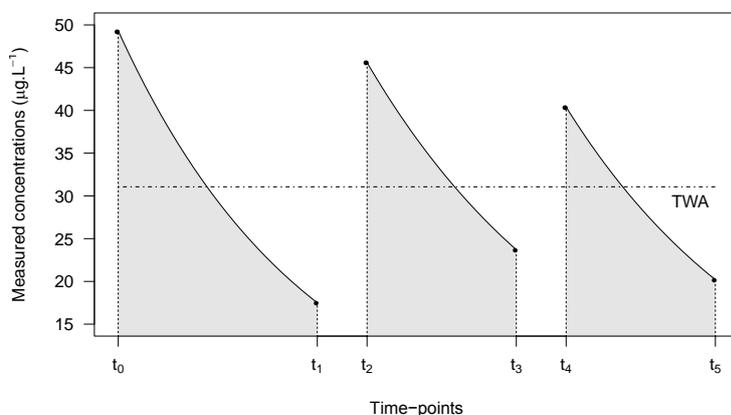
**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Giusti A, Barsi A, Dugué M, Collinet M, Thomé J-P, Joaquim-Justo C, Roig B, Lagadic L, Ducrot V. (2013). Reproductive impacts of tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) in the hermaphroditic freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32:1552–1560.

## ANNEXE 4

CALCUL D'UNE CONCENTRATION MOYENNE PONDÉRÉE DANS LE TEMPS

Comme la concentration du produit chimique d'essai peut diminuer au cours de l'intervalle de mesure ( $[t_i; t_{i+1}]$ , graphique 1) qui suit chaque renouvellement du milieu ( $t_0, t_2, t_4$ , graphique 1), il est nécessaire de déterminer la valeur qu'il convient de choisir pour représenter les concentrations auxquelles sont exposés les organismes. Pour ce faire, on tient compte de considérations aussi bien biologiques que statistiques. Par exemple, si l'on pense que la reproduction dépend surtout des concentrations maximales observées, on choisira la concentration maximale comme valeur représentative. Au contraire, si l'on estime que c'est l'effet cumulé ou à plus long terme du produit chimique testé qui est primordial, il sera plus pertinent de choisir une concentration moyenne. Dans ce deuxième cas, la valeur appropriée est la concentration moyenne pondérée dans le temps (MPT), car elle tient compte de la variation de la concentration instantanée au cours du temps (lignes pleines, figure 1).



Légende : Measured concentrations ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )      Concentrations mesurées ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )  
 Time points      Temps  
 TWA MPT

**Figure 1.** Exemple de représentation graphique de la concentration moyenne pondérée dans le temps (MPT). Les points correspondent aux concentrations mesurées dans les trois intervalles ayant suivi un renouvellement du milieu ( $[t_0; t_1]$ ,  $[t_2; t_3]$  et  $[t_4; t_5]$ ). Les lignes pleines correspondent à la décroissance exponentielle théorique de la concentration entre deux temps de mesure. La ligne horizontale en pointillés correspond à la concentration moyenne pondérée dans le temps (MPT) telle qu'on l'a calculée (voir texte pour de plus amples informations).

Le calcul de la concentration MPT repose principalement sur l'hypothèse que la baisse de la concentration entre deux temps de mesure ( $t_i$  et  $t_{i+1}$ ) suit une décroissance exponentielle :

$$C(t) = c_i e^{-k_i(t-t_i)} \text{ pour } t \in [t_i; t_{i+1}] \quad (\text{éq. 1})$$

où  $c_i = C(t_i)$  est la concentration mesurée au temps  $t_i$ .

Le paramètre  $k_i$  représente la puissance de décomposition du produit chimique entre  $t_i$  et  $t_{i+1}$  :

$$c_{i+1} = c_i e^{-k_i(t_{i+1}-t_i)} \Leftrightarrow k_i = \frac{\ln c_i - \ln c_{i+1}}{t_{i+1} - t_i} \quad (\text{éq. 2})$$

La moyenne pondérée dans le temps est calculée de telle sorte que l'aire située sous la droite qui la représente (ligne en pointillés) soit égale à l'aire située sous la courbe de la concentration (somme des zones en grisé, figure 1).

L'aire située sous la courbe de la concentration au cours d'une période  $[t_i ; t_{i+1}]$  est donnée par :

$$A_i = \int_{t_i}^{t_{i+1}} c_i e^{-k_i(\tau-t_i)} d\tau \Leftrightarrow A_i = \frac{c_i}{k_i} (1 - e^{-k_i(t_{i+1}-t_i)}) \quad (\text{éq. 3})$$

En remplaçant  $k_i$  par sa valeur (équation 2), on obtient :

$$A_i = \frac{(c_i - c_{i+1})(t_{i+1} - t_i)}{\ln c_i - \ln c_{i+1}} \quad (\text{éq. 4})$$

La concentration moyenne pondérée dans le temps a donc la forme suivante :

$$TWA = \frac{\sum_{i=1}^n A_i}{\sum_{i=1}^n (t_{i+1} - t_i)} \quad (\text{éq. 5})$$

où n est égal au nombre d'intervalles ayant suivi un renouvellement du milieu.

Le tableau 1 fournit des données empiriques illustrant le processus complet de calcul de la concentration MPT.

**Tableau 1.** Données empiriques (cellules en grisé) à partir desquelles on a calculé une concentration moyenne pondérée dans le temps. La période  $t_{i+1} - t_i$  (en jours) est l'intervalle écoulé entre deux mesures de la concentration ;  $c_i$  est la concentration mesurée au début  $t_i$  de la période (renouvellement du milieu) et  $c_{i+1}$  est la concentration mesurée à la fin  $t_{i+1}$  de la période ; ln est le logarithme népérien.  $A_i$  est l'aire située sous la courbe exponentielle décroissante comprise entre  $t_i$  et  $t_{i+1}$  (éq. 4).

Renouvellement n°	$t_{i+1} - t_i$ (jours)	$c_i$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$c_{i+1}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$\ln c_i$	$\ln c_{i+1}$	$A_i$
1	4	49.3	17.5	3.90	2.86	122.8
2	3	45.6	23.7	3.82	3.17	100.4
3	3	40.4	20.2	3.70	3.01	87.4
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>					<b>310.6</b>

Avec les données du tableau 1, on calcule une concentration MTP égale à 31.06  $\mu\text{g L}^{-1}$  (ligne en pointillés, figure 1).

Il est clair qu'avec des observations prises uniquement au début et à la fin de chaque période, on n'a pas la possibilité de confirmer que le processus de décomposition est effectivement exponentiel. Le choix d'une courbe théorique différente modifierait évidemment le calcul de  $A_i$  (1). Toutefois, le choix de l'exponentielle est plausible pour le processus de décomposition et probablement le meilleur en l'absence de toute autre information.

Il convient cependant de faire preuve de prudence si l'analyse chimique ne permet pas de détecter la présence du produit chimique testé à la fin de la période. Sauf si l'on peut estimer la vitesse de disparition du produit chimique testé dans la solution, on ne pourra pas alors obtenir une courbe réaliste, donc une aire réaliste sous la courbe. Dans ce cas, on ne pourra pas obtenir une valeur raisonnable de la moyenne pondérée dans le temps.

#### BIBLIOGRAPHIE

- (1) Belgers J.D.M., Aalderink G.H., Arts G.H.P., Brock T.C.M. (2011). Can time-weighted average concentrations be used to assess the risks of metsulfuron-methyl to *Myriophyllum spicatum* under different time-variable exposure regimes? *Chemosphere* 85, 1017-1025.

1  
2

**ANNEXE 5**

**EXEMPLE DE TABLEAU D'ENREGISTREMENT DES DONNÉES SUR LE RENOUVELLEMENT DU MILIEU, LES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET L'ALIMENTATION DES ANIMAUX**

Jour	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
Renouvellement du milieu (cocher la case)																													
pH*																													nouveau
																													ancien
O <sub>2</sub> [mgL <sup>-1</sup> ]*																													nouveau
																													ancien
Température [°C]*																													nouveau
																													ancien
Conductivité [µS cm <sup>-1</sup> ]																													nouveau
																													ancien
Alimentation (cocher la case)																													
Dureté de l'eau* [mg L <sup>-1</sup> , en CaCO <sub>3</sub> ]																													

3  
4

\* Indiquer le(s) type(s) de récipients utilisés

## ANNEXE 6

**EXEMPLE DE TABLEAU D'ENREGISTREMENT DES DONNÉES SUR LA REPRODUCTION ET LE TAUX DE SURVIE DE  
*LYMNAEA STAGNALIS***

Un bioessai de reproduction consiste généralement à exposer un groupe d'individus à une certaine concentration de produit chimique, et à comptabiliser le nombre de descendants et le nombre de parents survivants à chaque temps de mesure. On utilise aussi habituellement des réplicats afin d'évaluer la variabilité des effets mesurés. En définitive, on obtient deux mesures biologiques pour chaque triplet réplicat-dose-temps. Comme proposé avec la méthode MOSAIC\_repro (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/mosaic/reproduction/>), il est pratique de rassembler les données dans un fichier texte tabulaire (voir ci-après). Chaque ligne du tableau correspond à un temps auquel, pour un réplicat donné et une concentration donnée du produit chimique testé, on a comptabilisé le nombre de parents survivants (Nsurv) et le nombre de descendants (Nrepro).

Il est à noter que **l'ordre des colonnes doit être respecté** et que la première ligne du fichier doit contenir les en-têtes de colonne. Enfin, chaque colonne doit être séparée de la suivante par un unique caractère de tabulation.

Voici un exemple des premières lignes d'un fichier de données :

réplicat	conc	temps (en jours)	Nsurv	Nrepro
A	0	0	5	0
A	53	0	5	0
A	78	0	5	0
A	124	0	5	0
A	232	0	5	0
A	284	0	5	0
B	0	0	5	0
B	53	0	5	0
B	78	0	5	0
B	124	0	5	0
B	232	0	5	0
B	284	0	5	0
C	0	0	5	0
C	53	0	5	0
C	78	0	5	0
C	124	0	5	0
C	232	0	5	0
C	284	0	5	0
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
A	0	3	5	5
A	53	3	5	5
A	78	3	5	4
A	124	3	5	4
A	232	3	5	1
A	284	3	5	0
B	0	3	5	6
B	53	3	5	5
B	78	3	5	1
B	124	3	5	1
B	232	3	5	2
B	284	3	5	0
C	0	3	5	3
C	53	3	5	2
C	78	3	5	3
C	124	3	5	1
C	232	3	5	1
C	284	3	5	2
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

ANNEXE 7

**MÉTHODES D'ANALYSE STATISTIQUE DES DONNÉES DE REPRODUCTION DE *LYMNAEA STAGNALIS***

La présente annexe décrit des méthodes possibles d'analyse statistique des données obtenues au cours de l'essai de reproduction de *Lymnaea stagnalis*. Les données sont analysées à la fin de l'essai.

**PRINCIPE DE CALCUL DU NOMBRE D'INDIVIDUS-JOURS**

La mortalité enregistrée à la fin de l'essai de reproduction de *Lymnaea stagnalis* peut être non négligeable car les individus sont surveillés pendant une durée d'exposition prolongée. Néanmoins, il est possible que certains d'entre eux se soient reproduits avant de mourir, et donc qu'ils aient contribué au résultat de reproduction observé. Afin d'éviter tout biais dans l'analyse statistique, il convient par conséquent de tenir compte des informations concernant la reproduction des individus qui meurent pendant l'essai. Cet aspect est particulièrement critique aux fortes concentrations, car la mortalité peut alors être très élevée.

Au cours de l'essai de reproduction de *Lymnaea stagnalis*, on consigne régulièrement la survie à chaque fois que l'on compte les grappes d'œufs. Il est ainsi possible de calculer la période pendant laquelle chaque individu est en vie, autrement dit la période pendant laquelle il peut se reproduire. Comme on le fait couramment en épidémiologie pour calculer les taux d'incidence, on peut calculer, pour chaque réplicat, la somme totale des périodes d'observation de chaque individu avant sa mort. Quand un organisme vivant à l'instant  $t$  est comptabilisé comme mort à l'instant  $(t + 1)$ , on fait l'hypothèse qu'il est mort à l'instant  $((t + 1) + t)/2$ . La somme finale calculée pour un réplicat peut alors être exprimée en individus-jours. On évalue donc la reproduction au sein de chaque réplicat en nombre de grappes d'œufs par individu-jour.

**APPLICATION DU PRINCIPE D'AJUSTEMENT D'UN MODÈLE DE RÉGRESSION À DES DONNÉES DE REPRODUCTION POUR TENIR COMPTE SIMULTANÉMENT DE LA MORTALITÉ ET DE LA VARIABILITÉ INTER-RÉPLICAT**

Soient  $N_{ij}$  le nombre de grappes du réplicat  $j$  à la  $i^{\text{ème}}$  concentration  $u_i$ , et  $NIJ_{ij}$  le nombre d'individus-jours du réplicat  $j$  à la  $i^{\text{ème}}$  concentration  $u_i$ . En première approximation, si l'on néglige la variabilité inter-réplicats éventuelle,  $N_{ij}$  peut être décrit par une distribution de Poisson :

$$N_{ij} \sim \text{Poisson}(f(u_i; \theta) \times NIJ_{ij})$$

La fonction  $f(u; \theta)$  est la partie déterministe du modèle décrivant la tendance moyenne de la relation exposition-effet. MOSAIC\_repro propose d'utiliser le modèle log-logistique à trois paramètres :

$$f(u_i; \theta) = \frac{d}{1+(u/CE_{50})^b} \text{ avec } \theta = (CE_{50}, b, d)$$

où  $CE_{50}$  est la concentration qui induit un effet à mi-chemin entre la limite supérieure  $d$  et la ligne de base 0, et  $b$  représente la courbure (forme) de la courbe.

Selon la forme de la relation exposition-effet, d'autres parties déterministes seraient possibles : modèles logistiques à quatre ou cinq paramètres, modèle de Gompertz, modèles exponentiels à deux ou trois paramètres, modèle de Bruce-Versteeg ou modèle de Brain-Cousens (1).

Pour tenir compte explicitement de la variabilité inter-réplicats, on peut procéder à une extension du précédent modèle de Poisson avec une distribution gamma :

$$N_{ij} \sim \text{Poisson}(f_{ij} \times NIJ_{ij}) \text{ avec } f_{ij} \sim \text{gamma}\left(\frac{f(u_i; \theta)}{\omega}, \frac{1}{\omega}\right)$$

Une distribution gamma de paramètres  $\alpha$  et  $\beta$  a une moyenne  $\frac{\alpha}{\beta}$  et une variance  $\frac{\alpha}{\beta^2}$  : les paramètres

$f(u_i; \theta)$  et  $\omega f(u_i; \theta)$  sont donc respectivement la moyenne et la variance de la distribution gamma utilisée ici. On peut ainsi considérer le paramètre  $\omega$  comme un paramètre de surdispersion (plus il est grand, plus la variabilité inter-réplicats est grande).

Comme il est nécessaire d'avoir recours à des parties stochastiques non standard (modèle de Poisson ou gamma-Poisson), il peut être difficile d'estimer les paramètres à l'aide d'outils classiques d'inférence statistique fréquentielle. L'inférence bayésienne, connue pour sa flexibilité, peut constituer une autre solution pratique. À cet effet, MOSAIC\_repro propose d'utiliser conjointement les logiciels libres JAGS et R, de façon transparente, dans une interface web.

Appliquer la méthode d'inférence bayésienne exige de définir des lois *a priori* appropriées en s'appuyant sur une connaissance approfondie du processus de reproduction de *Lymnaea stagnalis* et du dispositif expérimental lui-même :

- $\log_{10}(CE_{50}) \sim N(\mu, \sigma)$  avec  $\mu$  et  $\sigma$  fonctions de  $u_{min}$  et  $u_{max}$ , les concentrations respectivement minimale (à l'exclusion de la concentration témoin) et maximale de l'essai :

$$\mu = \frac{\log_{10}(u_{min}) + \log_{10}(u_{max})}{2} \text{ et } \sigma = \frac{\log_{10}(u_{max}) - \log_{10}(u_{min})}{4}$$

ce qui revient à supposer une distribution normale centrée sur la moyenne de  $\log_{10}(u_{min})$  et  $\log_{10}(u_{max})$ , et une probabilité de 0.95 que  $\log_{10}(EC_{50})$  soit compris entre  $\log_{10}(u_{min})$  et  $\log_{10}(u_{max})$ .

- Comme  $d$  représente le taux de reproduction dans les groupes témoins, une distribution normale *a priori*  $N(\mu_d, \sigma_d)$  fondée sur les données elles-mêmes :

$$\mu_d = \frac{1}{r_0} \sum_j \frac{N_{0j}}{NID_{0j}}$$

$$\sigma_d = \sqrt{\frac{\sum_j \left( \frac{N_{0j}}{NID_{0j}} - \mu_d \right)^2}{r_0 (r_0 - 1)}}$$

où  $r_0$  est le nombre de réplicats témoins. On notera que les données relatives aux conditions témoin, puisqu'elles sont utilisées pour définir la distribution *a priori*, sont exclues du processus d'ajustement.

- $\log_{10}(b) \sim U(-2, 2)$ , loi *a priori* impropre non informative pour le paramètre de forme.
- $\log_{10}(rate) \sim U(-2, 2)$ , loi *a priori* impropre non informative pour le paramètre de dispersion de la distribution gamma-Poisson.

L'inférence bayésienne a pour avantage majeur de fournir une distribution *a posteriori* comme estimation de chaque paramètre. On peut aussi obtenir une distribution *a posteriori* pour toute  $CE_x$ , d'où l'on peut extraire une estimation ponctuelle et un intervalle de crédibilité de 95% pour chacun des quantiles à 2.5 %, 50 % et 97.5%.

MOSAIC\_repro fournit les résultats finaux sous les formes suivantes :

- données brutes représentées sur deux graphiques : données de survie et données cumulées de reproduction ; une synthèse du dispositif expérimental est également proposée pour vérifier que les données ont correctement été téléchargées ;
- courbe ajustée superposée aux données de reproduction, exprimée en nombre de grappes d'œufs par individu-jour ; l'intervalle de crédibilité de 95% est également disponible ;
- estimations des paramètres du modèle log-logistiques à trois paramètres de Poisson (ou gamma-Poisson), sous la forme de médianes avec intervalles de crédibilité de 95% ;

- valeurs médianes avec intervalles de crédibilité de 95% pour  $CE_x$  ( $x = 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80$ ).

Pour un certain jeu de données, la procédure appliquée dans MOSAIC\_repro ajuste les deux modèles (Poisson et gamma-Poisson) et utilise le critère d'information de déviance (CID) pour choisir le plus approprié. Dans les situations où la surdispersion (c'est-à-dire la variabilité inter-réplicats) est négligeable, l'utilisation du modèle de Poisson produit des estimations plus fiables. Il est donc préférable d'utiliser un modèle de Poisson, sauf quand le modèle gamma-Poisson produit un CID beaucoup plus faible (en pratique, il faut une différence de 10).

#### AUTRES ANALYSES POSSIBLES DES DONNÉES DE REPRODUCTION DE MOLLUSQUES

Comme on vient de l'expliquer, il est important d'ajuster l'analyse de la production d'œufs ou de grappes d'œufs en fonction de la mortalité des parents. Pour ce faire, l'une des méthodes valides consiste à supposer des distributions gamma pour décrire le nombre de jours indépendants de survie des parents dans chaque réplicat de chaque groupe de traitement, et à choisir une courbe exposition-effet spécifique, par exemple celle du modèle log-logistique à trois paramètres, pour la mesure de la reproduction moyenne (grappes ou œufs). Comme on l'a vu, d'autres courbes seront nécessaires pour certains jeux de données, en particulier lorsqu'un phénomène d'hormèse ( stimulation à faible concentration) est évident. À l'heure actuelle, MOSAIC\_repro ne propose pas d'autre courbe que celle du modèle log-logistique à trois paramètres, mais il est possible de programmer de telles courbes, par exemple avec SAS, ou d'envisager qu'elles seront ajoutées à MOSAIC à l'avenir.

Pour prendre en compte la mortalité des parents, une autre méthode consiste à analyser le rapport *reproduction*/NIJ calculé pour chaque réplicat, où *reproduction* est le nombre de grappes d'œufs ou le nombre d'œufs par réplicat. Les modèles applicables aux courbes exposition-effet obtenues peuvent alors être fondés sur des méthodes de régression basées sur la loi normale (2). Pendant la phase de validation, il a été observé que cette approche est bien en accord avec les résultats de MOSAIC\_repro, sauf quand le modèle MOSAIC n'est pas ou ne peut pas être ajusté, y compris, mais sans limitation, quand un phénomène d'hormèse est évident dans les données. La nécessité éventuelle d'ajuster d'autres courbes aux données impose d'utiliser certains des nombreux outils statistiques d'évaluation de la qualité d'ajustement et de la sélection du modèle. Cette autre façon de procéder est prévue dans des logiciels tels que ToxRat(<http://www.toxrat.com>), ou programmable dans SAS.

#### **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Ritz C. et Streibig J. (2005). Bioassay analysis using R. *Journal of Statistical Software* 12, 1–22.
- (2) OCDE (2006). *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application*. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement, Série sur les essais et les évaluations n° 54. OCDE, Paris.