

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

### **Essai de reproduction chez *Potamopyrgus antipodarum***

#### **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. La présente Ligne directrice a pour objet l'évaluation des effets potentiels d'une exposition prolongée aux produits chimiques sur la reproduction et la survie de lignées parthénogénétiques de l'escargot d'eau douce *Potamopyrgus antipodarum* (hydrobie des antipodes) originaire de Nouvelle Zélande. Il a classiquement pour habitat les eaux douces courantes de ruisseaux ou petites rivières, lacs ou estuaires, mais peut aussi survivre et se reproduire en eaux saumâtres de salinité ne dépassant pas 15 ‰. Dans leur aire de répartition d'origine, les populations ont un ratio mâles/femelles presque équilibré, avec une coexistence sympatrique de populations biparentales et parthénogénétiques. Dans d'autres parties du monde, les populations sont presque entièrement constituées d'escargots femelles à reproduction parthénogénétique. En Europe, les escargots mâles sont très rares et ne sont pas apparus dans une culture de laboratoire à long terme. Les embryons sortent par l'orifice femelle lorsque l'enveloppe de l'œuf se déchire. Ce mode de reproduction est désigné par le terme d'ovoviviparité (voir Annexe 2).

2. Les paramètres mesurés dans cet essai sont la mortalité et la reproduction, évaluée d'après le nombre total d'embryons dans la poche embryonnaire par femelle après 28 jours d'exposition, sans distinction des stades de développement.

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 *P. antipodarum*, d'après le nombre d'embryons présents dans la poche embryonnaire (sans distinction des stades de développement) à l'issue de 28 jours d'exposition. À cet

effet, on expose des femelles adultes à une gamme de concentrations du produit chimique testé. Le produit chimique testé est mélangé à de l'eau de dilution (eau reconstituée), ajouté aux béchers destinés à l'essai, puis des escargots adultes sont placés dans les béchers. Si l'essai porte sur des « produits chimiques difficiles » (c'est-à-dire volatiles, instables, facilement biodégradables ou adsorbants), il est possible de conduire l'essai en conditions dynamiques, en s'écartant de la conception semi-statique avec renouvellement du milieu à intervalles réguliers (voir le paragraphe 29). On étudie la survie de *P. antipodarum* au cours de la période d'exposition de 28 jours, et la reproduction à l'issue des 28 jours d'exposition au produit chimique testé.

5. L'effet toxique du produit chimique testé sur le nombre d'embryons est exprimé sous la forme d'une  $CE_x$ , établie en appliquant aux données un modèle d'ajustement adapté afin d'estimer la concentration qui produirait une réduction de x % du nombre d'embryons. Il est également possible d'exprimer l'effet toxique du produit testé par la concentration sans effet observé et la concentration minimale avec effet observé (CSEO/CMEO) (2). Les concentrations d'essai doivent encadrer la plus basse des concentrations efficaces utilisées ( $CE_{10}$ , par exemple) de telle sorte que cette valeur soit calculée par interpolation plutôt que par extrapolation.

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

6. 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 (3,4).

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

#### **SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE**

8. Il convient de tester périodiquement les substances de référence, afin de vérifier la cohérence et la sensibilité de l'essai compte tenu de l'organisme d'essai et des conditions expérimentales de la méthode d'essai. Les substances toxiques suivantes ont été utilisées avec succès dans les études internationales de validation : chlorure de cadmium, chlorure de tributylétain et prochloraze, pour des  $CE_{50}$  de 5 à 20 µg de Cd/L, 35 à 190 ng de TBT-Sn/L et 100 à 800 µg de prochloraze/L respectivement (concernant les effets sur la reproduction tels que le nombre d'embryons produits, voir la section "Reproduction" ci-dessous) (5).

#### **VALIDITÉ DE L'ESSAI**

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

- la mortalité moyenne (prenant en compte tous les réplicats) ne dépassent pas 20 % à la fin de l'essai ;
- le nombre moyen d'embryons chez les témoins est d'au moins 5 embryons par femelle à la fin de l'essai ;

- la teneur en oxygène dissous est d'au moins 60 % de la valeur de saturation en air (VSA) chez les témoins et les groupes traités tout au long de l'essai ;
- la température moyenne de l'eau est de  $16 \pm 1.5$  °C tout au long de l'essai, chez les témoins et les groupes exposés.

### DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

#### Appareillage

10. Les récipients d'essai et autres dispositifs qui seront en contact avec les solutions d'essai doivent être entièrement constitués de verre ou d'un autre matériau chimiquement inerte. Toute matière plastique utilisée pendant l'essai doit être telle que la migration de plastifiants ou d'autres composés chimiques soit exclue. Il faut en outre disposer des équipements suivants :

- béciers en verre de 500 mL 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 ;
- flacons volumétriques et autre verrerie de laboratoire pour la préparation des solutions ;
- pipettes en verre;
- oxymètre;
- pH-mètre;
- conductimètre;
- kits ou autre équipement de mesure de l'ammonium, des nitrites et des nitrates dans l'eau, carbone organique total et dureté de l'eau;
- stéréomicroscope équipé d'une source lumineuse;
- enceintes climatiques, ou local à température régulée, ou autre appareillage permettant le contrôle de la température et de l'éclairage;
- plateau et instruments de dissection.

#### Organisme d'essai

11. L'espèce à utiliser pour cet essai est *P. antipodarum* (Gray, 1853). Les escargots utilisés pour les exercices de validation appartenaient à l'haplotype *t* et au morphotype « Warwick A » et doivent être utilisés pour l'essai. Städler *et al.* (6) et Warwick (7) ont décrit des marqueurs anatomiques et génétiques différents entre l'haplotype *t* et le morphotype "Warwick A".

12. Les animaux soumis à l'essai doivent avoir été élevés en laboratoire et provenir d'un lot d'escargots femelles sains (c'est-à-dire ne présentant pas de signes de stress tels qu'une mortalité élevée, une fécondité médiocre, infestation par des parasites, etc.). Les escargots doivent être maintenus dans les mêmes conditions de culture (éclairage, température, milieu et alimentation) que lors de l'essai (les méthodes de culture de *P. antipodarum* sont décrites à l'annexe 2). Si les escargots proviennent d'un fournisseur extérieur, on prévoira une période d'acclimatation d'au moins deux semaines avant l'essai pour éviter que les animaux ne soient stressés. On n'utilisera pas d'organismes

prélevés en milieu naturel, dont les antécédents (en matière de contamination) ne sont pas connus.

### **Milieu d'essai**

13. On utilisera exclusivement de l'eau reconstituée (synthétique) comme milieu d'essai. L'eau reconstituée est préparée par dilution de 3 g de sel de mer Tropic Marin<sup>®</sup> (ou équivalent) et 1.8 g de carbonate acide de sodium (NaHCO<sub>3</sub>) pour 10 litres d'eau désionisée. Il est par ailleurs recommandé que le niveau de carbone organique total dans le milieu (c'est-à-dire avant l'ajout de nourriture) soit inférieur à 2 mg/L. Il convient de préparer l'eau reconstituée dans un récipient constitué de matériau inerte (c'est-à-dire en verre ou en acier inoxydable) de volume suffisant (aquarium de 50 litres, par exemple), où elle sera stockée en vue de son utilisation ultérieure, de préférence à température ambiante et dans l'obscurité. L'eau reconstituée doit être aérée pendant 24 heures au moins avant utilisation. La durée de stockage maximum est de deux semaines.

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

pH :	8.0 ± 0.5
Saturation en oxygène :	> 60% de la VSA (valeur de saturation en air)
Conductivité :	770 ± 100 µS/cm
Carbone organique total	<2 mg/L

15. Les récipients d'essai doivent contenir 400 mL d'eau reconstituée et doivent être couverts (par un couvercle perforé ou une gaze laissant passer l'air). Les béciers en verre doivent être remplacés une fois par semaine. Des volumes plus importants sont parfois nécessaires pour répondre aux exigences des méthodes d'analyse utilisées pour le dosage du produit chimique testé, bien qu'il soit également admis de regrouper les réplicats pour l'analyse chimique.

### **Solutions d'essai**

16. 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 testé dans de l'eau reconstituée, par des moyens mécaniques de type agitation, brassage ou ultrasons, ou par d'autres méthodes appropriées. On évitera si possible l'usage de solvants ou de dispersants. Si le produit chimique testé se dissout difficilement dans l'eau, on consultera le document d'orientation de l'OCDE sur les substances difficiles (8). 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 µl L<sup>-1</sup> (= 0.002%). 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.

17. Le choix d'un solvant approprié dépendra des propriétés physico-chimiques du produit chimique testé et de la sensibilité des organismes d'essai vis-à-vis du solvant choisi, tels que déterminés lors d'un essai préliminaire. Seuls des solvants ou dispersants dont il est établi qu'ils n'ont pas d'effets significatifs sur la reproduction de *P. antipodarum* peuvent être utilisés lors de l'essai. Concernant le choix du solvant, l'utilisateur se référera au Document Guide de l'OCDE sur la toxicité aquatiques des substances difficiles (8). Lors des études de validation, le diméthylsulfoxyde (DMSO), le triéthylène glycol (TEG), l'acétone et l'acide acétique glacial ont été utilisés comme solvants. Le DMSO, le TEG

et l'acétone sont caractérisés par une faible toxicité ( $CSEO \geq 12.5$  mg/L qui représente 625 fois la concentration maximale de solvant permis pour cet essai, soit  $20 \mu\text{g/L}$ ) pour *P. antipodarum*, et ne crée pas de développement de biofilm dans les récipients de l'essai (5). En revanche, l'utilisation d'éthanol comme solvant peut se traduire par un développement considérable de champignons et bactéries, même à des concentrations n'excédant pas 0.003 %.

## **PROCÉDURE**

### **Conditions d'exposition**

#### **Durée**

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

### Chargement

19. Il convient de vérifier la capacité de reproduction des escargots utilisés pour les essais. Pour cela, on déterminera la longueur de la coquille et le nombre d'embryons chez 20 escargots issus du lot de culture sélectionné avant le début de l'essai (cf. annexe 3, figure 1A). La longueur de la coquille se situe entre 3.5 et 4.5 mm. Le nombre moyen d'embryons par escargot destiné à être utilisé pour l'essai se situe entre 5 et 20, ce qui correspond aux limites inférieure et supérieure du nombre moyen d'embryons dans des cultures de laboratoire au long terme chez *P. antipodarum* (cf. annexe 2). Par ailleurs le coefficient de variation du nombre moyen d'embryons ne doit pas excéder 40%.

20. À l'aide de pinces, on répartit les escargots adultes dans les récipients de façon aléatoire, à raison de six animaux par récipient d'essai contenant le milieu d'exposition. La répartition des animaux dans les récipients d'essai et toutes les manipulations ultérieures sur les récipients doivent être réalisées de façon aléatoire, par exemple au moyen d'un plan expérimental par blocks randomisés, afin de réduire les biais dus au positionnement dans le plan expérimental. Tout manquement à cette règle peut être à l'origine de biais pouvant être interprétés comme un effet de la concentration. En cas de manipulations des unités expérimentales par ordre de traitement ou de concentration, en particulier, un effet lié au temps, tel que la fatigue du manipulateur ou un autre type d'erreur, peut conduire à une majoration des effets aux concentrations les plus élevées.

### Alimentation

21. On nourrira les escargots de préférence une fois par jour, mais au moins trois fois par semaine, de flocons de TetraPhyll<sup>®</sup> finement broyé ou d'un aliment équivalent contenant les mêmes nutriments (60 à 80 µg par animal et par jour). Toute différence dans les sources ou les quantités d'aliments administrés doit être signalée et justifiée. Pour l'administration de la nourriture, il convient de préparer une suspension homogénéisée avec de l'eau désionisée ou distillée. On introduit la quantité de suspension appropriée au moyen d'une pipette dans chaque récipient d'essai, après avoir agité la suspension de façon continue pour éviter la sédimentation de particules de nourriture. Le volume de suspension administré à chaque récipient d'essai doit être aussi faible que possible pour éviter une dilution de la concentration d'essai. La suspension doit être préparée immédiatement avant administration.

### Régime d'éclairage

22. La photopériode est de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité pendant toute la durée de l'essai. L'intensité lumineuse doit être dans la gamme de 500± 100 lx à la surface du milieu d'essai. Si l'essai porte sur des produits chimiques instables à la lumière, on aura recours à des intensités lumineuses plus faibles. La source de lumière doit être positionnée au-dessus des récipients d'essai. Les récipients d'essai doivent être placés sur une surface sombre. Les escargots ont un comportement phototactique négatif; les surfaces claires réfléchissant la lumière peuvent donc induire un comportement d'évitement. Les escargots risquent de sortir de l'eau et de s'échapper des récipients d'essai. Tout écart par rapport au régime d'éclairage doit être signalé et justifié.

### Température

23. La température du milieu d'essai doit être de  $16 \pm 1.5$  °C pendant toute la durée de l'essai.

### **Aération**

24. L'eau doit être aérée au moyen de pipettes en verre (pipettes Pasteur) raccordées à un système de circulation d'air. Des valves réglables doivent permettre d'assurer un débit d'air continu et constant. Si l'essai porte sur des produits chimiques volatils, il peut être envisagé de ne pas aérer les récipients d'essai. Dans le cas de produits chimiques extrêmement volatils, l'essai se fera dans des récipients fermés remplis jusqu'au bord (sans aucun espace vide au-dessus du liquide) et suffisamment grands pour éviter que le niveau d'oxygène ne soit trop bas ou ne devienne un facteur limitant.

25. La teneur en oxygène dissous doit rester  $> 60$  % de la VSA, mais il convient d'aérer les récipients d'essai en douceur, pour ne pas provoquer l'évaporation des produits chimiques testés.

### **Conception de l'essai**

26. Il convient de tester au moins cinq concentrations, appliquées chacune à six réplicats de six escargots (36 escargots par 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 à des essais de détermination de la gamme de concentrations, par exemple, ou à d'autres sources comme les références croisées, etc.) aidera à choisir les concentrations d'essai appropriées. Les produits chimiques ne doivent pas être testés à des concentrations dépassant leur limite de solubilité dans le milieu d'essai. L'utilisation de 5 concentrations (ou plus) et de 6 réplicats est recommandée car c'est la meilleure configuration pour évaluer aussi bien les  $CE_x$  que la CSEO/CMEO. Les concentrations d'essai doivent encadrer la valeur attendue. Pour une  $CE_x$ , quel que soit  $x$ , cette valeur de concentration recherchée doit être idéalement encadrée par les concentrations d'essai.

### **Test limite**

27. Si aucun effet n'est observé à la concentration la plus élevée lors de l'essai de détermination de la gamme de concentrations (par exemple à 10 mg/L ou à une concentration égale à la limite de solubilité), 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, par exemple. On utilisera dix réplicats, contenant chacun six escargots, 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 sont observés, un essai complet sera nécessaire. L'utilisation de moins de dix réplicats devra être justifiée.

### **Témoins**

28. Des récipients témoins, ne contenant pas de produit chimique, doivent être inclus dans l'essai,

avec un nombre approprié de réplicats, six réplicats pour le témoin eau de dilution et, s'il y a lieu, six réplicats pour le témoin solvant contenant uniquement le véhicule solvant. Dans le cas d'un essai limite, le nombre de réplicats témoins sera porté à dix (voir le paragraphe 27).

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

29. La fréquence de renouvellement du milieu dépendra de la stabilité du produit chimique testé, mais ne devrait pas être inférieure à trois fois par semaine. Les béchers en verre sont remplacés une fois par semaine. Si, d'après les tests de stabilité préliminaires ou les propriétés physicochimiques du produit chimique testé, on estime que les concentrations d'essai ne sont pas stables (c'est-à-dire qu'elles ne restent pas dans les limites de 80 - 120 % de la concentration nominale ou peuvent descendre en dessous de 80 % de la concentration initiale mesurée, sur l'intervalle de temps maximal entre deux renouvellements, à savoir trois jours), il faut envisager un renouvellement plus fréquent du milieu. Une autre solution consiste à conduire l'essai en conditions dynamiques, pour les « produits chimiques difficiles » (c'est-à-dire volatils, instables, facilement biodégradables ou adsorbants). Le protocole d'essai a été validé en conditions semi-statiques. Il est possible d'opter pour des conditions dynamiques, mais cela peut nécessiter d'ajuster la conception de l'essai, et une justification doit être fournie.

30. La procédure de renouvellement du milieu d'essai est la suivante. On retire délicatement l'intégralité du milieu d'exposition des récipients d'essai. Il est possible d'utiliser un tamis pour recueillir les escargots qui pourraient se détacher des parois de verre. Les escargots ainsi recueillis doivent être immédiatement replacés dans les récipients d'essai. Les récipients sont remplis à nouveau d'eau de dilution reconstituée à la température d'essai. Le produit chimique testé est immédiatement ajouté à l'eau propre, à partir de solutions mères, par exemple. Le milieu fraîchement additionné de produit chimique testé est homogénéisé par agitation manuelle. Les escargots sont alors replacés dans le récipient d'essai. La nourriture est distribuée selon les quantités indiquées (voir le paragraphe 21), une fois l'eau renouvelée dans les récipients exposés et témoins.

### **Observations**

31. On observe les animaux d'essai au moins trois fois par semaine, de préférence lors du renouvellement du milieu et de la distribution consécutive de nourriture, pour évaluer visuellement tout comportement anormal (par exemple évitement du milieu ou de la nourriture, léthargie chez les escargots immobiles entièrement rétractés dans leur coquille ou détachés du récipient avec le pied sorti de la coquille) indiquant que les animaux sont stressés. Ces divers signes de stress doivent être consignés. Si des escargots se trouvent dans le couvercle ou hors du milieu (chez les témoins ou les animaux exposés), il convient de les replacer immédiatement dans le milieu.

### **Mortalité**

32. Un animal est considéré comme mort s'il est immobile, c'est-à-dire s'il ne manifeste aucune réaction lorsqu'on effleure avec des pinces le pied ou l'opercule (dans le cas d'un escargot rétracté dans sa coquille). Les escargots morts sont retirés des récipients d'essai ; leur nombre est consigné de préférence une fois par jour, ou au minimum à chaque renouvellement du milieu d'essai.



### **Reproduction**

33. Le nombre d'embryons dans la poche embryonnaire est analysé pour tous les escargots survivants à l'issue du test. Il est donc préférable de procéder à la congélation rapide des escargots (dans l'azote liquide ou dans un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ ), puis de les conserver à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse. À la seule condition qu'un examen histopathologique soit envisagé, il est également possible de placer les escargots sous narcose pendant 45 à 90 minutes dans une solution d'eau désionisée ou distillée à 2.5 % de chlorure de magnésium hexahydraté ( $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ), avant dissection.

34. La longueur de la coquille des escargots (de la pointe de la coquille au bord inférieur de l'ouverture, voir l'annexe 3, figure 1A) doit être mesurée au stéréomicroscope équipé d'un micromètre oculaire ; ce paramètre complémentaire est intéressant, car il existe une corrélation positive entre la longueur de la coquille et la fécondité des femelles chez *Potamopyrgus* (1).

35. On casse avec précaution la coquille des escargots au moyen de pinces. Les escargots sont ensuite placés sur un plateau de dissection contenant un petit volume de milieu d'essai ou d'eau du robinet. On peut préparer la partie molle de l'escargot en retirant la coquille à l'aide d'aiguilles de dissection ou de pinces à bouts pointus. Une fois la coquille retirée, les embryons de *P. antipodarum* sont bien visibles à travers l'épithélium (voir l'annexe 3, figures 1B, 2). On ouvre avec précaution la poche embryonnaire des escargots, en utilisant une aiguille à disséquer. Les embryons (avec ou sans coquille) sont retirés et comptés pour déterminer le succès reproducteur de chaque femelle (voir l'annexe 3, figure 1C).

36. Si des escargots n'ont pas produit d'embryons, il convient de déterminer leur sexe. Les mâles se caractérisent par un pénis au niveau du cou (à la base de la cavité palléale, derrière le museau et les deux tentacules oculaires). L'influence de la présence de mâles sur les résultats de l'essai de reproduction n'est pas connue, car il n'y a pas d'escargots mâles dans les cultures de laboratoire de l'haplotype *t* (1). Si des mâles apparaissent au cours d'un essai, ils ne doivent pas être pris en compte dans l'analyse de la fécondité.

37. Les données sont consignées sur une feuille de données appropriée (voir l'exemple de l'annexe 5). On calcule la moyenne et les paramètres de variabilité tels que l'écart type ou l'erreur type de la moyenne, pour la longueur des coquilles et le nombre d'embryons.

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

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

38. Au cours de l'essai, le dosage du produit chimique testé est effectué à intervalles réguliers. Les méthodes analytiques requises doivent être établies, avec une limite de quantification (LDQ) appropriée et des données suffisantes sur la stabilité du produit chimique testé dans le système d'essai.

39. Dans les essais semi-statiques, au cours desquels on s'attend à ce que la concentration du produit chimique testé ne s'écarte pas de plus de 20 % de la valeur nominale (soit entre 80 et 120 %, voir le paragraphe 29), il est recommandé de déterminer au minimum la concentration d'essai la plus

élevée et la concentration d'essai la plus basse dans la solution d'essai fraîchement préparée et dans la solution usagée avant le renouvellement. Ces analyses doivent porter sur des prélèvements de la même solution d'essai – avant et après renouvellement. Ces dosages seront ensuite répétés au minimum à intervalles d'une semaine.

40. 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, avant et après renouvellement. Cependant, lorsque la concentration initiale mesurée ne se situe pas dans un intervalle de  $\pm 20\%$  autour de la concentration nominale du produit chimique testé mais que les données fournies montrent que les concentrations initiales sont répétables et stables (c'est-à-dire comprises entre 80 et 120 % des concentrations initiales), il est possible de limiter aux concentrations d'essai maximale et minimale les dosages du produit chimique lors des semaines 2, 3 et 4 de l'essai. Dans tous les cas, il n'y a lieu de procéder au dosage du produit chimique testé que sur un seul réplicat pour chaque concentration d'essai, en changeant chaque fois de réplicat.

41. Si l'on procède à un essai en conditions dynamiques, on appliquera un régime de prélèvements similaire à celui décrit pour les essais semi-statiques (mais les mesures sur les milieux « usagés » ne s'appliquent pas dans ce cas). Cependant, une augmentation de la fréquence des prélèvements au cours de la première semaine (avec par exemple un minimum de deux séries de mesures) peut aider à démontrer que les concentrations d'essai restent stables. Il est également possible de procéder à ces contrôles avant le début de l'essai proprement dit. Dans ce type d'essai, il convient de contrôler quotidiennement le débit de diluant et de produit chimique testé.

42. S'il est établi que la concentration de produit chimique testé a pu être maintenue dans un intervalle de  $\pm 20\%$  autour de la concentration nominale ou de la concentration initiale mesurée tout au long de l'essai, les résultats peuvent être basés soit sur les valeurs nominales soit sur les valeurs initiales mesurées. Si l'écart par rapport à la concentration nominale ou à la concentration initiale mesurée dépasse  $\pm 20\%$ , les résultats seront exprimés en concentration moyenne pondérée dans le temps (voir les consignes de calcul de l'annexe 4).

### **Paramètres physicochimiques**

43. Les paramètres de qualité de l'eau tels que le pH, la saturation en oxygène, la conductivité, la température et la teneur en ammonium et en nitrites totaux doivent être mesurés dans un réplicat par groupe exposé et témoin au minimum une fois par semaine dans les milieux frais et usagés. On procédera à des mesures complémentaires des nitrates et de la dureté de l'eau en cas de mortalité anormalement élevée chez les témoins ou dans un réplicat aux concentrations les plus basses.

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### **Traitement des résultats**

44. 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 d'embryons dans la poche embryonnaire (sans distinction des stades de développement) à l'issue d'une exposition de 28 jours sont notés sur une feuille de calcul, par exemple (voir l'exemple de l'annexe 5). Pour l'évaluation statistique des nombres d'embryons, on calcule pour chaque concentration le nombre moyen d'embryons sur tous les réplicats exposés à cette concentration. L'effet standard de l'essai est une diminution du nombre moyen d'embryons lorsque la concentration du produit chimique testé augmente. L'essai de reproduction a été validé exclusivement avec des produits chimiques provoquant une diminution du

nombre d'embryons. Une augmentation de la reproduction peut survenir lors de l'essai, et a été observée avec des produits chimiques tels que l'éthanol (4) et des produits connus pour leurs effets œstrogènes ou suspectés d'avoir de tels effets chez les vertébrés (9-12). Toutefois, l'essai de reproduction n'est pas adapté pour apporter la preuve d'un mode d'action à médiation endocrinienne, sur la seule base d'une diminution ou d'une augmentation du nombre d'embryons.

45. Avant de procéder à l'analyse statistique, en réalisant par exemple une analyse de la variance, une comparaison des traitements et des témoins par le test de Dunnett, le test de Williams ou le test descendant de Jonckheere-Terpstra (voir le paragraphe 49), il est recommandé d'examiner s'il y a lieu de transformer les données pour répondre aux exigences des tests pratiqués (2). Pour ce qui est des méthodes non paramétriques, on envisagera par exemple le test U de Bonferroni selon Holm ou le test de tendance de Jonckheere-Terpstra. On calculera les intervalles de confiance à 95 % pour les moyennes des différents traitements. Une autre possibilité consiste à utiliser un modèle linéaire généralisé mixte (GLMM) avec structure d'erreur de type poissonien ou binomial négatif, pour l'analyse statistique des nombres d'embryons, dans la mesure où il s'agit de données de dénombrement.

46. Le nombre d'escargots adultes survivants chez les témoins non traités est un critère de validité, et doit être documenté et indiqué dans le rapport. Tous les autres effets néfastes – comportement anormal décrit au paragraphe 31, notamment, ou apparence anormale des embryons (embryons complètement développés mais dénués de coquille, ou embryons dont la coquille est déformée, par exemple) – doivent également être signalés dans le rapport final.

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

47. Les valeurs CE<sub>x</sub>, ainsi que les limites inférieure et supérieure de leur intervalle de confiance à 95 %, sont calculées par des méthodes statistiques appropriées pour des données de dénombrement, telles qu'un modèle logistique avec structure d'erreur de type poissonien. Il faut noter que les méthodes de Weibull et de Spearman-Kärber sont conçues pour des réponses quantales (tout ou rien), comme la survie, pour un nombre fixe de sujets à risque. Elles ne conviennent donc pas pour la reproduction, car le nombre d'embryons varie considérablement d'un parent à un autre. Elles seront parfois acceptables pour analyser des dénombrements comme s'il s'agissait de réponses continues suivant une structure d'erreur normale, mais cela doit être évalué avec soin au cas par cas. Pour le calcul de la CE<sub>10</sub>, de la CE<sub>50</sub> ou de toute autre CE<sub>x</sub>, l'ensemble des données doit être soumis à une analyse de régression.

### **CSEO/CMEO**

48. 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 (2). En règle générale, les effets néfastes du produit chimique testé par rapport au témoin sont analysés par des tests d'hypothèse unilatéraux, pour  $p < 0.05$ . Le document cité, qui constitue une source très utile, ne couvre pas les modèles GLMM avec structure d'erreur non normale, car il s'agit d'un développement ultérieur à sa publication.

49. La normalité de la distribution et l'homogénéité de la variance font l'objet d'un test statistique

approprié tels que le test de Shapiro-Wilk et le test de Levene, respectivement ( $p < 0.05$ ). Si un modèle GLMM est utilisé, la surdispersion (variabilité extra-poissonnienne) doit être contrôlée, et la structure d'erreur de type poissonnien pourra être remplacée par une structure de type binomial négatif, par exemple. Une analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie de tests de comparaisons multiples peut être réalisée. On pourra pratiquer des tests de comparaisons multiples (test de Dunnett, par exemple) ou des tests de tendance descendants (comme le test de Williams ou le test descendant de Jonckheere-Terpstra) pour calculer s'il existe des différences significatives ( $p < 0.05$ ) entre les témoins et les différentes concentrations du produit chimique testé (en choisissant les tests recommandés dans le document cité plus haut (2)). Sinon, des méthodes non paramétriques (telles que le test U de Bonferroni selon Holm ou le test de tendance de Jonckheere-Terpstra) peuvent être appliquées pour déterminer la CSEO et la CMEO.

### Rapport d'essai

50. 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, UVCB (substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques) 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 ou dynamique, volume, charge en nombre d'escargots par litre) ;
- photopériode et intensité lumineuse ;
- conception de l'essai (notamment concentration d'essai utilisée, nombre de réplicats, nombre d'escargots par réplicat, etc.) ;
- méthode de traitement préliminaire du produit chimique testé et d'adjonction/application ;
- concentrations nominales d'essai, modalités de prélèvement en vue de l'analyse chimique et méthodes analytiques utilisées pour établir les concentrations du produit chimique testé ;
- caractéristiques du milieu d'essai (notamment pH, conductivité, température et oxygène en pourcentage de la VSA, concentrations d'ammonium et de nitrites, le carbone organique total et toutes autres données mesurées) ;
- données précises sur l'alimentation (notamment type d'aliments, provenance, quantités et fréquence d'administration).

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, les moyennes des valeurs mesurées et la limite de détection doivent également être indiqués ;
- qualité de l'eau dans les récipients d'essai (à savoir pH, température, oxygène en pourcentage de la VSA, concentration d'ammonium et de nitrites, cf exemple de feuille de calcul fourni à l'annexe 5) ;
- relevé complet des nombres d'embryons par réplicat à la fin de l'essai (voir l'exemple de feuilles de données de l'annexe 5) ;
- nombre de décès chez les escargots (voir l'exemple de feuille de données de l'annexe 5) ;
- s'il y a lieu, concentration minimale avec effet observé (CMEO) pour la reproduction (nombres d'embryons), 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 concentration sans effet observé (CSEO) pour la reproduction ; s'il y a lieu, indiquer également la CMEO et la CSEO pour la mortalité des escargots ;
- s'il y a lieu,  $CE_x$  pour la reproduction et intervalle de confiance (à 95 %, par exemple) avec graphe du modèle d'ajustement utilisé pour le calcul, et pente de la courbe concentration-réponse avec son intervalle de confiance ;
- autres effets biologiques observés ou mesurés : signaler tous les autres effets biologiques qui ont été observés ou mesurés (par exemple comportement anormal des escargots selon les indications du paragraphe 31, apparence anormale des embryons selon les indications du paragraphe 46, effets sur la croissance des escargots parents) avec justifications appropriées ;
- explication de tout écart par rapport à la Ligne directrice.

**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) OCDE (2010). Detailed review paper on molluscs life-cycle toxicity testing. Environmental Publications Hygiène et sécurité de l'environnement, Série sur les essais et les évaluations n° 121. OCDE, Paris. OCDE, Paris.
- (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.
- (3) OCDE (1992). Ligne directrice pour les essais de produits chimiques, essai n° 301 : Biodégradabilité facile. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (4) OCDE (2014). Guideline for the Testing of Chemicals, No. 310: Ready Biodegradability – CO<sub>2</sub> in sealed vessels (Headspace Test). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
- (5) OCDE (2016). Development and validation of guidelines for mollusc reproductive toxicity tests - Report on the validation of the *Potamopyrgus antipodarum* reproduction test. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement, Série sur les essais et les évaluations n° 235. OCDE, Paris
- (6) Städler, T., Frye, M., Neiman, M., Lively, C. M. (2005). Mitochondrial haplotypes and the New Zealand origin of clonal European *Potamopyrgus*, an invasive aquatic snail. *Molecular Ecology* 14 (8): 2465-2473.
- (7) Warwick, T. (1952). Strains in the mollusc *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith). *Nature* 169: 551–552.
- (8) 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.
- (9) Duft M., Schulte-Oehlmann U., Tillmann M., Markert B., Oehlmann J. (2003). Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 145-152.
- (10) Duft M., Schmitt C., Bachmann J., Brandelik C., Schulte-Oehlmann U., Oehlmann J. (2007). Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals - an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Ecotoxicology* 16, 169-182.
- (11) Jobling S., Casey D., Rodgers-Gray T., Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Pawlowski S., Braunbeck T., Turner AP., Tyler CR. (2004). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology* 66, 207-222.

- (12) Stange D., Oehlmann J. (2012). Identification of oestrogen-responsive transcripts in *Potamopyrgus antipodarum*. *Journal of Molluscan Studies* 78, 337-342.

ANNEXE 1DÉFINITIONS

Définitions utilisées dans la présente Ligne directrice :

CE<sub>x</sub> (concentration efficace à x %) : concentration du produit chimique testé en solution dans l'eau qui entraîne une diminution de x % de la reproduction chez *Potamopyrgus antipodarum* durant une période d'exposition déterminée.

Concentration minimale avec effet observé (CMEO) : concentration d'essai la plus faible à laquelle on observe que le produit chimique testé exerce un effet statistiquement significatif sur la reproduction et la mortalité (pour  $p < 0.05$ ), par comparaison avec le témoin, sur une période d'exposition déterminée. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO devraient avoir un effet nocif égal ou supérieur à celui observé à la CMEO. Si ces deux conditions ne sont pas réunies, il convient d'expliquer précisément comment la CMEO (et donc la CSEO) ont été établies.

Concentration sans effet observé (CSEO) : concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO qui, par comparaison avec un témoin, n'a pas d'effet statistiquement significatif ( $p < 0.05$ ), durant une période d'exposition déterminée.

Limite de détection : concentration la plus faible pouvant être détectée, mais non quantifiée.

Limite de quantification : concentration la plus faible pouvant faire l'objet d'une mesure quantitative.

Mortalité : un animal est noté comme mort lorsqu'il est immobile, autrement dit lorsqu'il ne manifeste aucune réaction quand on effleure son pied ou son opercule (dans le cas des escargots rétractés dans leur coquille) avec une pince.



ANNEXE 2RECOMMANDATIONS POUR LA CULTURE DE *POTAMOPYRGUS ANTIPODARUM*INTRODUCTION

1. Le présent mode opératoire normalisé décrit les modalités d'élevage en laboratoire de *Potamopyrgus antipodarum*. L'objectif est d'obtenir des résultats reproductibles lors de toute expérimentation conduite dans les conditions décrites. Il importe donc que les escargots soient maintenus dans des conditions normalisées. Le taux de mortalité doit être bas (inférieur ou égal à 20 %) et le nombre moyen d'embryons par escargot doit se situer entre 5 et 20. Pour cela, il convient de fournir une alimentation adaptée et de ne pas dépasser une certaine densité de population (cf. paragraphe 11, annexe 2).

ORGANISME D'ESSAITaxonomie

2. *P. antipodarum* (Gray, 1853), l'hydrobie des antipodes, appartient au phylum Mollusca, classe Gastropoda, ordre Neotaenioglossa, famille Hydrobiidae.

Écologie

3. *P. antipodarum* est originaire de Nouvelle-Zélande mais a été introduit dans d'autres parties du monde. Il a classiquement pour habitat les eaux courantes des ruisseaux ou petites rivières, lacs ou estuaires, où sa reproduction est souvent très intensive (1 – 4). La longueur moyenne de la coquille chez l'adulte est de 3.5 – 4.5 mm. *P. antipodarum* est principalement dulcicole, mais peut aussi survivre et se reproduire en eaux saumâtres de salinité ne dépassant pas 15‰ (5). L'hydrobie a une préférence pour les sédiments mous des eaux stagnantes ou à faible courant ainsi que des zones estuariennes de territoires côtiers. L'espèce se nourrit de débris, algues et bactéries, qu'elle broute de sa langue râpeuse à la surface des plantes, roches ou sédiments.

Biologie

4. Dans leur aire de répartition d'origine, les populations ont un ratio mâles/femelles presque équilibré, avec une coexistence sympatrique de populations biparentales et parthénogénétiques. Dans d'autres parties du monde, les populations sont presque entièrement constituées d'escargots femelles à reproduction parthénogénétique. Un seul escargot suffit alors à l'établissement de toute une population. En Europe, les escargots mâles sont rares (6, 7) et ne sont jamais apparus dans une culture de laboratoire à long terme. Les escargots utilisés pour les exercices de validation appartenaient à l'haplotype *t* et au morphotype « Warwick A », selon Städler *et al.* (8).

5. La reproduction a lieu toute l'année. *P. antipodarum* pratique un mode de couvain particulier. Les œufs se développent dans la partie antérieure de la section palléale de l'oviducte, transformée en poche embryonnaire. Les embryons les plus âgés se trouvent dans la partie antérieure,

les plus jeunes dans la partie postérieure de la poche embryonnaire. Les embryons sortent par l'orifice femelle lorsque l'enveloppe de l'œuf se déchire. Ce mode de reproduction est désigné par le terme d'ovoviviparité (2).

### ÉQUIPEMENT, TEMPÉRATURE ET RÉGIME D'ÉCLAIRAGE

#### Température et régime d'éclairage

6. La culture de *P. antipodarum* exige une température de l'eau de  $16 \pm 1.5$  °C et une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité. L'intensité lumineuse doit être comprise entre  $500 \pm 100$  lx.

#### Aquariums et accessoires

7. Il faut disposer des équipements suivants :

- Aquariums de culture (de 15 litres, par exemple, en verre)
- Réservoir de stockage de volume approprié pour l'eau reconstituée (aquarium en verre de 50 litres, par exemple)
- Pompes à air
- Flexibles à air (revêtus de téflon)
- Pipettes en verre
- Électrodes de mesure de la conductivité, de l'oxygène et du pH
- Kits de mesure de l'ammonium, des nitrites et des nitrates dans l'eau
- Stéréomicroscope
- Source de lumière froide
- Plateau et instruments de dissection

#### Produits chimiques, nourriture et produits de conditionnement de l'eau

8. On utilisera les composés et produits suivants :

- Bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ )
- Source de calcium (os de seiche, par exemple, ou carbonate de calcium)
- Chlorure de magnésium hexahydraté ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) si un narcotique est requis en vue d'examen histopathologiques (voir le paragraphe 16)
- Sel de mer Tropic Marin<sup>®</sup> ((Dr. Biener GmbH, Wartenberg, Allemagne) ou équivalent)
- TetraPhyll<sup>®</sup> (Tetra GmbH, Melle, Allemagne) ou aliment équivalent contenant les mêmes nutriments

### MODE OPÉRATOIRE

#### Milieu de culture : eau reconstituée

9. Les escargots sont cultivés dans de l'eau reconstituée préparée par dilution de 3 g de sel de mer Tropic Marin<sup>®</sup> et 1.8 g de bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) pour 10 litres d'eau désionisée. L'eau reconstituée est préparée dans un aquarium de 50 litres, par exemple, où elle est stockée pendant deux

semaines au maximum en vue de son utilisation ultérieure. L'eau reconstituée doit être aérée pendant 24 heures au moins avant utilisation.

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

pH :	8.0 ± 0.5
Saturation en oxygène :	> 60 % de la VSA (valeur de saturation en air)
Conductivité :	770 ± 100 µS/cm

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

### **Densité de population**

11. La densité de population ne doit pas dépasser 100 escargots par litre.

### **Nourriture et alimentation**

12. Les escargots sont nourris *ad libitum* de flocons TetraPhyll® finement broyés ou d'un aliment équivalent contenant les mêmes nutriments, de préférence une fois par jour, mais au moins trois fois par semaine. Les flocons sont broyés soit dans un mortier en porcelaine avec pistil, soit dans un moulin à café avec broyeur en acier inoxydable.

### **Nettoyage et entretien**

13. Une fois par semaine, on mesure la température, le pH, la saturation en oxygène, la conductivité et la concentration d'ammonium et de nitrites de tous les aquariums de l'élevage. On mesurera également la concentration de nitrates si nécessaire.

14. Une fois par semaine, un renouvellement partiel de l'eau de culture est nécessaire. Il a été établi que le remplacement hebdomadaire de 50 % au moins de l'eau était approprié. Lors du renouvellement d'eau, on retire du récipient de culture les résidus de nourriture et détrit. On veillera à ne pas retirer des aquariums les escargots juvéniles.

15. Avant de renouveler l'eau des aquariums de culture, on mesurera la température, le pH, la saturation en oxygène et la conductivité de l'eau dans l'aquarium de stockage. Après un renouvellement partiel de l'eau, il convient d'ajouter une source de calcium (os de seiche, par exemple) dans chaque aquarium. Lors de la mesure des paramètres dans les aquariums de l'élevage, il importe de nettoyer avec soin les électrodes avant de passer d'un aquarium au suivant, afin d'empêcher un transfert éventuel de maladies ou de pathogènes.

### **Relevé mensuel des nombres d'embryons**

16. Chaque mois, on procède à un relevé de la reproduction chez 20 escargots adultes (> 3.5 mm), ainsi qu'à la mesure de la longueur de la coquille. Mode opératoire :

- Les escargots sont soumis à une congélation rapide (dans l'azote liquide ou dans un congélateur à -80 °C) et conservés à -20 °C jusqu'à l'analyse. À la seule condition un examen histopathologique soit envisagé, il est également possible de placer les escargots sous narcose

pendant au moins 45 minutes et au maximum 90 minutes dans une solution d'eau désionisée ou distillée à 2.5 % de chlorure de magnésium déshydraté ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ).

- La longueur de la coquille des escargots est mesurée au stéréomicroscope équipé d'un micromètre oculaire. Les données sont consignées sur une feuille de calcul.
- On casse avec précaution la coquille des escargots au moyen de pinces. Les escargots sont placés sur un plateau de dissection contenant un petit volume d'eau de culture.
- On expose la partie molle de l'escargot en retirant la coquille à l'aide d'aiguilles de dissection ou de pinces à bouts pointus (voir l'annexe 3, figure 1).
- On ouvre la poche embryonnaire des escargots en utilisant une aiguille à disséquer, et tous les embryons sont retirés de la poche.
- Il faut alors compter tous les embryons. Les données sont consignées sur une feuille de calcul. On calcule la moyenne et les paramètres de variabilité tels que l'écart type ou l'erreur type de la moyenne, pour la longueur de la coquille et le nombre d'embryons.

#### **DÉVELOPPEMENT D'ALGUES, MALADIES ET MORTALITÉ**

17. En cas de développement important d'algues sur la coquille des escargots, il convient de retirer les algues si possible manuellement. S'il n'est pas possible de réduire la croissance des algues de cette façon, les escargots touchés seront retirés de l'élevage, et les aquariums seront nettoyés avec soin.

18. Si l'on trouve des escargots morts dans un aquarium, il convient de les retirer dès que leur décès est constaté. Si un aquarium présente une mortalité élevée ( $> 20\%$ ), les escargots de cet aquarium doivent être observés pendant plusieurs jours. Si la mortalité reste élevée, tous les escargots seront retirés de l'élevage, et l'aquarium et tous ses équipements seront nettoyés et désinfectés avec soin.

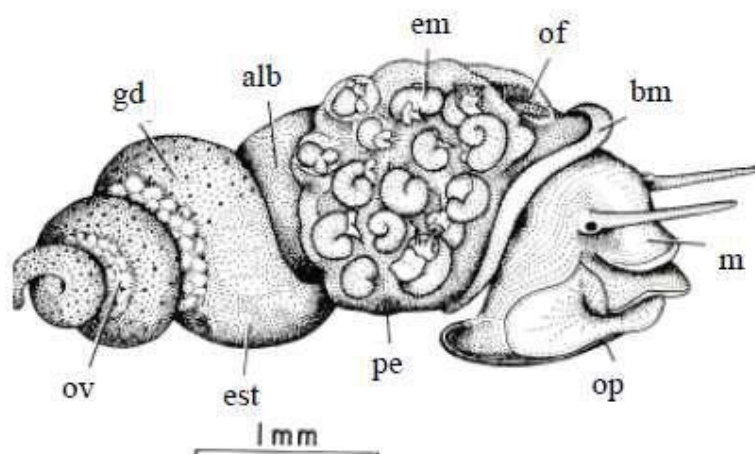
**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Roth, G. (1987). Contribution to the distribution and biology of *Potamopyrgus jenkinsi* (E.A. SMITH, 1889) in the Rhine river catchment area (Prosobranchia: Hydrobiidae). *Archiv für Hydrobiologie Supplement* 79 (1), 49-68 [en allemand].
- (2) Fretter, V., Graham, A. (1994). *British prosobranch molluscs. Their functional anatomy and ecology*. Ray Society, Londres.
- (3) Kinzelbach, R. (1995). Neozoans in European waters – exemplifying the worldwide process of invasion and species mixing. *Experientia* 51 (5), 526-538.
- (4) Cope, N.J., Winterbourn, M.J. (2004). Competitive interactions between two successful molluscan invaders of freshwater: An experimental study. *Aquatic Ecology* 38, 83-91.
- (5) Jacobsen, R., Forbes, V.E. (1997). Clonal variation in life-history traits and feeding rates in the gastropod, *Potamopyrgus antipodarum*: Performance across a salinity gradient. *Functional Ecology* 11, 260-267.
- (6) Wallace, C. (1979). Notes on the occurrence of males in populations of *Potamopyrgus jenkinsi*. *Journal of Molluscan Studies* 45, 383-392.
- (7) Ponder, W.F. (1988). *Potamopyrgus antipodarum* – a molluscan coloniser of Europe and Australia. *Journal of Molluscan Studies* 54, 271-285.
- (8) Städler, T., Frye, M., Neiman, M., Lively, C. M. (2005). Mitochondrial haplotypes and the New Zealand origin of clonal European *Potamopyrgus*, an invasive aquatic snail. *Molecular Ecology* 14 (8): 2465-2473.

## ANNEXE 3

PHOTOGRAPHIES ET SCHÉMAS DE *POTAMOPYRGUS ANTIPODARUM*

**Figure 1 :** *Potamopyrgus antipodarum* avec coquille (A) ou coquille partiellement retirée et poche embryonnaire découverte (partie blanche) (B) et embryons extraits de la poche embryonnaire (embryons avec coquille à droite et sans coquille à gauche) (C).



**Figure 2 :** *Potamopyrgus antipodarum*, partie molle de l'animal après retrait de la coquille (modifié, d'après 2) ; alb = glande à albumen, pe = poche embryonnaire, gd = glande digestive, em = embryons, of = orifice femelle (vagin), bm = bord du manteau, op = opercule, ov = ovaire, m = museau, est = estomac.

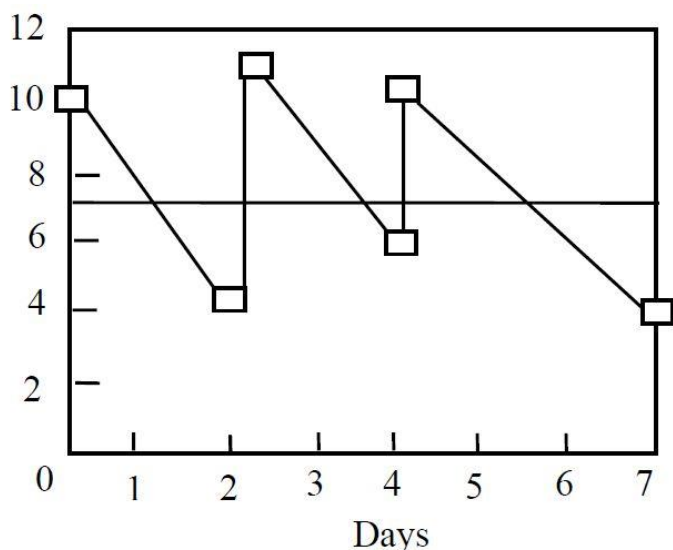
On trouvera une photographie d'un spécimen mâle de *Potamopyrgus antipodarum* à la figure 5 d'un document consultable à l'adresse [http://el.erdc.usace.army.mil/ansrp/potamopyrgus\\_antipodarum.pdf](http://el.erdc.usace.army.mil/ansrp/potamopyrgus_antipodarum.pdf).

ANNEXE 4

**Calcul d'une moyenne pondérée dans le temps**

Moyenne pondérée dans le temps

Comme la concentration du produit chimique d'essai peut diminuer au cours de la période comprise entre deux renouvellements du milieu, il est nécessaire de déterminer la valeur qu'il convient de choisir pour représenter toute la gamme des concentrations. 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, car elle tient compte de la variation de la concentration instantanée au cours du temps.



Légende graphique : Days = Jours

**Figure 1 :** Exemple de moyenne pondérée dans le temps.

La figure 1 montre un exemple d'essai (simplifié) d'une durée de sept jours, avec renouvellement du milieu les jours 0, 2 et 4.

- La courbe (ici, une ligne brisée) représente la concentration en fonction du temps. La baisse de concentration est supposée suivre un processus de décomposition de forme exponentielle.
- Les 6 points représentent les concentrations observées telles qu'on les a mesurées au début et à la fin de chaque période comprise entre deux renouvellements.
- La ligne horizontale pleine est la moyenne pondérée dans le temps.

La moyenne pondérée dans le temps est calculée de telle sorte que l'aire située sous la droite qui la représente soit égale à l'aire située sous la courbe de la concentration. Le calcul correspondant à l'exemple ci-dessus est détaillé dans le tableau 1.

Renouvellement n°	Jours	Conc 0	Conc 1	ln(Conc 0)	ln(Conc 1)	Aire	
1	2	10.000	4.493	2.303	1.503	13.767	
2	2	11.000	6.037	2.398	1.798	16.544	
3	3	10.000	4.066	2.303	1.403	19.781	
Nombre total de jours :					7	Aire totale :	50.092
						MPT:	7.156

*Jours* est le nombre de jours de la période écoulée jusqu'au renouvellement.

*Conc 0* est la concentration mesurée au début de cette période.

*Conc 1* est la concentration mesurée à la fin de cette période.

$\ln(\text{Conc } 0)$  est le logarithme népérien de *Conc 0*.

$\ln(\text{Conc } 1)$  est le logarithme népérien de *Conc 1*.

*Aire* est l'aire située sous la courbe exponentielle correspondant à chaque période écoulée entre deux renouvellements. On la calcule à l'aide de la formule suivante:

$$\text{Aire} = \frac{\text{Conc } 0 - \text{Conc } 1}{\ln(\text{Conc } 0) - \ln(\text{Conc } 1)} \times \text{Jours}$$

La moyenne pondérée dans le temps (*MPT*) est l'*Aire totale* divisée par le *Nombre total de jours*. Bien sûr, dans le cas de l'essai de reproduction de *P. antipodarum*, il conviendrait de prolonger le tableau pour qu'il couvre 28 jours.

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 fonction différente modifierait évidemment le calcul de l'*Aire*. 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 plus 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.



**ANNEXE 5**

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

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> [mg/L]*																													nouveau
																													ancien
Température [°C]*																													nouveau
																													ancien
Conductivité [µS/cm]																													nouveau
																													ancien
Alimentation (cocher la case)																													nouveau

**DES ANIMAUX**

Expérience n°                      Jour de début :                      Produit chimique d'essai :                      Concentration nominale :

**EXEMPLE DE TABLEAU D'ENREGISTREMENT DES DONNÉES SUR LA REPRODUCTION ET LA MORTALITÉ DE POTAMOPYRGUS**

Expérience n°                      Jour de début :                      Produit chimique testé :                      Concentration nominale :

	Réplicat 1		Réplicat 2		Réplicat 3		Réplicat 4		Réplicat 5		Réplicat 6	
	Longueur coquille	Embryons	Longueur coquille	Embryons	Longueur coquille	Embryons	Longueur coquille	Embryons	Longueur coquille	Embryons	Longueur coquille	Embryons
1												
2												
3												
3												
4												
5												
6												
Moyenne												
Nombre d'adultes morts												

\* Indiquer dans quel récipient l'expérience a été conduite.