

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

Essai de reproduction d'un acarien prédateur (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) dans le sol

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice est conçue pour évaluer les effets de substances chimiques contenues dans le sol sur le taux de reproduction d'une espèce d'acarien du sol *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari : Laelapidae), et permet donc d'estimer l'inhibition de la vitesse de croissance spécifique d'une population (1,2). Le taux de reproduction désigne ici le nombre de juvéniles à la fin de la période d'essai. *H. aculeifer* ajoute un niveau trophique aux espèces déjà représentées dans les Lignes directrices. Un essai de reproduction sans discrimination ni quantification des différentes étapes du cycle de la reproduction est jugé approprié aux desseins de cette Ligne directrice pour les essais. Pour les substances dont le mode d'exposition n'implique pas le sol, d'autres approches devraient mieux convenir (3).

2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* est considéré comme dûment représentatif de la faune du sol, et des acariens prédateurs en particulier. Il est répandu dans le monde entier (5) et sa récolte et son élevage au laboratoire sont aisés. L'Annexe 7 propose un résumé de la biologie de *H. aculeifer*. Des informations de référence sur l'écologie des espèces d'acariens et sur leur utilisation dans les essais d'écotoxicité apparaissent dans (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Des adultes femelles sont exposées à une série de concentrations du produit chimique testé mélangé au sol. Au début de l'essai, 10 femelles adultes sont placées dans chaque récipient expérimental. Les mâles ne sont pas inclus dans l'essai, car l'expérience montre que les femelles s'accouplent dès l'éclosion du stade deutonymphe ou peu après dès lors que des mâles sont présents. De surcroît, l'inclusion de mâles exigerait une discrimination laborieuse des stades de développement, avec pour effet de prolonger l'essai. Par conséquent, l'accouplement lui-même reste hors de l'essai. Les femelles sont introduites dans l'essai 28 à 35 jours après le début de la période de ponte dans le processus de synchronisation (voir Annexe 4), car on peut alors considérer que les femelles se sont déjà accouplées et ont dépassé le stade de la préoviposition. À 20 °C, l'essai s'achève le 14e jour après l'introduction des femelles (jour 0), durée qui permet aux premiers descendants dans les témoins d'atteindre le stade de la deutonymphe (voir Annexe 4). Le nombre de juvéniles par récipient expérimental ainsi que le nombre de femelles survivantes sont déterminés pour calculer la principale variable mesurée. Le taux de reproduction des mites exposées au

produit chimique testé est comparé à celui des témoins, afin de déterminer la CEx (par exemple CE10, CE50) ou la concentration sans effet observé (CSEO) (voir Annexe 1 pour les définitions), selon le modèle expérimental choisi (voir paragraphe 29). Une description générale du calendrier de l'essai est proposée dans l'Annexe 8.

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE TESTÉ

4. Il est préférable de connaître l'hydrosolubilité, le $\log K_{oe}$, le coefficient de partage entre l'eau et le sol et la pression de vapeur du produit chimique testé. Des informations complémentaires sur le devenir du produit chimique testé dans le sol, notamment sa vitesse de dégradation biotique et abiotique, sont souhaitables.

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

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

VALIDITÉ DE L'ESSAI

6. Un résultat de l'essai sera considéré comme valide si les témoins non traités répondent aux critères suivants :

- La mortalité moyenne des femelles adultes ne dépasse pas 20 % à la fin de l'essai ;
- Le nombre moyen de juvéniles par expérience (10 femelles adultes introduites) est égal à au moins 50 à la fin de l'essai ;
- Le coefficient de variation calculé pour le nombre d'acariens juvéniles par expérience n'excède pas 30 % à l'achèvement de l'essai final.

SUBSTANCE DE REFERENCE

7. Le calcul de la CEx et/ou de la CSEO d'une substance de référence garantit l'adéquation des conditions expérimentales du laboratoire et contrôle la régularité de la réaction des organismes d'expérience au cours du temps. Le diméthoate (CAS 60-51-5) est une substance de référence reconnue dont l'effet sur la taille de la population est démontré (4). L'acide borique (CAS 10043-35-3) peut également servir de substance de référence, mais il a été toutefois moins étudié. On peut choisir l'un des deux modèles expérimentaux suivants :

- On peut parallèlement tester la substance de référence et déterminer la toxicité de chaque produit chimique testé à une concentration préalablement identifiée dans une étude dose-réponse pour provoquer une réduction > 50% de la descendance. Dans ce cas, le nombre d'expériences identiques sera le même que celui des témoins (voir paragraphe 29).

- On peut aussi tester la substance de référence 1 à 2 fois par an dans un essai dose-réponse. Selon le modèle choisi, les nombres de concentrations et d'expériences identiques et le facteur d'espacement différent (voir paragraphe 29), mais il faut obtenir une réponse égale à 10 à 90 % de l'effet (facteur d'espacement de 1.8). La CE50 du diméthoate calculée d'après le nombre de juvéniles doit être comprise entre 3.0 et 7.0 s.e./kg de sol (ps). D'après les résultats obtenus à ce jour avec l'acide borique, la CE50 basée sur le nombre de juvéniles doit être comprise dans l'intervalle de 100 à 500 mg/kg de ps de sol.

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Récipients expérimentaux et matériel

8. Il convient d'utiliser des récipients expérimentaux en verre ou en un autre matériau chimiquement inerte de 3 à 5 cm de diamètre (hauteur de sol ≥ 1.5 cm) munis d'un couvercle étroitement ajusté. Il est préférable d'employer des bouchons à vis et dans ce cas, il faut aérer les récipients deux fois par semaine. Il est également possible d'utiliser des couvercles qui permettent un échange gazeux direct entre le substrat et l'atmosphère (par exemple, une gaze). Le taux d'humidité doit rester suffisamment élevé pendant l'essai, et il est donc essentiel de vérifier le poids de chaque récipient expérimental durant l'essai et de rajouter de l'eau si nécessaire. Ce contrôle présente une importance particulière lorsque l'on ne dispose pas de bouchons à vis. Si les récipients expérimentaux sont opaques, le matériau du couvercle doit permettre le passage de la lumière (par exemple un couvercle transparent perforé), et empêcher néanmoins les acariens de s'échapper. La taille et le type du récipient expérimental dépendent de la méthode d'extraction (voir Annexe 5 pour plus de détails). Lorsque l'on procède à une extraction à la chaleur directement sur le récipient expérimental, il convient alors d'ajouter au fond un treillis aux mailles de dimensions appropriées (qui restera scellé jusqu'à l'extraction), et d'utiliser une épaisseur de sol suffisante pour l'établissement d'un gradient de température et d'humidité.

9. Cet essai requiert du matériel de laboratoire standard, en particulier les articles suivants :
- récipients, de préférence en verre avec des bouchons à vis;
 - armoire à séchage;
 - stéréomicroscope;
 - pinceaux pour le transfert des acariens;
 - pH-mètre et luxmètre;
 - balances suffisamment exactes;
 - instruments permettant de contrôler la température;
 - instruments permettant de contrôler l'humidité de l'air (facultatifs si les récipients expérimentaux sont fermés par des couvercles);
 - incubateur ou petite chambre à température contrôlée;
 - matériel pour l'extraction (voir Annexe 5) (13);
 - panneau lumineux suspendu avec réglage de la lumière;
 - bocal de récolte pour les acariens extraits.

Préparation du sol artificiel

10. Pour cet essai, on utilise un sol artificiel. Il comprend les composants suivants (toutes les valeurs sont proportionnelles à la masse sèche) :

- 5 % de tourbe à sphaigne, séchée à l'air et finement broyée (une dimension des particules de 2 +/- 1 mm est acceptable) ;
- 20 % d'argile kaolinique (teneur en kaolinite de préférence supérieure à 30 %) ;
- environ 74 % de sable industriel séché à l'air (selon la quantité de CaCO_3 nécessaire), essentiellement du sable fin contenant plus de 50 % de particules mesurant entre 50 et 200 microns. La quantité exacte de sable dépend de la quantité de CaCO_3 (voir ci-dessous), la proportion combinée des deux composants devant atteindre 75 %.
- < 1.0% de carbonate de calcium (CaCO_3 , pulvérisé, qualité analytique) afin d'obtenir un pH de 6.0 ± 0.5 ; la quantité de carbonate de calcium à ajouter dépend principalement de la qualité et de la nature de la tourbe (voir Note 1).

Note 1 : La quantité de CaCO_3 requise dépendra des composants du substrat de sol et doit être déterminée par mesure du pH sur des échantillons prélevés dans le sol immédiatement avant l'essai (14)

Note 2 : La proportion de tourbe dans le sol artificiel diffère de celle recommandée dans les autres Lignes directrices de l'OCDE sur les organismes du sol, dans lesquelles on utilise dans la plupart des cas 10 % de tourbe (par exemple 15). Toutefois, selon l'OEPP (16), un sol agricole type ne contient pas plus de 5 % de matières organiques et la réduction de la proportion de tourbe vise à représenter les capacités réduites de sorption par un sol naturel du produit chimique testé sur le carbone organique.

Note 3 : Si besoin est, par exemple à des fins d'essai spécifiques, des sols naturels provenant de sites non pollués peuvent également servir de substrat d'essai et/ou de culture. Toutefois, lorsque l'on utilise un sol naturel, il faut le caractériser au moins par son origine (site de récolte), son pH, sa texture (distribution de tailles de particules) et sa teneur en matières organiques. Le cas échéant, le type et le nom du sol seront mentionnés conformément à la classification des sols, et le sol doit être exempt de toute contamination. Dans le cas où le produit chimique testé est un métal ou un composé organométallique, il conviendra également de déterminer la capacité d'échange de cations (CEC) du sol naturel. On s'efforcera tout particulièrement de satisfaire les critères de validité, car les informations de référence sur les sols naturels sont habituellement rares.

11. Les constituants secs du sol sont soigneusement mélangés (par exemple, dans un grand mélangeur de laboratoire). Le pH est déterminé avec un mélange de sol et d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M ou de chlorure de calcium (CaCl_2) 0.01 M dans un rapport 1/5 (voir (14) et Annexe 3). Si l'acidité du sol est supérieure à la limite requise (voir paragraphe 10), elle peut être ajustée par addition d'une quantité appropriée de CaCO_3 . Si le sol est trop alcalin, le pH peut être abaissé par l'addition d'un supplément du mélange comprenant les trois premiers composants décrits au paragraphe 10, à l'exclusion du CaCO_3 .

12. La capacité de rétention d'eau (CRE) maximale du sol artificiel est déterminée conformément aux protocoles décrits dans l'Annexe 2. Deux à sept jours avant le début de l'essai, le sol artificiel sec est préhumidifié par addition d'une quantité suffisante d'eau distillée ou désionisée pour atteindre environ la moitié de la teneur en eau finale, c'est-à-dire 40 à 60 % de la CRE maximale. Le taux d'humidité est ajusté à 40-60 % de la capacité de rétention d'eau maximale par addition du produit chimique testé et/ou addition d'eau distillée ou désionisée (voir paragraphes 16-18). Il est possible d'estimer approximativement le taux d'humidité du sol en pressant doucement une poignée de sol dans la main : si le taux d'humidité est correct, de petites gouttes d'eau apparaissent entre les doigts.

13. La teneur en humidité du sol est déterminée au début et à la fin de l'essai par séchage à 105 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant, conformément à la norme ISO 11465 (17) et à un pH du sol conforme à l'Annexe 3 ou à la norme ISO 10390 (14). Ces mesures doivent être réalisées dans des échantillons supplémentaires sans acarien, sur le sol témoin et sur des sols contenant chaque concentration d'essai. Il ne faut pas ajuster le pH du sol lorsque l'on teste des substances acides ou basiques. Il convient de vérifier la teneur en humidité pendant tout l'essai par pesée périodique des récipients (voir paragraphes 20 et 24).

Sélection et préparation des animaux expérimentaux

14. L'espèce utilisée dans l'essai est *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Des acariens adultes femelles, prélevés dans une cohorte synchronisée, sont nécessaires au début de l'essai. Les acariens sont introduits environ 7 à 14 jours après le passage au stade adulte, 28 à 35 jours après le début de la ponte dans le processus de synchronisation (voir paragraphe 3 et Annexe 4). La source des acariens ou leur fournisseur et le maintien de la culture au laboratoire doivent être enregistrés. Lorsqu'une culture est maintenue au laboratoire, il est recommandé de confirmer l'identité des espèces au moins une fois par an. L'Annexe 6 comprend une fiche d'identification.

Préparation des concentrations expérimentales

15. Le produit chimique testé est mélangée dans le sol. Il convient de choisir les solvants organiques utilisés pour faciliter le traitement du sol par le produit chimique testé sur des critères de faible toxicité pour les acariens, et un témoin de solvant approprié doit être inclus dans l'essai (voir paragraphe 29).

Produit chimique testé hydrosoluble

16. Une solution du produit chimique testé dans de l'eau désionisée est préparée en une quantité suffisante pour toutes les expériences identiques d'une concentration expérimentale. Il est recommandé d'utiliser la quantité d'eau nécessaire pour obtenir le taux d'humidité requis, à savoir 40 à 60% de la capacité maximale de rétention d'eau (voir paragraphe 12). Chaque solution de produit chimique testé est mélangée complètement avec un lot du sol préhumidifié, avant d'être introduite dans le récipient expérimental.

Produit chimique testé insoluble dans l'eau

17. Les substances non solubles dans l'eau mais solubles dans des solvants organiques peuvent être dissoutes dans le plus petit volume possible d'un véhicule approprié (par exemple de l'acétone). Seuls des solvants volatils peuvent être utilisés. Dans le cas où ces véhicules sont utilisés, toutes les concentrations expérimentales et les témoins contiennent la même quantité minimale du véhicule. Le véhicule est pulvérisé sur ou mélangé à une petite quantité, 10 g par exemple, de sable quartzique fin. Il convient de corriger la quantité de sable contenu dans le substrat pour tenir compte de cette quantité. Ensuite, le véhicule est éliminé par évaporation sous une hotte durant au moins une heure. Ce mélange de sable quartzique et du produit chimique testé est ajouté au sol préhumidifié, auquel il est soigneusement mélangé après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est introduit dans les récipients expérimentaux. Il convient de noter que certains solvants peuvent être toxiques pour les acariens. Par conséquent, il est recommandé d'utiliser un témoin d'eau supplémentaire sans véhicule lorsque cette toxicité est inconnue. La démonstration fiable d'absence d'effet du solvant (aux concentrations appliquées) permet d'omettre le témoin d'eau.

Substance d'essai peu soluble dans l'eau et les solvants organiques

18. Pour les substances peu solubles dans l'eau et les solvants organiques, on mélange l'équivalent de 2,5 g de sable quartzique finement broyé par récipient expérimental (par exemple, 10 g de sable quartzique fin pour quatre expériences identiques) à la quantité nécessaire du produit chimique testé pour obtenir la concentration expérimentale voulue. Il convient de corriger la quantité de sable contenu dans le substrat pour tenir compte de cette quantité. Ce mélange de sable quartzique et du produit chimique testé est ajouté au sol préhumidifié, auquel il est soigneusement mélangé après l'ajout de la quantité nécessaire d'eau désionisée pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est réparti entre les récipients expérimentaux. On répète la procédure pour chaque concentration expérimentale et on prépare un témoin approprié.

MODE OPERATOIRE**Groupes traités et témoins**

19. Il est recommandé d'utiliser dix adultes femelles dans 20 g de masse sèche de sol artificiel dans chaque récipient témoin et traité. Les organismes expérimentaux doivent être ajoutés dans les deux heures qui suivent la préparation du substrat d'essai final (c'est-à-dire après l'application de la substance d'essai). Dans certains cas particuliers (par exemple, lorsque le vieillissement est considéré comme un facteur déterminant), la durée écoulée entre la préparation du substrat d'essai final et l'addition des acariens peut être prolongée (pour des détails sur ce vieillissement, voir (18)). Il convient toutefois de fournir une justification scientifique de cette décision.

20. Une fois les acariens ajoutés au sol, ils sont nourris, et le poids initial de chaque récipient expérimental doit être mesuré pour servir de référence lors du contrôle du taux d'humidité du sol tout au long de l'essai, comme il est décrit au paragraphe 24. Les récipients expérimentaux sont ensuite couverts comme il est décrit au paragraphe 8 et placés dans la chambre expérimentale.

21. Des témoins appropriés à la méthode d'application du produit chimique testé, présentée dans l'un des paragraphes 15 à 18, sont préparés. La préparation des témoins se conforme aux protocoles décrits, sans addition du produit chimique testé. Ainsi, le cas échéant, des solvants organiques, du sable quartzique ou d'autres véhicules sont utilisés dans les témoins en concentrations/quantités équivalentes à celles des traitements. Lorsqu'un solvant ou un autre véhicule est employé pour ajouter le produit chimique testé, il faut également préparer un témoin supplémentaire sans véhicule ni produit chimique testé et le tester chaque fois que la toxicité du solvant est inconnue (voir paragraphe 17).

Conditions expérimentales

22. La température expérimentale doit être de 20 ± 2 °C. Elle doit être enregistrée au moins quotidiennement et ajustée, s'il y a lieu. L'essai est mené dans des conditions de cycles de lumière et d'obscurité contrôlés (de préférence 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité) avec un éclairage de 400 à 800 lux dans la zone des récipients expérimentaux. A des fins de comparaisons, ces conditions sont identiques à celles appliquées dans d'autres essais écotoxicologiques dans le sol (par exemple, 15).

23. Les échanges gazeux doivent être assurés par aération des récipients expérimentaux au moins deux fois par semaine lorsque l'on utilise des bouchons à vis. Dans le cas d'une ouverture couverte de gaze, il convient de veiller particulièrement au maintien du taux d'humidité du sol (voir paragraphes 8 et 24).

24. La teneur en eau du substrat de sol dans les récipients expérimentaux est maintenue pendant toute la durée de l'essai en pesant les récipients expérimentaux, et s'il y a lieu, en y rajoutant périodiquement de l'eau (par exemple une fois par semaine). Les pertes doivent être compensées selon les besoins par de l'eau désionisée. Le taux d'humidité pendant l'essai ne doit pas s'écarter de plus de 10 % de la valeur initiale.

Alimentation

25. On a montré que les acariens du fromage (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)) constituaient une source d'aliment appropriée. De petits collemboles (par exemple *Folsomia candida* juvénile Willem, 1902 ou *Onychiurus fimatius* (19, 20), des enchytrées (par exemple *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) ou des nématodes (par exemple *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)) peuvent également convenir (21). Il est recommandé de contrôler les aliments avant de les utiliser dans un essai. Le type et la quantité d'aliments doivent assurer l'obtention d'un nombre de juvéniles suffisant pour remplir les critères de validité (paragraphe 6). Lors du choix des proies, il convient de considérer le mode d'action de la substance d'essai (par exemple, un acaricide peut se révéler toxique aussi pour les acariens qui servent d'aliments, voir paragraphe 26).

26. Les aliments doivent être fournis *ad libitum* (mais en petite quantité à chaque fois (pointe de spatule)). A cette fin, on peut également utiliser un aspirateur à succion douce comme il est proposé dans l'essai sur les collemboles, ou un pinceau fin. Il suffira généralement de distribuer les aliments au début de l'essai et deux à trois fois par semaine. Si le produit chimique testé se révèle toxique pour la proie, il faudra envisager d'augmenter la fréquence d'alimentation et/ou d'employer une autre source d'aliments.

Sélection des concentrations expérimentales

27. Des informations préalables sur la toxicité du produit chimique testé, issues par exemple d'études préliminaires de sélection des concentrations, devraient faciliter la sélection des concentrations expérimentales appropriées. Si besoin est, une étude préliminaire est menée, avec cinq concentrations du produit chimique testé dans la gamme de 0.1 – 1000 mg/kg de sol sec, avec au moins une expérience par traitement et un témoin. L'étude préliminaire dure 14 jours, à l'issue desquels la mortalité des acariens adultes et le nombre de juvéniles sont déterminés. Il est préférable de choisir dans l'essai final une gamme de concentrations qui inclut des concentrations affectant les nombres de juvéniles mais non la survie de la génération maternelle. Cette démarche est toutefois exclue pour les produits chimiques testés qui provoquent des effets létaux et sub-létaux à des concentrations pratiquement similaires. La concentration efficace (par exemple CE50, CE25, CE10) et la gamme de concentrations sur lequel l'effet du produit chimique testé présente un intérêt doivent être contenues dans l'intervalle des concentrations de l'essai. L'extrapolation à des valeurs très inférieures à la concentration la plus basse qui affecte les organismes expérimentaux ou supérieures à la concentration la plus élevée de l'essai doit rester exceptionnelle, et justifiée en détail dans le rapport.

Modèle expérimental

Essais dose-réponse

28. Trois modèles d'essai, fondés sur les recommandations issues d'un autre essai tournant (essai de reproduction chez l'enchytrée (22)) sont proposés. L'adéquation générale de ces trois modèles a été confirmée par les résultats de la validation sur *H. aculeifer*.

29. Lors de l'établissement de la gamme de concentrations, il convient de tenir compte des points suivants:
- Pour déterminer la CEx (par exemple CE10, CE50), il faut tester douze concentrations. Il est recommandé d'inclure au moins deux expériences identiques à chaque concentration d'essai et six témoins. Le facteur d'espacement peut varier, mais doit être inférieur ou égal à 1.8 dans la gamme efficace anticipée et supérieur à 1.8 aux concentrations plus élevées et plus faibles.
 - Pour déterminer la CSEO, il faut tester au moins cinq concentrations formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques par concentration expérimentale et huit témoins. Les concentrations doivent être espacées d'un facteur d'au plus 2.0.
 - Une approche combinée permet de déterminer à la fois la CSEO et la CEx. Il faut alors utiliser huit concentrations expérimentales formant une série géométrique. Il est recommandé d'inclure quatre expériences identiques par traitement et huit témoins. Les concentrations doivent être espacées d'un facteur d'au plus 1.8.

Essai limite

30. Si la concentration la plus élevée (par exemple 1000 mg/kg) dans l'essai préliminaire de sélection des concentrations n'engendre aucun effet, l'essai de reproduction final peut être mené sous forme d'un essai limite, à la concentration expérimentale de 1000 mg/kg ps de sol. Un essai limite permet de démontrer que la CSEO ou la CE10 pour la reproduction est supérieure à la concentration limite, en employant un nombre minimal d'acariens dans l'essai. Il faut alors utiliser huit expériences identiques pour le sol traité et pour le témoin.

Durée de l'essai et mesures

31. Toutes les différences observées de comportement et de morphologie des acariens entre les récipients témoins et les récipients traités doivent être notées.

32. Le 14^e jour, les acariens survivants sont séparés du sol par extraction à la chaleur ou à la lumière ou par une autre méthode appropriée (voir Annexe 5). Les juvéniles (c'est-à-dire larves, protonymphes et deutonymphes) et les adultes sont comptés séparément. Tous les acariens adultes qui ne sont pas récupérés à ce stade doivent être comptabilisés comme morts, car on suppose qu'ils sont décédés et se sont décomposés avant l'évaluation. A la fin du test, les adultes et les juvéniles sont euthanasiés humainement, préférablement par congélation rapide à -80°C ou par cryopréservation. Il faut valider l'efficacité d'extraction une ou deux fois par an sur des témoins contenant des nombres connus d'adultes et de juvéniles. L'efficacité doit être supérieure à 90% en moyenne combinée pour tous les stades de développement (voir Annexe 5). Les nombres des adultes et des juvéniles se seront pas ajustés en fonction de l'efficacité.

RESULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

33. Les paragraphes 36 à 41 contiennent des informations sur les méthodes statistiques susceptibles d'être utilisées pour analyser les résultats de l'essai. Il faut également consulter le Document 54 de l'OCDE intitulé "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application".

34. Le résultat principal de l'essai est le taux de reproduction, c'est-à-dire le nombre de juvéniles produits par récipient expérimental (dans lequel 10 femelles adultes ont été introduites). L'analyse

statistique requiert le calcul de la moyenne arithmétique (X) et de la variance (s^2) du taux de reproduction par traitement et par témoin. X et s^2 sont employés dans des analyses de variance telles que le test t de Student, le test de Dunnett ou le test de William, et pour calculer des intervalles de confiance à 95 %.

Note : Ce résultat principal équivaut à la mesure de fécondité représentée par le nombre de juvéniles vivants produits pendant l'essai divisé par le nombre de parents femelles introduits au début de l'essai.

35. Le nombre de femelles survivantes dans les témoins non traités est un critère de validité essentiel qui doit être détaillé. Comme dans l'essai préliminaire de sélection des concentrations, tous les autres signes de nocivité doivent également être consignés dans le rapport final.

CEx

36. On calcule les valeurs de CEx et leurs limites de confiance à 95 % supérieures et inférieures correspondant au paramètre décrit dans le paragraphe 34 en utilisant des méthodes statistiques adéquates (par exemple, analyse probit, fonction logistique ou de Weibull, méthode simplifiée de Spearman-Kärber, ou simple interpolation). Une CEx est obtenue en intégrant une valeur correspondant à x % de la moyenne du témoin dans l'équation retenue. Pour calculer la CE50 ou tout autre CEx, il faut soumettre les moyennes par traitement (X) à une analyse de régression.

CSEO/CMEO

37. Lorsqu'une analyse statistique est appliquée pour déterminer la CSEO/CMEO, il faut disposer de statistiques par récipient (chaque récipient individuel est considéré comme une expérience). Il convient alors d'utiliser des méthodes statistiques adéquates (conformément au Document 54 de l'OCDE intitulé *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*). En général, les effets indésirables du produit chimique testé par rapport au témoin sont examinés en utilisant une hypothèse unilatérale (inférieure) avec une analyse à $p \leq 0.05$. Les paragraphes suivants en comprennent des exemples.

38. La distribution normale des données peut être analysée, par exemple, par le test d'ajustement de Kolmogorov-Smirnov, le test du rapport rang à écart-type (test R/s) ou le test de Shapiro-Wilk (bilatéral, $p \leq 0.05$). On peut utiliser le test de Cochran, le test de Levene ou le test de Bartlett (bilatéral, $p \leq 0.05$) pour tester l'homogénéité de la variance. Lorsque les pré-requis des procédures de tests paramétriques sont satisfaits (normalité, homogénéité de la variance), on peut appliquer une analyse de variance une voie, puis des tests multicomparatifs. Les tests de comparaison multiples (par exemple, tests t de Dunnett) ou les tests de tendance décroissante (par exemple, test de Williams dans le cas d'une relation réponse à la dose monotone) peuvent être utilisés pour calculer, le cas échéant, des différences significatives ($p \leq 0.05$) entre les témoins et les diverses concentrations de la substance d'essai (on choisira le test recommandé conformément au Document 54 de l'OCDE intitulé *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*). On peut toutefois utiliser des méthodes non paramétriques (test U de Bonferroni conformément à Holm ou test de tendance de Jonckheere-Terpstra) pour déterminer la CSEO et la CMEO.

Essai limite

39. Si un essai limite a été mis en œuvre (comparaison du témoin et d'un seul traitement) et que les conditions requises pour les procédures de tests paramétriques (normalité, homogénéité) sont remplies, on peut évaluer les réponses métriques par le test de Student (test t). Le test t de variance inégale (test t de

Welch) ou bien un test t non paramétrique tel que le test U de Mann-Whitney peuvent être employés lorsque ces conditions ne sont pas satisfaites.

40. Si l'on cherche à déterminer des différences significatives entre les témoins (témoin et témoin de solvant), les répliques de chaque témoin peuvent être testés comme il est décrit pour l'essai limite. Lorsque les essais ne détectent aucune différence significative, il est possible de rassembler toutes les expériences identiques témoins et témoins de solvant. Dans le cas contraire, il faut comparer tous les traitements avec le témoin de solvant.

Rapport d'essai

41. Le rapport d'essai doit comprendre au moins les informations suivantes :

Produit chimiques testé

Nature physique et propriétés physico-chimiques pertinentes :

- Données d'identification chimique;

Substance mono-constituant :

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

Substance multi-constituants, UVBC et mélanges :

caractérisés autant que possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), la teneur et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

Organismes expérimentaux

- identification et fournisseur des organismes expérimentaux, description des conditions d'élevage ;
- gamme d'âges des organismes expérimentaux.

Conditions expérimentales

- description du modèle expérimental et du mode opératoire;
- détails sur la préparation du sol d'essai ; description détaillée lorsque l'on utilise un sol naturel (origine, histoire, distribution de tailles de particules, pH, teneur en matières organiques, et, le cas échéant, classification du sol);
- capacité maximale de rétention d'eau du sol;
- description de la méthode d'application du produit chimique testé dans le sol;
- conception expérimentale et mode opératoire ;
- dimension des récipients expérimentaux et masse sèche de sol d'essai par récipient ;
- conditions expérimentales : intensité lumineuse, durée des cycles de lumière et d'obscurité, température;
- description du régime d'administration de la nourriture, nature et quantité de nourriture fournie au cours de l'essai, dates d'alimentation;
- pH et teneur en eau du sol au début et pendant l'essai;

- description détaillée de la méthode d'extraction et de l'efficacité d'extraction.

Résultats de l'essai

- nombre de juvéniles déterminé dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai;
- nombre de femelles adultes et mortalité des adultes (%) dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai;
- description des symptômes évidents ou des changements nets de comportement;
- résultats obtenus avec la substance de référence de l'essai;
- résumé des analyses statistiques (CEx et/ou CSEO) y compris les limites de confiance à 95 % et la description de la méthode de calcul;
- courbe de la relation concentration-réponse;
- écarts par rapport aux protocoles décrits dans cette Ligne directrice et faits inhabituels, quels qu'ils soient, survenus au cours de l'essai.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). *Gayana Zool.* 57, 21-46.
- (2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. *Pacific Insects* 24, 259-274.
- (3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. *JSS – Journal of Soils and Sediments* 3, 73-77.
- (4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition In: Dahl, F. (Hrsg.): *Die Tierwelt Deutschlands* 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.
- (5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): *Modern Acarology*. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492
- (6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). *Proc. 2nd Symp. EURAAC*: p 241-249.
- (7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. *Proc. IXth Internat. Congr. Acarol.* 1994, Columbus, Ohio: p 621-628.
- (8) Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: *Handbook of soil invertebrate toxicity tests*. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.
- (9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Rømbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests – Invertebrates. In: *Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils*. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.
- (10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. *Zool. Beiträge*, 34, 395-433.
- (11) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. *Zool. Beitr. N.F.* 34, 413-433.
- (12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Gamasida: Laelapidae). *Environmental Science & Technology* 39, 7154-7157.

- (13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. *Natura Jutlandica* 20, 95-122.
- (14) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1994). Qualité du sol -- Détermination du pH, No. 10390. ISO, Genève.
- (15) OCDE (1984). Ligne directrice pour les essais de produits chimiques. *Essai n° 207: Ver de terre, essais de toxicité aiguë*. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.
- (17) ISO (Organisation internationale de normalisation) (1993). Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau -- Méthode gravimétrique, No. 11465. ISO, Genève.
- (18) Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.
- (19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit *Onychiurus fimatus* Gisin (Collenbola). *Ges.allg. angew. Ent.* 3:122-125.
- (20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). *Zool.Beitr. N.F.* 34(3):395-433.
- (21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. *Applied Soil Ecology* 36, 130-135.
- (22) OCDE (2004).). Ligne directrice pour les essais de produits chimiques. *Essai n° 220: Essai de reproduction chez l'enchytrée*. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (23) ISO (Organisation internationale de normalisation) (2012). Qualité du sol -- Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*). Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction, No. 11268-2. ISO, Genève.
- (24) Southwood, T.R.E. (1991). *Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations.* (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.
- (25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). *Methoden der Bodenbiologie* (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.
- (26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with "good genes" in a soil predatory mite. *Nature* 401, 581-583.

- (27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.
- (28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.
- (29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11-59.
- (30) Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina : Mesostigmata : Laelaptidae). Acarologia 6, 647-658.

ANNEXE 1DEFINITIONS

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente Ligne directrice (dans cet essai, toutes les concentrations efficaces sont exprimées en masse du produit chimique testé rapportée à la masse sèche du sol d'essai):

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

La CMEO (concentration minimale avec effet observé) est la plus faible concentration du produit chimique testé qui exerce un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

La CE_x (concentration efficace à x%) est la concentration qui engendre un effet de x% sur les organismes d'expérience durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, une CE₅₀ est une concentration estimée produire un effet sur un paramètre évalué de l'essai dans 50 % d'une population exposée durant une période d'exposition déterminée.

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

La méthode suivante de détermination de la capacité maximale de rétention d'eau du sol a fait ses preuves. Elle est décrite à l'annexe C de la norme ISO 11268-2 (Qualité du sol -- Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*). Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction (23))

Prélever une quantité déterminée (5 g, par exemple) du sol expérimental servant de substrat à l'aide d'un instrument approprié (tube de tarière, etc.). Couvrir le fond du tube d'un morceau de papier filtre imbibé d'eau, puis placer le tube sur un support dans un bain d'eau. Le tube doit être progressivement immergé jusqu'à ce que le niveau d'eau passe au-dessus du sol. Laisser le tube dans l'eau durant environ trois heures. Comme l'eau absorbée par les capillaires du sol ne peut pas être retenue en totalité, il faut la laisser s'évacuer de l'échantillon de sol durant deux heures en plaçant le tube sur un lit de sable quartzique finement broyé très humide contenu dans un récipient fermé (pour qu'il ne sèche pas). Il faut ensuite peser l'échantillon et le sécher à 105 °C jusqu'à ce qu'il atteigne une masse constante. La capacité de rétention d'eau (CRE) est ensuite calculée comme suit :

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

Soit :

S = masse du substrat saturé en eau + masse du tube + masse du papier filtre

T = tare (masse du tube + masse du papier filtre)

D = masse sèche du substrat

ANNEXE 3**DÉTERMINATION DU pH DU SOL**

La méthode de détermination du pH d'un sol, décrite ci-dessous s'appuie sur la norme ISO 10390 : Qualité du sol – Détermination du pH (16).

On laisse sécher une quantité définie de sol à température ambiante durant au moins 12 heures. On prépare une suspension du sol (contenant au moins 5 g de sol) dans cinq fois son volume d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M de qualité analytique ou d'une solution de chlorure de calcium (CaCl₂) 0,01 M de qualité analytique. On agite vigoureusement la suspension durant cinq minutes et on la laisse sédimenter durant au moins deux heures, mais pas plus de 24 heures. On mesure ensuite le pH de la phase liquide à l'aide d'un pH-mètre, étalonné avant chaque mesure à l'aide d'une série appropriée de solutions tampons (pH 4.0 et 7.0, par exemple).

ANNEXE 4

ELEVAGE DE *HYPOASPIS (GEOLAEAPS) ACULEIFER*, D'ACARIENS DES ALIMENTS ET SYNCHRONISATION DES CULTURESÉlevage de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:

Les cultures peuvent être maintenues dans des récipients de plastique ou des flacons de verre remplis d'un mélange de plâtre de Paris et de poudre de charbon (9/1). Le plâtre doit rester humide grâce à l'addition, si besoin est, de quelques gouttes d'eau distillée ou désionisée. Les températures d'élevage optimales sont comprises dans l'intervalle de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, le régime de lumière et d'obscurité n'est pas déterminant pour cette espèce. Les proies peuvent être des acariens *Tyrophagus putrescentiae* ou *Caloglyphus* (les acariens des aliments doivent être manipulés avec précaution car ils peuvent provoquer des allergies chez l'homme), mais les nématodes, les enchytrées et les collemboles sont également des proies adéquates. Leur provenance doit être consignée. Il est possible d'initier le développement de la population à partir d'une seule femelle, car les mâles se développent dans les œufs non fécondés. Les générations se chevauchent dans une large mesure. Une femelle peut vivre au moins 100 jours et pondre environ 100 œufs au cours de sa vie. Le taux de ponte maximal est atteint entre 10 et 40 jours (à l'âge adulte) et il s'élève à 2.2 œufs femelle⁻¹ jour⁻¹. Le développement de l'œuf jusqu'au stade adulte de la femelle dure environ 20 jours à 20°C . Il faut maintenir et traiter plusieurs cultures à l'avance.

Élevage de *Tyrophagus putrescentiae*:

Les acariens sont élevés dans un récipient en verre rempli de poudre de levure de bière fine, et placé dans un seau en plastique rempli d'une solution de KNO_3 qui empêche la fuite des animaux. Les acariens des aliments sont placés au dessus de cette poudre. Ensuite, ils sont soigneusement mélangés à la poudre (à remplacer deux fois par semaine) à l'aide d'une spatule.

Synchronisation de la culture:

Les spécimens utilisés dans l'essai doivent avoir à peu près le même âge (environ 7 jours après le passage au stade adulte). À la température d'élevage de 20°C , la synchronisation est réalisée de la manière suivante:

- Les femelles sont transférées dans un récipient d'élevage propre et reçoivent une quantité suffisante de nourriture
- On les laisse pondre pendant deux ou trois jours, puis elles sont récoltées
- Les femelles adultes sont prélevées pour l'essai entre le 28^{ème} et le 35^{ème} jour après le placement des femelles adultes dans des récipients d'élevage propres.

Il est facile de distinguer les femelles adultes des mâles et des animaux aux autres stades de développement par leur dimension plus grande, leur forme boursoufflée et leur bouclier dorsal brun car les mâles sont plus minces et plats, et les stades immatures sont blancs à crèmes. Le développement des acariens est à peu près conforme au modèle décrit ci-dessous à 20°C (Figure) : œuf 5 j, larve 2 j, protonympe 5 j, deutonympe 7 j, période de préoviposition de la femelle 2 j. Ensuite, les acariens sont adultes.

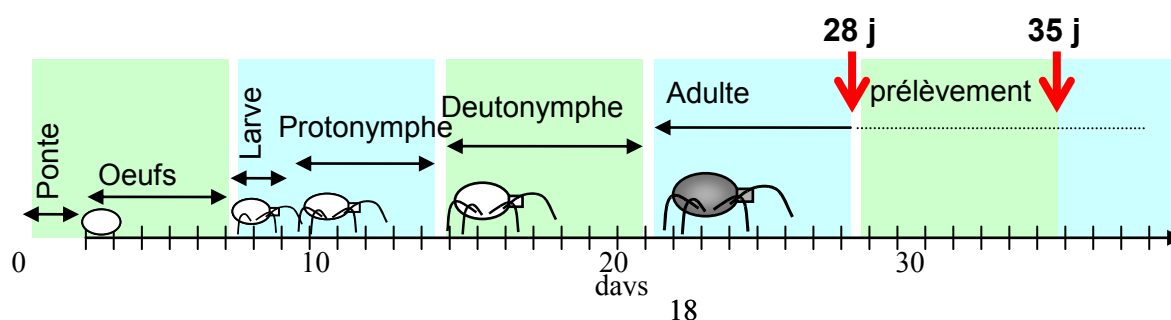


Figure: Développement de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* à 20 °C. (prélèvement = femelles utilisées pour l'essai)

Les animaux adultes sont prélevés dans la culture synchronisée et introduits dans les récipients expérimentaux entre le 28^e et le 35^e jour après le début de la ponte des parents femelles (c'est-à-dire 7-14 jours après le passage à l'âge adulte). On s'assure ainsi que les animaux de l'essai sont au-delà de la période de préoviposition et se sont accouplés avec des mâles qui sont également présents dans le récipient de culture. Des observations réalisées sur des cultures de laboratoire suggèrent que, lorsque des mâles sont présents, les femelles s'accouplent dès le passage à l'âge adulte ou peu après (Ruf, Vaninnen, obs. pers.). La période de sept jours est retenue car elle s'intègre facilement à la routine du laboratoire et atténue la variabilité développementale individuelle entre les acariens. L'oviposition doit être initiée avec un nombre de femelles au moins égal à celui qui sera finalement nécessaire pour l'essai (par exemple, s'il faut 400 femelles dans l'essai, il faudra laisser pondre au moins 400 femelles pendant deux à trois jours. Le nombre d'œufs au point de départ de la population synchronisée doit être d'au moins 1200 (proportion relative des sexes environ 0.5, mortalité environ 0.2)). Afin d'éviter le cannibalisme, il est préférable que chaque récipient renferme au plus 20 à 30 femelles en période de ponte.

ANNEXE 5METHODES D'EXTRACTION

L'extraction à la chaleur est une méthode qui convient à la séparation de microarthropodes à partir d'un sol ou d'un substrat (voir figure ci-dessous). La méthode tire parti de l'activité des organismes, et ainsi, seuls les spécimens mobiles sont susceptibles d'être enregistrés. Le principe de l'extraction à la chaleur consiste à dégrader progressivement les conditions dans l'échantillon pour inciter les organismes à quitter le substrat et les faire tomber dans un liquide de fixation (par exemple éthanol). Les paramètres déterminants sont la durée de l'extraction et l'évolution des conditions appliquées, qui varient de bonnes à modérément bonnes puis deviennent mauvaises pour les organismes. Dans des essais écotoxicologiques, la durée de l'extraction doit être aussi brève que possible, car toute croissance de la population au cours de l'extraction falsifie les résultats. Par ailleurs, les conditions de températures et d'humidité dans l'échantillon doivent toujours garder des valeurs compatibles avec le déplacement des acariens. Le chauffage d'un échantillon de sol provoque la dessiccation du substrat. Si celle-ci est trop rapide, certains acariens se dessècheront en même temps et ne parviendront pas à s'enfuir.

Par conséquent, le protocole suivant est proposé (24) (25) :

Appareil : Entonnoir de Tullgren ou équipement comparable, pour appliquer, par exemple la méthode de McFadyen (chauffage par-dessus, l'échantillon est placé sur un entonnoir)

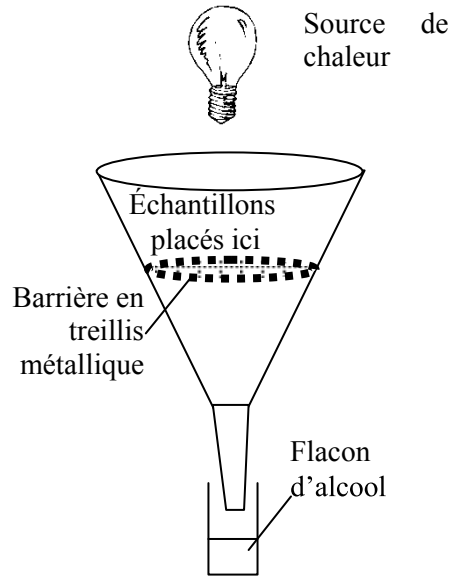
Régime de chauffage : 25 °C pendant 12 h, 35 °C pendant 12 h, 45 °C pendant 24 heures (48 h au total). La température doit être mesurée dans le substrat.

Liquide de fixation : éthanol 70 %

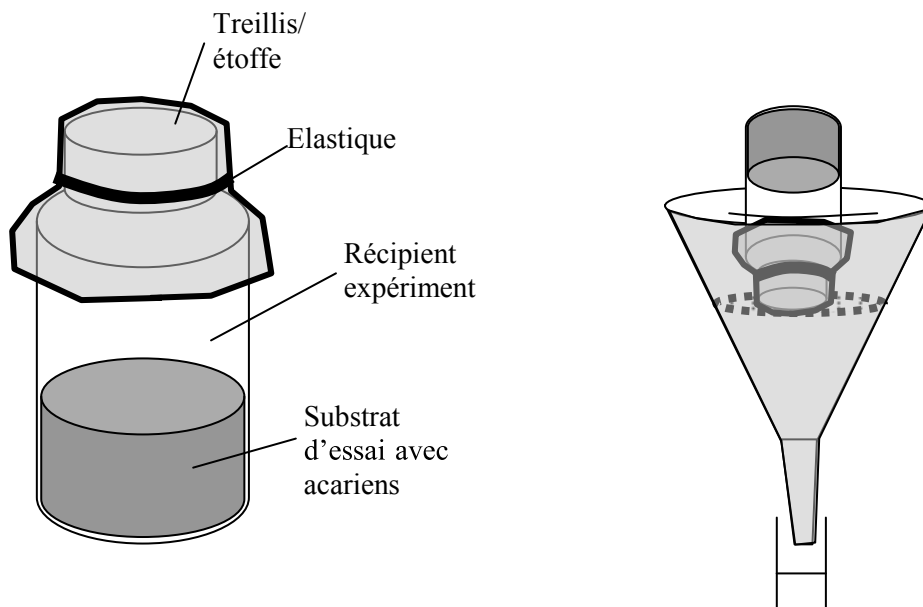
Description détaillée : Utiliser le flacon de verre qui a servi pour l'essai. Retirer le couvercle et couvrir l'ouverture d'un morceau de treillis ou d'étoffe. L'étoffe doit avoir une dimension de maille de 1.0 à 1.5 mm. Fixer l'étoffe avec un élastique. Renverser soigneusement le flacon et le placer dans l'appareil d'extraction. L'étoffe empêche le substrat de couler dans le liquide de fixation, mais laisse les acariens sortir de l'échantillon. Démarrer le chauffage en appliquant le régime ci-dessus après avoir inséré tous les flacons. Terminer l'extraction au bout de 48 heures. Retirer les flacons de fixation et compter les acariens à l'aide d'un microscope à dissection.

Il faut démontrer l'efficacité d'extraction de la méthode choisie une ou deux fois par an en utilisant des récipients contenant un nombre connu d'acariens juvéniles et adultes élevés dans un substrat d'essai non traité. L'efficacité doit atteindre ≥ 90 % en moyenne combinée pour tous les stades de développement.

DISPOSITIF D'EXTRACTION DE TYPE TULLGREN

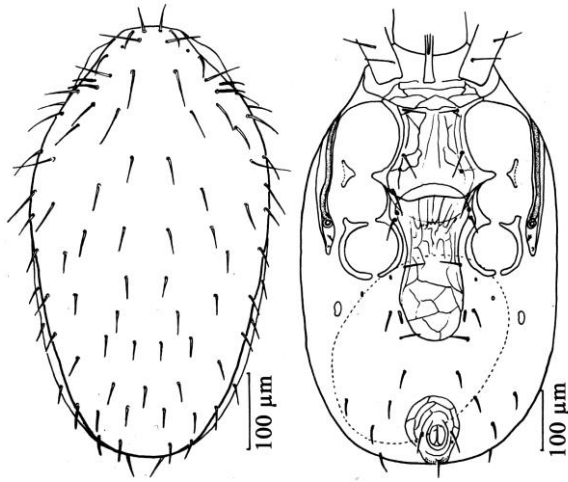


Comment préparer le flacon expérimental à la fin de l'essai et avant l'extraction

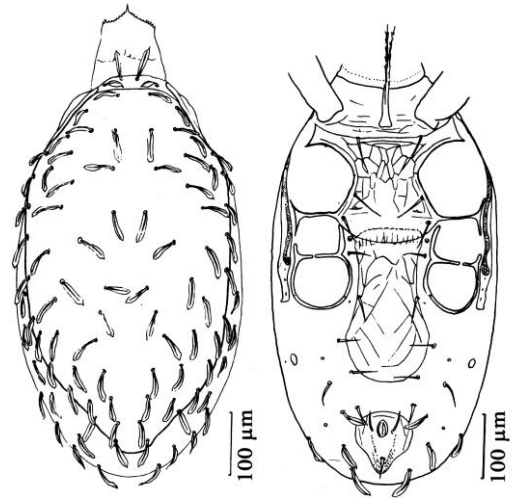


ANNEXE 6IDENTIFICATION DE *HYPOASPIS (GEOLAE LAP S) ACULEIFER*

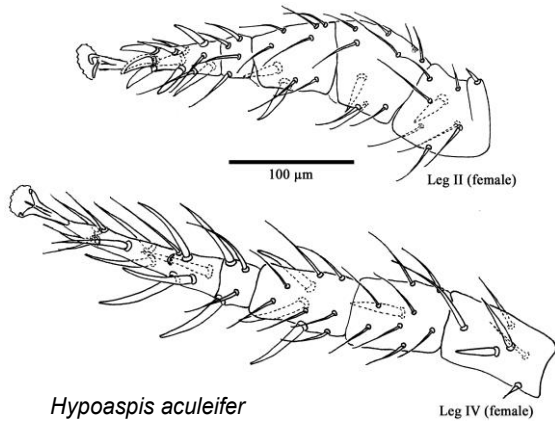
| | | |
|---------------------------------------|--|---|
| Sous-classe/ordre/sous-ordre : | Famille : | Genre/sous-genre/espèces : |
| Acari/Parasitiformes/ Gamasida | Laelapidae | <i>Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer</i> |
| Auteur et Date : | F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 janvier 2007 | |
| Article utilisé : | <p>Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2^e édition révisée : 1-523.</p> <p>Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400pp.</p> <p>Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.</p> | |
| Caractéristiques de détermination : | <p>Tectum avec un bord denticulaire arrondi ; sillons hypostomaux comprenant plus de 6 denticules ; poils dorsaux caudaux Z4 assez courts ; poils dorsaux sétiformes ; bouclier génital normal peu développé et n'atteignant pas le bouclier anal ; moitié postérieure du bouclier dorsal sans poils non appariés ; pattes II et IV avec quelques macropoils épais ; poil dorsal Z5 environ deux fois plus long que J5 ; doigt fixe de chélicère avec 12-14 dents et doigt mobile avec 2 dents ; Idiosome 520-680 long.</p> <p><i>Hypoaspis miles</i> est également utilisé comme témoin biologique et peut être confondu avec <i>H. aculeifer</i>. La principale différence est la suivante : <i>H. miles</i> appartient au sous-genre <i>Cosmolaelaps</i> et ses poils dorsaux sont en forme de lame tandis que <i>H. aculeifer</i> appartient au sous-genre <i>Geolaelaps</i> avec des poils dorsaux sétiformes.</p> | |



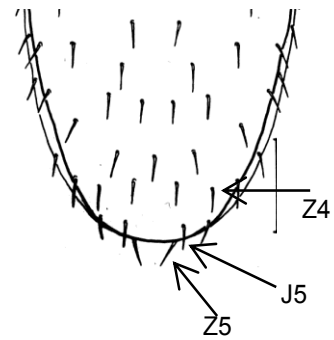
Hypoaspis aculeifer d'après Hughes, 1976



Hypoaspis miles d'après Hughes, 1976



Hypoaspis aculeifer
F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
dorsal shield with characteristic setae

ANNEXE 7Informations générales sur la biologie de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Hypoaspis aculeifer appartient à la famille des Lealapidae, ordre des Acari (acariens), classe des Arachnida, tribu des Arthropoda. Ils vivent dans des sols de tous types et se nourrissent d'autres acariens, de nématodes, d'enchytrées et de collemboles (26). En cas de pénurie alimentaire, ils deviennent cannibales (27). Les acariens prédateurs sont segmentés en idiosome et gnathosome. La différenciation entre l'idiosome dans le prosome (tête) et l'opisthosome (abdomen) n'est pas nette. Le gnathosome (bouclier de la tête) contient les pièces pour l'alimentation telles que les pattes et les chélicères. Les chélicères sont divisés en trois branches et munis de dents de différentes formes. Les mâles utilisent leurs chélicères pour l'ingestion, mais également pour transférer les spermatophores aux femelles. Un bouclier dorsal couvre presque complètement l'idiosome. Une grande partie de l'idiosome de la femelle est occupée par les organes reproducteurs, distincts en particulier peu avant la ponte des œufs. Sur la face ventrale, se trouvent deux boucliers, le bouclier sternal et le bouclier génital. Toutes les pattes sont pourvues de soie et d'épines. Les soies servent à l'ancrage lors du déplacement dans le sol ou sur le sol. La première paire de pattes fait essentiellement fonction d'antennes. La seconde paire de pattes sert non seulement au déplacement, mais également à l'immobilisation de la proie. Les épines de la quatrième paire de pattes servent de protection ainsi que de "moteurs de déplacement" (28). Les mâles mesurent de 0.55 à 0.65 mm de long et pèsent de 10 à 15 µg. Les femelles mesurent de 0.8 à 0.9 mm de long et pèsent de 50 à 60 µg (8) (28) (Fig 1).



Fig 1: Femelle, mâle, protonympe et larve de *H. aculeifer*.

À 23 °C, les acariens atteignent la maturité sexuelle au bout de 16 jours (femelles) et de 18 jours (mâles), respectivement (6). Les spermatozoïdes sont transportés dans les femelles par le solénostome depuis lequel ils sont transférés dans l'ovaire. Dans l'ovaire, les spermatozoïdes subissent une maturation et sont stockés. La fécondation n'a lieu qu'après la maturation des spermatozoïdes dans l'ovaire. Les ovules fécondés ou non fécondés sont déposés par les femelles en amas ou séparément, de préférence dans des fissures ou des trous. Les femelles qui ont copulé peuvent porter des juvéniles des deux sexes, tandis qu'en l'absence de copulation, les œufs ne produisent que des juvéniles mâles. Au cours du développement jusqu'à l'âge adulte, les acariens traversent quatre phases (œuf-larve, larve-protonympe, protonympe-deutonympe, deutonympe-adulte).

L'œuf est blanc laiteux, hyalin, elliptique et mesure environ 0.37 mm de long. Il est doté d'un manteau solide. Selon (8), la taille des larves est comprise entre 0.42 et 0.45 mm. Elles n'ont que trois paires de pattes. Des palpes et des chélicères se développent dans la région de la tête. Les chélicères, munis que quelques petits denticules, sont utilisés pour l'éclosion. Après la première mue, un à deux jours après l'éclosion, les protonymphes se développent. Elles sont également blanches, d'une dimension de 0.45 à 0.62 mm (8) et elles possèdent quatre paires de pattes. Les chélicères sont entièrement pourvus de dents. C'est à partir de ce stade que les acariens commencent à rechercher leur nourriture. Dans ce but, la cuticule de la proie est percée par les chélicères et une sécrétion qui permet la digestion extra-intestinale est émise dans la proie. La pâte alimentaire peut ensuite être aspirée par l'acarien. Les chélicères peuvent être également utilisés pour fendre des boulettes d'aliments et en extraire des particules plus grosses (28). Les deutonymphes se développent après une nouvelle mue. Elles mesurent de 0.60 à 0.80 mm (8) et sont de couleur jaune à brun clair. À partir de ce stade, on peut séparer les femelles des mâles. Les acariens atteignent l'âge adulte après une nouvelle ecdysis, pendant laquelle les animaux restent inactifs et le bouclier brun se développe (après environ 14 jours) (28) (29) (30)). Leur durée de vie se situe entre 48 et 100 jours à 25 °C (27).

ANNEXE 8RESUME ET CALENDRIER DES PRINCIPALES ETAPES DE L'ESSAI SUR HYPOASPIS

| Temps (jours) début de l'essai = jour 0 | Activité/tâche |
|---|---|
| Jour -35 à -28 | <ul style="list-style-type: none"> - Transfert des femelles de la culture mère dans des récipients propres pour initier la synchronisation - 2 jours plus tard : prélèvement des femelles - Deux ou trois fois par semaine : apport d'aliments en quantité suffisante |
| Jour -5 (+/- 2) | Préparation du sol artificiel |
| Jour -4 (+/- 2) | <ul style="list-style-type: none"> - Détermination de la capacité de rétention d'eau du sol artificiel - Séchage une nuit - Jour suivant : pesée des échantillons et calcul de la capacité de rétention d'eau |
| Jour -4 (+/- 2) | Pré-humidification du sol artificiel pour obtenir une capacité de rétention d'eau de 20 à 30 % |
| Jour 0 | <ul style="list-style-type: none"> - Début de l'essai : addition du produit chimique testé au sol artificiel - Introduction de 10 femelles dans chaque réplica - Pesée de chaque réplica - Préparation de témoins abiotiques pour la mesure du taux d'humidité et du pH, 2 expériences identiques par traitement - Séchage des témoins d'humidité une nuit - Jour suivant : pesée des témoins d'humidité - Jour suivant : mesure du pH des témoins abiotiques séchés |
| Jour 3, 6, 9, 12 (environ) | <ul style="list-style-type: none"> - Apport d'une quantité suffisante de proies dans chaque expérience - Pesée de chaque expérience et rajout éventuel de la quantité d'eau évaporée |
| Jour 14 | <ul style="list-style-type: none"> - Fin de l'essai, extraction à partir de tous les réplicas et témoins d'efficacité de l'extraction - Séchage des témoins de teneur en eau une nuit - Jour suivant : pesée des témoins de teneur en eau - Jour suivant : mesure du pH des témoins séchés |
| Jour 16 | Fin de l'extraction |
| Jour 16+ | <ul style="list-style-type: none"> - Comptage du nombre d'adultes et de juvéniles dans le matériau extrait - Report des résultats sur des tableaux matrices - Report du protocole d'essai dans le formulaire du protocoles d'essai |