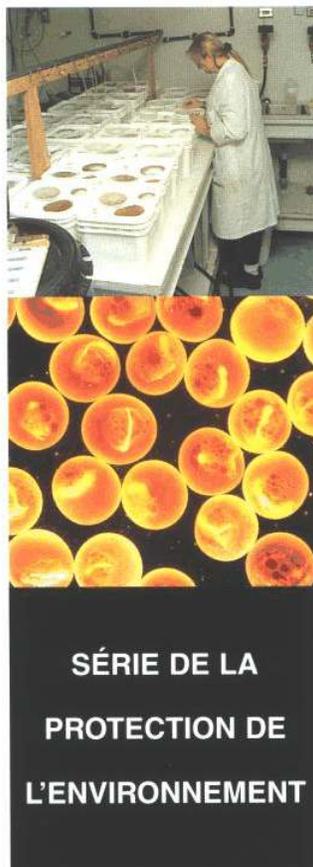


SPE 1/RM/28 Deuxième édition – Juillet 1998

Section de l'élaboration et de l'application des méthodes
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada



**Méthode d'essai biologique:
essais toxicologiques sur des salmonidés
(truite arc-en-ciel) aux premiers stades de
leur cycle biologique**



Environment
Canada

Environnement
Canada

Canada

Méthode d'essai biologique : essais toxicologiques sur des salmonidés (truite arc-en-ciel) aux premiers stades de leur cycle biologique

Section de l'élaboration et de l'application des méthodes
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada
Ottawa (Ontario)

Rapport SPE 1/RM/28
DEUXIÈME ÉDITION

Juillet 1998

Données de catalogage avant publication (Canada)

Vedette principale au titre :

Méthode d'essai biologique : essais toxicologiques sur des salmonidés (truite arc-en-ciel) aux premiers stades de leur cycle biologique

Deuxième éd.

(Rapport ; SPE 1/RM/28-1F)

Publ. aussi en anglais sous le titre : Biological test method, toxicity tests using early life stages of salmonid fish (Rainbow trout).

Comprend un résumé en anglais.

Comprend des références bibliographiques.

ISBN 0-660-96132-6

N° de cat. En49-24/1-28-1F

1. Salmonidés -- Essais -- Normes.

2. Truite arc-en-ciel -- Essais -- Normes.

3. Effluents -- Qualité -- Essais -- Normes -- Canada.

I. Canada. Direction générale de la protection de l'environnement.

II. Canada. Environnement Canada.

III. Coll. : Rapport (Canada. Environnement Canada) ; SPE 1/RM/28-1F.

QL638.S2B56 1999

587.'55

C99-980137-6

Commentaires

Adresser les commentaires sur la teneur du présent rapport à :

Richard Scroggins
Section de l'élaboration et de l'application des méthodes
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada
335 River Road
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

This report is also available in English from:

Environmental Protection Publications
Environment Canada
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

Avis de révision

Le présent document a été révisé par le personnel de la Direction générale de l'avancement des technologies environnementales d'Environnement Canada, et sa publication a été autorisée. La mention d'appellations commerciales ou de produits offerts sur le marché ne constitue ni une approbation du produit par Environnement Canada ni une recommandation de son emploi.

Résumé

Dans le présent rapport, Environnement Canada recommande des méthodes révisées pour les essais toxicologiques employant des embryons, des alevins et des jeunes de salmonidés (c'est-à-dire de la truite arc-en-ciel). On y décrit trois variantes d'essais : un essai (dit E), employant des embryons, destiné aux programmes de surveillance fréquente ou systématique ; un essai (dit EA), employant des embryons et des alevins, pour mesurer les effets sur divers stades du développement ; un essai (dit EAT), employant des embryons, des alevins et des truitelles pour obtenir des résultats plus concluants. Les trois débutent au commencement du stade de l'embryon et mesurent le développement et la survie aux premiers stades du cycle biologique. L'essai E se termine sept jours après la fécondation ; l'essai EA, sept jours après l'éclosion de la moitié des alevins du groupe témoin ; l'essai EAT, 30 jours après le début du stade de la truitelle. Le choix de l'option dépend des objectifs de l'essai et des caractéristiques physico-chimiques de la substance d'essai. Comme, aux premiers stades de leur existence, les poissons sont généralement très sensibles, on devrait considérer ces essais comme des dosages biologiques puissants et significatifs.

*Pour les trois options, il faut utiliser la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Le rapport renferme des instructions sur les géniteurs, la manipulation des gamètes et la fécondation des œufs avant le début des essais ainsi que sur l'incubation des embryons et des alevins et l'alimentation des truitelles, le cas échéant, pendant les essais. On expose les conditions et méthodes générales ou universelles de l'évaluation des effets de diverses substances sur les premiers stades du cycle biologique de la truite. On précise aussi d'autres conditions et méthodes propres à l'évaluation d'échantillons de produit chimique, d'effluent, d'élutriat, de lixiviat ou d'eau réceptrice. Le lecteur trouvera des instructions et des marches à suivre concernant l'appareillage, les installations d'essai, la manutention et l'entreposage des échantillons, la préparation des solutions d'essai et la mise en route des essais, les conditions précises dans lesquelles ces essais doivent se dérouler, les observations et les mesures appropriées, y compris les paramètres ultimes de mesure, les méthodes de calcul et la validation des résultats.*

Abstract

Revised procedures for toxicity tests using salmonid (i.e., rainbow trout) embryos, alevins, and swim-up fry, are recommended by Environment Canada in this report. Three test options are described: an embryo (E) test for frequent or routine monitoring; an embryo/alevin (EA) test for measuring effects on multiple phases of development; and an embryo/alevin/fry (EAF) test for more definitive investigations. All three test options start at the onset of embryo development, and measure the development and survival of early life stages. The embryo test ends seven days after fertilization. The embryo/alevin test is terminated seven days after half of the alevins are seen to have hatched in the control. The embryo/alevin/fry test ends after 30 days of feeding swim-up fry. Selection of the most suitable test option will depend on the objectives of the test and on the physicochemical characteristics of the substance being tested. Because such early life stages are usually a sensitive part of the life cycle of a fish, the tests should be considered as powerful and meaningful assays.

*Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) must be used when performing each of these three test options. Procedures are given for spawning broodstock, handling gametes, and fertilizing eggs of rainbow trout before starting the test, as well as for incubating embryos and alevins and feeding swim-up fry during the tests which include these life stages. General or universal conditions and procedures are outlined for testing a variety of substances for their effects on the early life stages of rainbow trout. Additional conditions and procedures are stipulated, which are specific for testing samples of chemical, effluent, elutriate, leachate, or receiving water. Instructions and requirements are included on apparatus, facilities, handling and storing samples, preparing test solutions and initiating tests, specific test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints, methods of calculation, and validation.*

Avant-propos

Le présent rapport est la deuxième édition de la méthode à trois options, dans laquelle Environnement Canada expose les essais toxicologiques employant les premiers stades du cycle biologique des salmonidés. La première édition (EC, 1992) a été publiée en décembre 1992. Depuis, des chercheurs canadiens des laboratoires fédéraux et privés ainsi que des scientifiques américains ont proposé un certain nombre de modifications qui simplifient et améliorent les marches à suivre et les conditions de chacune de ces options (E, EA et EAT). Contrairement à la première édition (EC, 1992), qui recommandait l'emploi de trois salmonidés (c'est-à-dire de la truite arc-en-ciel, du saumon coho et du saumon de l'Atlantique), la présente prescrit l'emploi d'Oncorhynchus mykiss (truite arc-en-ciel ou truite « steelhead ») pour toutes ces options.

*La présente méthode fait partie d'une série de **méthodes recommandées** pour mesurer et évaluer les effets biologiques des substances et matières toxiques dans le milieu aquatique. Ces méthodes ont été évaluées par Environnement Canada (EC) et elles sont recommandées :*

- pour la mesure de la toxicité en milieu aquatique, dans les laboratoires d'Environnement Canada ;*
- pour les essais impartis par Environnement Canada ou demandés par l'industrie ou des organismes de l'extérieur ;*
- dans les cas où on ne possède pas d'instructions plus précises, comme celles que prévoient les règlements ;*
- comme base d'instructions très explicites, comme celles qui pourraient être exigées dans un protocole réglementaire ou dans une méthode normalisée de référence.*

Les différents types d'essais de cette série en font partie parce qu'ils étaient acceptables aux fins des programmes de protection et de gestion de l'environnement mis en œuvre par Environnement Canada. Les rapports qui leur sont consacrés visent à orienter et à faciliter l'emploi de méthodes cohérentes, convenables et exhaustives pour l'obtention de données sur la toxicité, pour les formes de vie aquatiques, de substances ou de matières précises qui se trouvent dans le milieu aquatique ou qui sont destinées à y aboutir. Selon la méthode choisie, ces substances ou matières pourraient englober les échantillons d'un produit chimique, d'un effluent, d'un éluviat, d'un lixiviat ou d'une eau réceptrice ou, encore, s'il y a lieu, d'un sédiment ou d'une matière particulière semblable.

Table des matières

Résumé	v
Abstract	vi
Avant-propos	vii
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xii
Liste des abréviations et des formules chimiques	xiii
Terminologie	x v
Remerciements	xxiii
 <i>Section 1</i>	
Introduction	1
1.1 Contexte	1
1.2 Emploi antérieur de l'essai	3
1.3 Salmonidés étudiés et recommandés	5
 <i>Section 2</i>	
Organisme d'essai	7
2.1 Espèce et stades	7
2.2 Origine des gamètes ou des géniteurs	7
 <i>Section 3</i>	
Système expérimental	10
3.1 Installations, matériaux	10
3.2 Éclairage	10
3.3 Appareillage	11
3.4 Eau témoin et dilution	14
 <i>Section 4</i>	
Modes opératoires universels	17
4.1 Préparation des solutions d'essai	17
4.2 Début de l'essai	21
4.3 Conditions d'essai et modes opératoires	24
4.3.1 Options	24
4.3.2 Type d'essai et renouvellement des solutions	25
4.3.3 Température	27
4.3.4 Oxygène dissous et aération	28
4.3.5 pH	30
4.3.6 Périodes de transition	31
4.3.7 Réussite de la fécondation et éclaircissage	32
4.3.8 Étape finale de l'essai EAT	34
4.3.9 Toxique de référence	35

4.4	Observations et mesures	37
4.5	Paramètres de mesure et calculs	41
4.5.1	Paramètres biologiques de mesure	41
4.5.2	Concentrations efficaces et létales	43
4.5.3	Concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet précisé	46
4.5.4	CSEO et CEMO	48
4.5.5	Test t <i>de Student</i>	49
4.5.6	Test de Tukey	50
4.6	Validité de l'essai	50
4.7	Considérations juridiques	51

Section 5

Modes opératoires particuliers pour la mesure de la toxicité de produits

	chimiques	52
5.1	Options	52
5.2	Propriétés, étiquetage et entreposage de l'échantillon	52
5.3	Préparation et aération des solutions d'essai	53
5.4	Eau témoin ou de dilution	54
5.5	Observations et mesures	55
5.6	Paramètres ultimes de mesure et calculs	56

Section 6

Modes opératoires particuliers pour les essais employant des échantillons d'effluent, d'élutriat et de lixiviats

	d'effluent, d'élutriat et de lixiviats	57
6.1	Options	57
6.2	Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons	59
6.3	Préparation et aération des solutions d'essai	61
6.4	Eau témoin ou eau de dilution	61
6.5	Observations et mesures	62
6.6	Paramètres ultimes de mesure et calculs	63

Section 7

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons d'eau réceptrice

	d'eau réceptrice	65
7.1	Options	65
7.2	Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons	66
7.3	Préparation et aération des solutions d'essai	66
7.4	Eau témoin ou de dilution	66
7.5	Observations et mesures	67
7.6	Paramètres ultimes de mesure et calculs	67

Section 8

	Rapports à produire	69
8.1	Exigences minimales pour le procès-verbal de l'essai	70

8.1.1	Substance d'essai	70
8.1.2	Organismes d'essai	70
8.1.3	Installations et appareillage	70
8.1.4	Eau témoin ou de dilution	70
8.1.5	Méthode d'essai	71
8.1.6	Conditions expérimentales et modes opératoires	71
8.1.7	Résultats	71
8.2	Exigences supplémentaires	72
8.2.1	Substance d'essai	72
8.2.2	Organismes d'essai	72
8.2.3	Installations et appareillage expérimentaux	72
8.2.4	Eau témoin ou de dilution	73
8.2.5	Méthode expérimentale	73
8.2.6	Conditions expérimentales et modes opératoires	73
8.2.7	Résultats	73
	Références	75

Annexe A

Membres du Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique (octobre 1998)	83
--	-----------

Annexe B

Adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux du Service de la protection de l'environnement d'Environnement Canada	85
---	-----------

Annexe C

Écarts méthodologiques des essais aux premiers stades du cycle biologique des salmonidés	86
---	-----------

Annexe D

Distribution, cycle biologique et élevage de la truite arc-en-ciel	98
---	-----------

Annexe E

Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais toxicologiques	104
--	------------

Liste des tableaux

- 1 Recommandations relatives à la qualité de l'eau témoin ou de dilution 15
- 2 Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés 18

Liste des figures

- 1 Points à considérer dans les préparatifs et l'exécution d'essais toxicologiques de divers types de substances aux premiers stades de développement de la truite arc-en-ciel 2
- 2 Aspect général des salmonidés aux premiers stades de leur développement 8
- 3 Montages recommandés pour le renouvellement intermittent ou continu des solutions d'essai durant l'incubation des embryons ou des alevins 12

Liste des abréviations et des formules chimiques

CaCO ₃	carbonate de calcium
CE 50	concentration efficace médiane
CEMO	concentration avec effet minimal observé
CESO	concentration avec effet de seuil observé
CI _p	concentration inhibitrice (p étant le taux précisé d'effet)
CL 50	concentration létale médiane
cm	centimètre
CMAT	concentration maximale acceptable de toxique
CSEO	concentration sans effet observé
CV	coefficient de variation
E	embryons
EA	embryons, alevins
EAT	embryons, alevins, truitelles
EQT	évaluation quantitative de la toxicité
ESM	écart significatif minimal
g	gramme
g/kg	gramme/kilogramme (équivalent à ‰)
h	heure
HCl	acide chlorhydrique
H ₂ O	eau
j	jour
kg	kilogramme
L	litre
m	mètre
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre
mS	millisiemens
N	normal (en parlant d'une solution)
NaOH	hydroxyde de sodium
OD	oxygène dissous
p	probabilité
PTG	pression totale de gaz
S.I.	Système international d'unités
sp.	espèce
°C	degré Celsius
σ	écart-type
~	environ
Z	marque déposée
μg	microgramme
μm	micromètre

§	paragraphe
‰	partie par millier ; pour mille ; millième
>	plus grand que
≥	plus grand que ou égal à
±	plus ou moins
<	plus petit que
≤	plus petit que ou égal à
%	pour cent

Terminologie

Nota : toutes les définitions s'inscrivent dans le contexte du présent rapport ; elles pourraient ne pas être adaptées à d'autres contextes.

Verbes auxiliaires

L'auxiliaire *doit* (*doivent*) exprime l'obligation absolue.

L'auxiliaire *devrait* (*devraient*) et le conditionnel d'obligation (*il faudrait*, etc.) expriment une recommandation ou la nécessité de respecter dans la mesure du possible la condition ou la méthode.

L'auxiliaire *peut* (*peuvent*) autorise une action.

L'auxiliaire *pourrait* (*pourraient*) indique la possibilité ou l'éventualité.

Termes techniques généraux

acclimatation, adaptation physiologique à une valeur précise d'une ou de plusieurs variables environnementales, par exemple à la température. S'applique généralement à des conditions contrôlées en laboratoire.

alevin, poisson venant de sortir de l'œuf, incapable de se nourrir seul et doté d'une vésicule vitelline proéminente ; voir aussi *alevin non viable*.

alevin non viable, œuf d'où n'est pas sorti un alevin vivant normal, sept jours après qu'on a constaté un taux d'éclosion de 50 % chez les groupes témoins de l'essai toxicologique. Englobe les œufs non fécondés, les embryons morts, les embryons au développement retardé et les alevins manifestement difformes ou atypiques (c'est-à-dire bicéphales ou à deux queues).

alimentation externe, absorption de la nourriture disponible dans l'eau, par le jeune poisson nageant librement.

conductivité, grandeur physique caractérisant la capacité de conduction du courant électrique par une solution aqueuse. Elle dépend de la concentration des ions en solution, de leur valence, de leur mobilité et de la température de la solution. L'unité est le microhm⁻¹ · centimètre⁻¹ ($\mu\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ou le millisiemens/mètre (mS · m⁻¹).

conformité, respect des exigences officielles des règlements ou des permis.

croissance, accroissement de taille ou gain de poids par suite de la formation de nouveaux tissus. Pour les besoins de l'expérience, on se borne à observer l'augmentation du poids sec.

dispersant, substance abaissant la tension superficielle entre l'eau et une substance hydrophobe (p. ex., l'huile), ce qui facilite la dispersion de cette dernière dans l'eau sous forme d'émulsion.

durcissement par l'eau, processus survenant dans les deux heures suivant la fécondation, lorsque l'absorption d'eau dans l'espace péritellin fait gonfler l'œuf, et avant que la membrane ne devienne relativement imperméable.

dureté, concentration, dans l'eau, des cations réagissant avec un savon sodique en formant un précipité insoluble. En général, la dureté mesure la concentration des ions calcium et magnésium dans l'eau, exprimée en mg de carbonate de calcium au litre.

éclaircissage, élimination, au hasard, d'un certain nombre d'organismes en expérience dans au moins une répétition, pour réduire l'encombrement, maintenir une densité de charge acceptable ou réduire au minimum le volume de solution d'essai exigé au cours de chaque renouvellement du milieu. Interdit au cours de l'essai E ou EA et durant les stades de l'embryon ou de l'alevin dans l'essai EAT, il ne peut, dans ce dernier, se pratiquer qu'au début de l'étape finale.

élevage, ensemble d'animaux élevés dans des conditions définies et contrôlées en vue d'obtenir des organismes sains en vue d'essais. Activité visant à obtenir ces animaux.

embryon, poisson avant sa sortie de l'œuf.

embryon non viable, œuf qui n'a pas réussi à survivre ou à se développer normalement au moment de l'observation. Englobe les œufs non fécondés et les embryons morts, ou les embryons au développement retardé ou anormal. Tout embryon vivant et d'apparence normale est alors considéré comme viable.

émulsifiant, substance facilitant le mélange fin (sous forme de minuscules gouttelettes), dans l'eau, d'une substance par ailleurs hydrophobe.

évacuation des gamètes sous pression, voir *fécondation artificielle*.

expulsion provoquée, voir *fécondation artificielle*.

fécondation artificielle, manipulation des poissons adultes afin d'en évacuer les œufs ou la laitance. On dit aussi « *expulsion provoquée* » ou « *évacuation sous pression* ».

floculation, formation d'un précipité lâche en suspension (c'est-à-dire d'un floc) dans une solution.

frai, période de reproduction des poissons ; expulsion d'œufs et de sperme par les poissons adultes ; comportement de ces poissons prêts à libérer leurs gamètes.

gamète, œuf ou spermatozoïde du poisson adulte.

géniteur, poisson adulte subissant les transformations physiologiques nécessaires à la production d'œufs ou de sperme.

imperméable, degré dans lequel la membrane de l'œuf empêche le passage des molécules (p. ex., eau, ions, protéines, graisses, toxiques).

incubation, élevage d'embryons ou d'alevins dans des conditions définies, compatibles avec le développement normal.

laitance, mélange de sperme et de liquide séminal produit par le poisson mâle ayant atteint la maturité sexuelle.

lux, unité d'éclairement par mètre carré. Le lux = 0,0929 pied-bougie ; 1 pied-bougie = 10,76 lux.

œuf, ovule sphérique, encapsulé, fécondé ou non, provenant d'un poisson femelle ayant atteint la maturité sexuelle.

œuf embryonné, œuf dans lequel l'embryon a atteint le stade de développement où ses yeux pigmentés sont manifestes à l'observation.

pH, logarithme négatif de l'activité des ions hydrogènes mesurée par leur concentration en équivalents-grammes par litre. Cette valeur exprime le degré ou l'intensité des réactions acides et alcalines sur une échelle de 0 à 14, où 7 représente la neutralité. Les pH inférieurs à 7 correspondent, en ordre décroissant, à des réactions de plus en plus acides, tandis que les pH supérieurs à 7 indiquent, en ordre croissant, des réactions de plus en plus basiques ou alcalines.

photopériode, durée quotidienne de la période d'éclairement.

pourcentage (%), concentration exprimée en nombre de parties sur cent. 1 % (lire un pour cent) d'une substance représente une unité ou une partie de substance (p. ex., d'effluent, d'élutriat, de lixiviat ou d'eau réceptrice) diluée dans l'eau pour constituer en tout 100 parties. Le pourcentage peut s'exprimer en volume sur le volume ou en masse sur la masse de substance d'essai dans la solution finale.

précipitation, formation d'un solide (le précipité) à partir d'une partie ou de la totalité des constituants en dissolution d'une solution.

prétraitement, traitement d'un échantillon ou d'une dilution de cet échantillon avant d'y exposer des poissons.

salinité, quantité totale, en grammes, de substance dissoute dans 1 kg d'eau. Elle se détermine après conversion de tous les carbonates en oxydes, après remplacement de tous les bromures et iodures par des chlorures et après oxydation de toute la matière organique. Se mesure aussi directement par un salinomètre, un conductimètre ou par d'autres moyens (APHA *et al.*, 1995). S'exprime habituellement en grammes par kilogramme ou en millièmes (‰).

surveillance, vérification régulière (p. ex. quotidienne, hebdomadaire, mensuelle, trimestrielle) de la qualité, de la collecte et de la communication de l'information. Dans le présent rapport, s'applique à certaines variables biologiques ou variables relatives à la qualité de l'eau ou au prélèvement d'échantillons d'effluent, d'éluviat, de lixiviat ou d'eau réceptrice et à la mesure de leur toxicité.

truitelle, jeune poisson, nageant librement, qui a commencé à se nourrir activement. Ce stade suit celui de l'alevin.

truitelle non viable, organisme en expérience qui n'a pas réussi à survivre ou à se développer normalement, alors que l'on observe un taux de 50 % de truitelles nageant librement dans le groupe témoin de cet essai toxicologique. Englobe les œufs non fécondés, les œufs non éclos ; les embryons, les alevins et les truitelles morts, ou au développement retardé ou anormal. Toute truitelle vivante et d'apparence normale à ce moment serait comptée comme viable.

turbidité, degré de réduction de la clarté de l'eau par la présence de matières en suspension ou autres qui entraînent la diffusion et l'absorption de la lumière, plutôt que sa transmission en ligne droite dans l'échantillon. S'exprime généralement en unités néphéométriques.

Terminologie des substances d'essai

eau d'amont, eau de surface (p. ex. d'un cours d'eau, d'un lac) ne subissant pas l'influence de l'effluent (ou d'une autre substance d'essai), parce qu'elle en est éloignée vers l'amont (contre le courant) ou perpendiculairement au courant.

eau de dilution, eau douce servant à diluer une substance d'essai à différentes concentrations en vue d'un essai toxicologique.

eau déchlorée, eau chlorée (habituellement eau potable municipale) que l'on a traitée afin d'en éliminer le chlore et ses composés.

eau désionisée, eau qu'on a débarrassée de ses ions par passage dans des colonnes de résine ou dans un système d'osmose inverse.

eau distillée, eau qu'on a traitée au moyen d'un appareil de distillation (au verre borosilicaté ou autre) pour en éliminer les impuretés.

eau réceptrice, eau de surface (p. ex. d'un cours d'eau ou d'un lac) qui a reçu un rejet de matières résiduelles ou qui est sur le point d'en recevoir (p. ex. elle est immédiatement en amont du point de rejet). Il faut en donner une description étoffée pour préciser de quoi il s'agit.

eau reconstituée, eau désionisée ou distillée dans le verre, à laquelle on a ajouté des produits chimiques de qualité « réactif ». L'eau douce synthétique qui en résulte est exempte de contaminants et elle possède les caractéristiques voulues de pH, d'alcalinité et de dureté.

eau témoin ou de dilution, eau servant à la préparation d'une série de solutions filles de la substance d'essai, servant d'eau témoin ou les deux.

eau usée, terme général englobant les effluents, les lixiviats et les éluviats.

effluent, tout déchet liquide (p. ex., industriel, urbain) rejeté dans le milieu aquatique.

élutriat, solution aqueuse obtenue après avoir ajouté de l'eau à une substance ou à une matière solide (p. ex., sol ou sédiment contaminé, stériles, boue de forage, déblai de dragage), avoir agité le mélange, puis l'avoir centrifugé, filtré ou avoir décanté le surnageant.

lixiviat, eau ou eau usée ayant traversé une colonne de sol ou de déchets solides dans l'environnement.

produit chimique, tout élément, composé, préparation ou mélange de substances qui pourrait se retrouver associé à l'eau, y être mélangé ou y être déposé.

solution mère, solution aqueuse concentrée de la substance d'essai. On ajoute des volumes mesurés d'une solution mère à l'eau de dilution pour préparer les concentrations voulues de solutions d'essai.

substance, matière possédant des propriétés plus ou moins uniformes.

témoin, au cours d'une enquête ou d'une étude, variante expérimentale reproduisant toutes les conditions et facteurs qui pourraient influencer sur les résultats, sauf la condition particulière étudiée. Dans un essai toxicologique effectué sur le milieu aquatique, le témoin doit reproduire toutes les conditions d'exposition, mais il ne doit pas renfermer de la substance d'essai ajoutée. Le témoin sert à déterminer l'absence de toxicité mesurable qui serait attribuable aux conditions de base de l'essai (p. ex. qualité de l'eau de dilution, état de santé des organismes d'essai, effets dus à la manipulation de ces derniers).

Terminologie statistique et toxicologique

aigu, qui se manifeste sur une courte période relativement à la durée de vie de l'organisme en expérience, par exemple un essai de quatre jours sur le poisson. Un effet toxique aigu serait provoqué et observable au cours de cette période.

à *renouvellement continu*, se dit d'un essai dans lequel on renouvelle continuellement la solution du milieu expérimental par l'apport constant ou l'apport intermittent mais fréquent de solutions fraîches.

à *renouvellement intermittent*, se dit d'un essai toxicologique dans lequel on renouvelle (remplace) périodiquement la solution, habituellement au début de chaque période de 24 heures. Syn. à *renouvellement périodique*.

chronique, qui survient habituellement au cours d'une période longue, p. ex. 10 % de la durée de vie de l'organisme. Un effet toxique chronique pourrait ne devenir observable qu'au bout d'une bonne partie de la durée de vie de l'organisme, bien qu'il puisse être provoqué par une exposition aiguë ou chronique à une substance toxique.

concentration avec effet minimal observé (CEMO), concentration minimale de substance causant, chez l'organisme qui y est exposé, des effets décelés par l'observateur et statistiquement significatifs. Par exemple, ce pourrait être la concentration minimale qui, à la fin de l'essai, correspond à un retard significatif de la croissance du poisson par rapport à celle des groupes témoins. On en réserve habituellement l'emploi aux effets sublétaux, mais on peut aussi s'en servir pour la mortalité, laquelle, parfois pourrait être l'effet le plus sensible observé.

concentration chronique, synonyme de *concentration avec essai de seuil observé (CESO)*, le terme recommandé, parce qu'il peut décrire précisément tous les effets sublétaux, qu'ils soient aigus ou chroniques.

concentration avec effet de seuil observé (CESO), moyenne géométrique de la concentration sans effet observé (CSEO) et de la concentration avec effet minimal observé (CEMO). À l'étranger, on trouve une notion diversement définie, la concentration acceptable maximale de toxique (CAMT). La *concentration chronique* ou la *concentration subchronique* sont d'autres termes que l'on pourrait considérer comme convenables selon la durée d'exposition au cours de l'essai.

concentration efficace médiane (CE 50), concentration de substance dans l'eau (p. ex. en mg/L) qu'on estime causer un effet toxique sublétal ou létal discernable à la moitié des organismes en expérience. Dans la plupart des cas, la CE 50 (y compris ses limites de confiance à 95 %) découle de l'analyse statistique d'une réaction biologique observée (p. ex. l'incidence des embryons non viables ou la réduction de la réussite de la ponte) à diverses concentrations, après une période fixe d'exposition, qu'il faut préciser.

concentration inhibitrice (CI p), concentration correspondant à un pourcentage (désigné par *p*) d'effet. C'est une estimation ponctuelle de la concentration de la substance qui inhiberait, selon le pourcentage précisé, une fonction biologique quantifiable, telle que la taille atteinte par le poisson au bout d'une période de croissance. Par exemple, la CI 25 pourrait être la concentration qui, estime-t-on, réduit de 25 % le gain de poids sec du poisson par rapport au poids sec des poissons témoins. La notion est à utiliser dans un essai toxicologique mesurant un effet quantitatif ou un changement de vitesse ou d'intensité, par exemple de la croissance, de la reproduction ou de la respiration. (La concentration efficace médiane [CE 50] ne convient pas à ce type d'essais, puisqu'elle ne vaut que pour les mesures quantiques, c'est-à-dire le nombre d'individus exposés chez qui se manifeste un effet donné.)

concentration létale médiane (CL 50), concentration de substance dans l'eau que l'on estime mortelle pour la moitié des organismes en expérience. La CL 50 et ses limites de confiance à 95 % se calculent habituellement par l'analyse statistique de la mortalité observée à plusieurs concentrations, après une période fixe d'exposition, à préciser (p. ex. CL 50 après 96 h).

concentration sans effet observé (CSEO), concentration maximale d'une substance ne causant aucun effet sublétalement observé et statistiquement significatif chez l'organisme exposé. Par exemple, ce pourrait être la concentration maximale à laquelle la croissance n'a pas diminué significativement par rapport à celle de groupes témoins. Habituellement, elle concerne des effets sublétaux et, sauf indication du contraire, l'effet le plus sensible.

écart significatif minimal (ESM), écart entre les valeurs obtenues à chaque concentration (p. ex. le pourcentage moyen d'embryons non viables ; le pourcentage moyen d'alevins non viables), qui devrait exister avant que l'on puisse conclure qu'il existe un écart significatif entre les groupes. Cette valeur s'obtient au moyen de certains tests statistiques, notamment le test de Dunnett, qui est normalisé.

en conditions statiques, se dit d'un essai toxicologique au cours duquel on ne renouvelle pas les solutions d'essai.

essai toxicologique, opération visant à déterminer l'effet d'une substance sur un groupe d'organismes choisis dans des conditions précises. Appliqué au milieu aquatique, l'essai permet habituellement de mesurer : *a*) la proportion d'organismes touchés (*essai quantique*) ; *b*) le degré de l'effet observé (*essai quantitatif* ou *gradué*) après exposition à des concentrations précises de produit chimique, d'effluent, d'élutriat, de lixiviat ou d'eau réceptrice.

évaluation qualitative des toxiques (EQT), traitement systématique préalable de l'échantillon (p. ex. réglage du pH, filtration ou aération) suivi d'essais toxicologiques. Cette évaluation sert à l'analyse qualitative de l'agent ou des agents à qui sont principalement imputables la toxicité létale ou sublétalement d'un mélange complexe.

léta, qui cause directement la mort. Chez le poisson, la mort est l'interruption de tous les signes visibles de mouvement ou d'activité.

paramètre de mesure, réaction de l'organisme en expérience exprimant l'effet qui est censé marquer la fin de l'essai ; également, la mesure ou la valeur correspondante qui caractérisent les résultats de l'essai (p. ex. la concentration inhibitrice). On dit aussi *paramètre ultime de mesure*.

répétition, chaque enceinte expérimentale renfermant le nombre prescrit d'organismes, exposés soit à une concentration de la substance d'essai, soit à l'eau de dilution servant de témoin. Un essai toxicologique employant cinq concentrations d'essai et un témoin en trois répétitions exigerait 18 enceintes. Pour chaque concentration ou témoin on compterait trois enceintes expérimentales ou répétitions. La répétition est une unité expérimentale indépendante ; c'est pourquoi tout transfert d'organismes ou de solutions d'une répétition à l'autre invalide l'analyse statistique.

subléta, nocif pour le poisson, mais en deçà de la concentration directement mortelle au cours de l'essai.

toxicité, capacité propre d'une substance ou d'une matière de provoquer des effets nocifs, létaux ou sublétaux, chez le poisson ou d'autres organismes.

toxicité chronique, manifestation d'effets à long terme, habituellement reliés à des modifications du métabolisme, de la croissance, de la reproduction ou de la capacité de survie, par exemple. En raison de la longue durée de vie des salmonidés, les essais effectués dans les premiers stades de leur cycle biologique ne permettent pas de mesurer la toxicité chronique, bien que la présente méthode ait pour objet d'estimer (de façon approximative) ce que pourrait être la toxicité chronique sublétale.

Remerciements

La première édition, imprimée en décembre 1992, avait pour auteurs M.R. Gordon (M.R. Gordon & Associates, Ltd., Sechelt [C.-B.]), D.J. McLeay (McLeay Associates Ltd., West Vancouver) et J.B. Sprague (Sprague Associates Ltd., Guelph [Ont.]). Ont notamment contribué à la première édition les réviseurs suivants : W.J. Birge (Université du Kentucky, Lexington) ; K.G. Doe (Environnement Canada, Dartmouth [N.-É.]) ; P.V. Hodson (Université Queens, Kingston [Ont.]) ; T. Kovacs (Institut canadien de recherches sur les pâtes et papiers, Pointe-Claire [Qc] ; D.D. Monteith (BC Research Corporation, Vancouver) ; C. M. Neville (ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale) ; M.D. Paine (EVS Consultants Limited, North Vancouver) ; R.P. Scroggins (Environnement Canada, Ottawa) ; G.A. Sergy (Environnement Canada, Edmonton) ; J.A. Servizi (Pêches et Océans Canada, Cultus Lake [C.-B.] ; J.D. Somers (Alberta Environmental Centre, Vegreville) ; G. van Aggelen (ministère de l'Environnement, des Terres et des Parcs de la Colombie-Britannique, North Vancouver) ; R. Watts (Environnement Canada, North Vancouver)

Cette deuxième édition a été préparée par D.J. McLeay (McLeay Environmental Ltd., Victoria) et J.B. Sprague (Sprague Associates Ltd., Salt Spring Island [C.-B.]). Ont contribué — qu'ils en soient remerciés — à la modification des modes opératoires et des conditions exposés dans le présent rapport : H.C. Bailey (EVS Environment Consultants Ltd., North Vancouver) ; W.J. Birge (Université du Kentucky, Lexington) ; J. Black (EA Engineering, Science & Technology Inc., Sparks [Maryland]) ; E.C. Canaria (EVS Environment Consultants Ltd., North Vancouver) ; P.M. Chapman (EVS Environment Consultants Ltd., North Vancouver) ; M. Fennell (Environnement Canada, North Vancouver) ; S. Gibbons (PAPRICAN, Pointe-Claire) ; K. Holtze (B.A.R. Environmental Inc., Guelph) ; E. Jonczyk (Beak Consultants Ltd., Brampton [Ont.]) ; T. Kovacs et J. Larocque (PAPRICAN, Pointe-Claire) ; L. Novak (B.A.R. Environmental Inc., Guelph) ; J. Pickard (B.C. Research Inc., Vancouver) ; R. Scroggins (Environnement Canada, Gloucester [Ont.]) ; G. van Aggelen (Environnement Canada, North Vancouver) ; R. Watts (Environnement Canada, North Vancouver) ; S. Yee (Environnement Canada, North Vancouver).

Nous sommes particulièrement reconnaissants, pour leur contribution technique, à S. Yee, à M. Fennell et à J. Bruno (Environnement Canada, North Vancouver) pour les essais en laboratoire entrepris pour adapter l'appareillage et améliorer les modes opératoires et les conditions expérimentales (Yee et al., 1996 ; Fennell et al., 1998). Nous remercions sincèrement les chercheurs d'EVS Environment Consultants Ltd. (North Vancouver) pour plusieurs améliorations qu'ils ont apportées aux modes opératoires (v. Canaria et al., 1996) intégrés à la présente méthode. Saluons l'expérience de J. Pickard et de ses collaborateurs à B.C.

Research Inc. (Vancouver), dans la réalisation d'un essai sur des embryons, des alevins et des truitelles arcs-en-ciel et dans la transmission des orientations connexes. W.J. Birge (Université du Kentucky, Lexington) et J. Black (EA Engineering, Science & Technology, Inc., Sparks) ont aussi transmis de nombreuses observations et propositions utiles, de modifications, de nature technique, après la publication de la première édition, qui ont influé sur les modifications évidentes de la présente édition. Nous reconnaissons également l'aide de R. Watts (Environnement Canada, North Vancouver) pour les nouveaux dessins et illustrations de l'incubateur d'embryons et d'alevins ; celle de S. Yee (Environnement Canada, North Vancouver), qui a pris et fourni les photographies de la page couverture. Enfin, nous remercions les membres du Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique (v. annexe A) pour leur appui technique indéfectible.

Section 1

Introduction

1.1 Contexte

Au Canada et ailleurs, on se sert d'essais toxicologiques en milieu aquatique pour mesurer, prévoir et maîtriser le rejet d'une substance ou de mélanges complexes de substances qui pourraient être nocives pour la vie aquatique. Reconnaissant qu'on ne peut pas s'attendre qu'une seule méthode ou un seul organisme réponde aux besoins d'une démarche globale visant la conservation et la protection de l'environnement, le Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (GITA, annexe A) a proposé d'élaborer et de normaliser un ensemble d'essais toxicologiques qui serait généralement acceptable et permettrait de mesurer différents effets toxiques à l'aide d'organismes représentatifs de différents niveaux trophiques et groupes taxonomiques (Sergy, 1987). Pour aider Environnement Canada à satisfaire à ses exigences en matière d'essais (p. ex., EC, 1991), on a choisi de normaliser suffisamment — pour l'utiliser dans les laboratoires régionaux d'Environnement Canada (annexe B) et dans les laboratoires provinciaux et privés — un essai fondé sur le développement, la croissance et la mortalité de salmonidés aux premiers stades de leur existence. Cet essai constitue l'un des quelques essais toxicologiques de base appliqué au milieu aquatique.

Le présent rapport décrit des méthodes et des conditions universelles pour la réalisation d'essais sur des truites arcs-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) aux premiers stades de leur existence. Il présente aussi un

ensemble précis de conditions et de modes opératoires, exigés ou recommandés, pour évaluer, à l'aide du test, différents types de substances (c'est-à-dire des échantillons de produit chimique, d'effluent, d'élutriat, de lixiviat ou d'eau réceptrice). Pour obtenir des orientations sur la mise en œuvre de cette méthode d'essai biologique d'Environnement Canada et d'autres méthodes du Ministère ainsi que sur l'interprétation et l'application des paramètres ultimes de mesure, le lecteur devrait consulter Environnement Canada (1998a).

La figure 1 donne un aperçu général des sujets abordés dans le rapport. Les notes explicatives en bas de page abordent certains détails de méthodologie.

La méthode biologique présentée dans le rapport se fonde en grande partie sur d'autres méthodes élaborées en Amérique du Nord et en Europe et employant des embryons, des alevins et des jeunes (USEPA, 1985a ; Birge *et al.*, 1985 ; Rexrode et Armitage, 1987 ; van Aggelen, 1988 ; Birge et Black, 1990 ; ASTM, 1991a ; Hodson *et al.*, 1991 ; Paine *et al.*, 1991 ; OECD, 1992a, b et c ; Neville, 1995a et b ; OECD, 1996 et 1997). Elle a été mise au point après un examen des écarts signalés dans les modes opératoires des méthodes en vigueur (annexe C) et dans d'autres rapports et publications connexes.

Le présent rapport remplace la méthode intitulée *Méthode d'essai biologique : essais de toxicité sur des salmonidés aux premiers stades de leur cycle biologique (truite arc-*

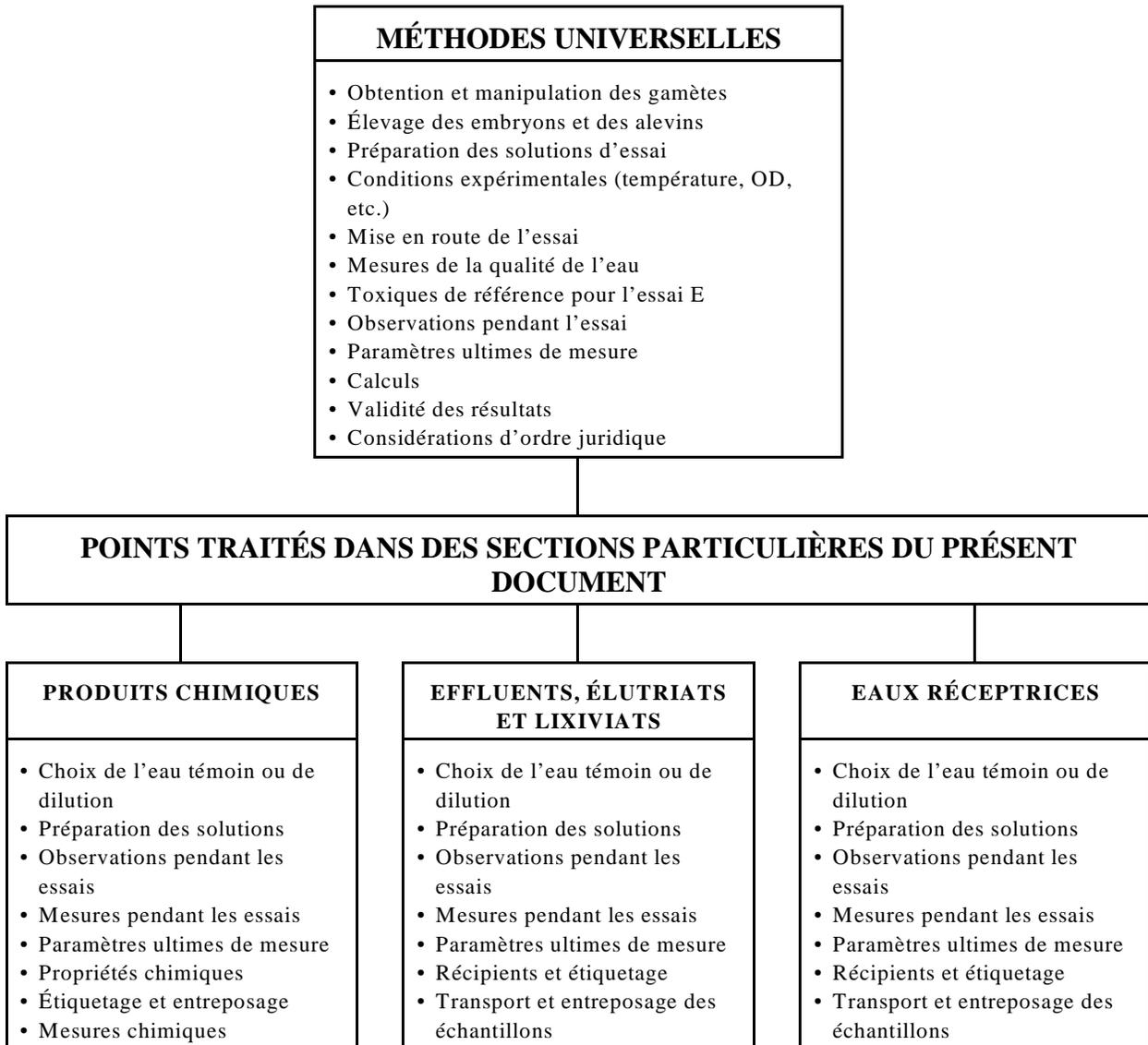


Figure 1. — Points à considérer dans les préparatifs et l'exécution d'essais toxicologiques de divers types de substances aux premiers stades de développement de la truite arc-en-ciel

en-ciel, saumon coho ou saumon de l'Atlantique), publiée par Environnement Canada en 1992 (EC, 1992a). Depuis, on a simplifié, clarifié ou autrement amélioré certains modes opératoires et conditions de l'essai ou préalables à ce dernier, à la lumière : a) de l'expérience d'un certain nombre de laboratoires canadiens exécutant les essais portant sur les embryons (essais E) ou sur les embryons et les alevins (essais EA), pour satisfaire aux exigences réglementaires concernant la surveillance des effets sur l'environnement (EC, 1991) ; b) d'études en conditions contrôlées, visant à simplifier ou à améliorer les méthodes (Canaria *et al.*, 1996 ; Yee *et al.*, 1996 ; Fennell *et al.*, 1998). Le rapport présente les améliorations apportées aux modes opératoires, à la conception des systèmes, au traitement statistique des données ainsi que des orientations plus précises et plus détaillées sur l'exécution des essais.

On décrit dans le rapport trois options : un essai qui se prête à la surveillance fréquente ou suivie et qui emploie des embryons (E) ; un essai permettant de mesurer les effets des toxiques sur de multiples stades de développement de l'embryon et de l'alevin (EA) ; un essai, pour les études plus concluantes, employant les stades de l'embryon, de l'alevin et de la truitelle (EAT). Les trois essais débutent au commencement du développement des embryons et ils mesurent le développement et la survie des premiers stades de vie de l'espèce. L'essai E prend fin sept jours après la fécondation. L'essai EA se termine pendant le stade de l'alevin, lorsque l'on constate dans le groupe témoin un taux de réussite de l'éclosion de 50 %, sans qu'il soit nécessaire d'alimenter les alevins. L'essai EAT prend fin après 30 jours d'exposition des truitelles, que l'on nourrit.

On peut se servir de n'importe laquelle de ces options pour évaluer des échantillons de produit chimique, d'effluent, d'éluat, de lixiviat ou d'eau réceptrice. Le choix de l'essai qui convient le mieux dépend des objectifs de l'essai et de la nature de la substance (v. § 4.3.1, 5.1, 6.1 et 7.1).

En exposant ces modes opératoires, nous nous sommes efforcés de trouver le juste milieu entre les considérations scientifiques et pratiques ainsi que les coûts, tout en nous assurant que les résultats seront assez justes et assez précis pour la plupart des situations auxquelles on les appliquera. Nous posons que l'utilisateur possède une certaine connaissance des essais toxicologiques appliqués au milieu aquatique. Nous ne fournissons pas les explications qui pourraient être exigées dans un protocole réglementaire, bien que le présent document se veuille un guide utile à cette application et à d'autres.

1.2 *Emploi antérieur de l'essai*

Les effets toxiques chroniques sur le poisson ont été étudiés à l'aide d'essais portant sur la totalité (de l'œuf à l'œuf) ou une partie (de l'œuf au jeune) du cycle, selon la nature des travaux et les espèces de poissons utilisés. Dans le cas des salmonidés, il serait en grande partie impraticable d'étudier le cycle complet, parce que ces poissons n'atteignent la maturité qu'après deux à cinq ans. Cependant, au cours des 30 dernières années, les résultats d'essais ayant porté sur la totalité ou une partie du cycle de plusieurs espèces de poissons et ayant employé diverses substances ont montré que les premiers stades (c'est-à-dire l'embryon, l'alevin et le tout jeune poisson) peuvent être aussi sensibles aux contaminants du milieu aquatique, voire davantage, que les adultes

(McKim, 1977 et 1985 ; Hodson et Blunt, 1981 ; Woltering, 1984). Grâce à cet acquis, on a mis au point un certain nombre de modes opératoires pour mesurer les effets toxiques subis par les jeunes salmonidés (Birge *et al.*, 1985 ; van Aggelen, 1988 ; Birge et Black, 1990 ; Hodson *et al.*, 1991 ; Paine *et al.*, 1991 ; Neville, 1995a et b). Ces modes opératoires reposent sur l'hypothèse que les concentrations les plus fortes qui n'exercent pas d'effets sublétaux sur les premiers stades d'un organisme équivaldront, approximativement, aux concentrations chroniquement inoffensives pour les espèces éprouvées de salmonidés¹.

Dans les essais sur les premiers stades de la truite arc-en-ciel ou d'autres salmonidés, dans un dessein de réglementation et de recherche, on fait durer l'exposition aux toxiques du début du développement embryonnaire et au commencement de la nage libre des truitelles (jeunes) ou après plusieurs semaines d'alimentation externe (Rexrode et Armitage, 1987 ; ASTM, 1991a ; Hodson *et al.*, 1991 ; OECD, 1992a et b ; OECD, 1996). La sensibilité des différents stades à différents toxiques peut varier (Mayer *et al.*, 1986 ; Kristensen,

1990) ; c'est pourquoi il est préférable de surveiller les effets d'une exposition continue pendant plusieurs des premiers stades et au cours de la transition d'un stade à l'autre pour obtenir une bonne approximation d'une concentration sans effets sublétaux. Selon l'espèce, la température et la durée d'observation des alevins avant la fin de l'essai, la durée d'un essai EA sur des salmonidés pourrait être d'à peine une trentaine de jours (Fennell *et al.*, 1998) et atteindre jusqu'à 80 jours environ. La durée d'un essai EAT pourrait durer aussi entre 70 jours à peine et 120 jours et davantage, selon l'espèce, la température et la durée de la surveillance de la survie et de la croissance des truitelles. Dans tous les cas, ces essais employant les premiers stades de la truite peuvent prendre beaucoup moins de temps et engager beaucoup moins de dépenses que les essais sur tout le cycle biologique de salmonidés.

On a mis au point divers essais de courte durée, de 7 à 28 j, sur embryons ou alevins de truite arc-en-ciel (Birge *et al.*, 1985 ; Birge et Black, 1990 ; Paine *et al.*, 1991 ; OECD, 1992a et 1996 ; Neville, 1995a et b), ou des truitelles (OECD, 1992c et 1997). Ces essais, axés sur au moins une période délicate de transition dans le développement (p. ex. le développement embryonnaire, celui des alevins et la résorption du sac vitellin ou la quête de nourriture et la croissance des jeunes poissons), ont été normalisés pour n'employer que des truites arcs-en-ciel. Ces méthodes relativement nouvelles sont prometteuses², mais, dans certains cas, il

1. Les résultats d'essais toxicologiques sur les premiers stades du développement donnent une estimation généralement utile des résultats d'essais comparables sur tout le cycle, chez la même espèce, mais ils sous-estiment parfois la toxicité chronique (ASTM, 1991a). Suter *et al.* (1987) ont signalé que la fécondité (c'est-à-dire le nombre d'œufs viables produits par chaque femelle survivante au début de la reproduction) est habituellement le paramètre le plus sensible de l'essai sur tout le cycle biologique, la croissance des alevins et leur survie étant moins sensibles et étant à peu près aussi sensibles que la mortalité des adultes. Birge *et al.* (1985) ont montré que, pour les substances évaluées, les essais à court terme sur les embryons et les alevins de truite arc-en-ciel étaient plus sensibles que les essais semblables employant des têtes-de-boule ou des crapets à oreilles bleues.

2. Les essais de courte durée employant des jeunes embryons de truites arcs-en-ciel (Birge *et al.*, 1985) ainsi que de vieux alevins et de jeunes truitelles (Neville, 1995a et b) se sont révélés plus sensibles que les essais semblables sur le tête-de-boule. L'essai E que nous exposons s'inspire de l'essai employant de

pourrait être difficile de définir ou de mesurer les paramètres ultimes avec confiance, ou encore, faudrait-il des compétences techniques spéciales pour obtenir des résultats reproductibles. Avant d'appliquer ces essais, il est indiqué de réaliser des essais préliminaires afin de déterminer la reproductibilité des résultats et d'en comparer la sensibilité à celle de résultats d'essais plus classiques sur les premiers stades de développement de salmonidés (Rexrode et Armitage, 1987 ; ASTM, 1991a ; OECD, 1992b).

Le but du rapport est de fournir une méthode canadienne normalisée d'estimation de la toxicité de diverses substances pour la truite arc-en-ciel, en eau douce, après exposition d'au moins un des premiers stades du cycle de cette espèce, par l'application de l'une des trois options exposées dans ces pages (c'est-à-dire E, EA ou EAT). Les modes opératoires des essais toxicologiques employant les premiers stades des salmonidés, qui se trouvent dans les recueils canadiens, américains et internationaux, varient quant à l'espèce recommandée pour l'essai, à la durée de l'exposition, aux régimes de température, à la substance examinée, aux conditions et aux systèmes expérimentaux, aux observations et aux paramètres biologiques ultimes, au plan d'expérience statistique et aux critères de validité (annexe C). Nous donnons des orientations pour évaluer la toxicité sublétales d'échantillons de produit chimique,

jeunes embryons de truite arc-en-ciel (Birge *et al.*, 1995 ; Birge et Black, 1990 ; Birge, 1992). La version préliminaire d'une méthode d'une durée de 28 jours pour la mesure de la croissance et de la mortalité de jeunes alevins de truite arc-en-ciel ou d'autres espèces de poissons a été rédigée (OECD, 1992c) et révisée en vue de sa publication (OECD, 1997). Cette méthode est prometteuse comme mode opératoire abrégé de la mesure de la toxicité.

d'effluent, de lixiviat, d'élutriat ou d'eau réceptrice et les motifs du choix de certaines façons de procéder. Les trois options susmentionnées doivent employer des truites arcs-en-ciel acclimatées à l'eau douce, l'eau douce servant d'eau de dilution et d'eau témoin, et elles doivent s'appliquer à des substances comprenant des eaux usées essentiellement constituées d'eau douce (c'est-à-dire d'une salinité d'au plus 10 g/kg) ou des eaux salées mais destinées à être rejetées en eau douce. L'application des options peut varier, mais elle englobe les cas où il s'agit d'étudier l'incidence réelle ou potentielle de substances sur le milieu dulcicole. D'autres essais, employant d'autres espèces acclimatées à l'eau de mer, peuvent servir à évaluer les répercussions réelles ou potentielles de substances dans les milieux estuariens ou marins ou à évaluer les eaux usées d'une salinité supérieure à 10 g/kg, destinées à être rejetées en milieu estuarien ou marin.

1.3 Salmonidés étudiés et recommandés

Au Canada et aux États-Unis, l'élevage et la manipulation de nombreuses espèces de salmonidés sont pratique courante. Les scientifiques spécialistes de la pêche, les spécialistes des écloséries, les ichtyologistes et les chercheurs les maîtrisent bien. On a également examiné le rendement et la sensibilité de plusieurs salmonidés, à la faveur d'une large gamme d'études toxicologiques menées en laboratoire. Chez les premiers stades du développement, on a principalement utilisé la truite arc-en-ciel, l'omble de fontaine, le saumon du Pacifique et celui de l'Atlantique (McKim et Benoit, 1971 ; Benoit, 1976 ; Benoit *et al.*, 1976 ; Davies *et al.*, 1976 ; Burkhalter et Kaya, 1977 ; Brenner et Cooper, 1978 ; Servizi et

Martens, 1978 ; Daye et Garside, 1979 ; McLeay et Gordon, 1980 ; Martens *et al.*, 1980 ; Helder, 1981 ; Hodson et Blunt, 1981 ; Birge *et al.*, 1985 ; NCASI, 1985 ; Peterson *et al.*, 1988 ; Hodson *et al.*, 1991 ; Neville, 1995a et b).

La truite arc-en-ciel est l'organisme dont l'emploi est recommandé dans chacune des trois options décrites dans le rapport. L'annexe D donne des renseignements sur la répartition, le cycle évolutif et l'élevage de cette espèce. Les options décrites pourraient aussi s'appliquer à la truite dite « *steelhead* » (sous-espèce anadrome d'*Oncorhynchus mykiss*), vraisemblablement sans nécessiter de modifications aux modes opératoires. On pourrait également utiliser d'autres salmonidés (p. ex. la truite fardée, l'omble de fontaine, la truite brune, les saumons quinnat, kéta, coho ou de l'Atlantique, l'ombre arctique ou le corégone) dans n'importe laquelle de ces trois options, mais on pourrait devoir modifier certains modes opératoires ou conditions (p. ex. la température et la durée de l'essai). Il est conseillé aux chercheurs voulant utiliser une

autre espèce qu'*O. mykiss* d'examiner soigneusement le régime de température que l'on sait être ou qui serait susceptible d'être compatible avec le début du développement de l'espèce en question, et de déterminer, à l'aide d'au moins un essai préliminaire (avec de l'eau témoin ou de dilution) le régime convenable de température et la durée correspondante de l'essai, quelle que soit l'option utilisée, à l'aide de la substance d'essai. Il faudrait notamment montrer, au moyen d'une autre espèce, qu'il est possible de satisfaire aux critères de validité décrits dans le présent rapport à l'égard de la truite arc-en-ciel (v. § 4.6), avant d'utiliser cette autre espèce à des fins toxicologiques dans n'importe laquelle des trois options décrites (modifiées ou non). En outre, tout procès-verbal d'un essai désignant l'une des options décrites comme la méthode utilisée doit préciser les noms vernaculaire et scientifique de l'organisme d'essai de même que toute modification apportée aux conditions et aux modes opératoires définitifs des essais (ou préalables) décrits dans le présent rapport (v. section 8).

Section 2

Organisme d'essai

2.1 Espèce et stades

Comme source des gamètes à utiliser dans les trois options (E, EA ou EAT) décrites plus loin (v. § 1.3 et 4.3.1), on recommande comme organisme d'essai la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). La « *steelhead* » (sous-espèce anadrome d'*O. mykiss*) peut aussi servir, si elle est accessible.

La figure 2 montre l'aspect général des salmonidés aux divers stades de leur développement. L'essai vise à déterminer les effets subis par la truite arc-en-ciel dès le début du développement embryonnaire jusqu'à une étape particulière de ce dernier, selon l'option choisie (v. § 4.3.1). Comme l'exposition au toxique commence immédiatement après la fécondation, il faut procéder à la fécondation artificielle des œufs avec de la laitance, en laboratoire (v. les marches à suivre recommandées dans l'annexe D). La durée du développement des embryons et des alevins varie selon la température de l'eau (v. annexe D).

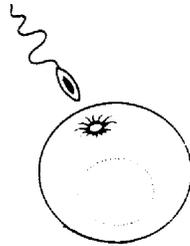
Trois périodes charnières du début du développement de la truite arc-en-ciel doivent faire partie intégrante de l'option retenue. La première survient à la transformation des œufs fécondés en *embryons*, qui se développent à l'intérieur de la membrane de l'œuf. Rapidement, cette membrane devient assez imperméable, par le durcissement à l'eau, consécutif à la fécondation. Chez l'embryon, la division cellulaire est rapide, et cette étape sert à l'option expérimentale la plus courte (c'est-à-dire l'option E [pour embryon]). La

deuxième transition coïncide avec l'éclosion, alors que l'embryon devient *alevin*, doté d'une vésicule vitelline. Cette étape fait partie de l'option dite EA (pour embryon et alevin). La troisième transition est le passage de l'alevin à la *truitelle*, quand l'alevin a fini de résorber sa vésicule et se nourrit d'aliments qu'il capture (alimentation externe). L'option EAT (pour embryon, alevin, truitelle) englobe cette métamorphose, plus une période de 30 jours d'exposition de la truitelle. On trouvera dans le § 4.3.6 d'autres détails sur les stades de développement et leur synchronisation avec les trois options. L'annexe D donne d'autres renseignements sur l'intervalle des tailles, les tolérances de température et le rythme de développement en fonction de la température.

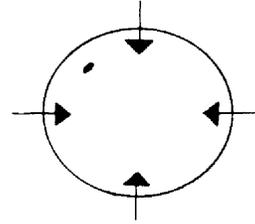
2.2 Origine des gamètes ou des géniteurs

Les gamètes ou les géniteurs devraient provenir d'une même population et d'une même source de truites arcs-en-ciel. Les meilleures sources sont susceptibles d'être les écloséries et les stations de recherche de l'État et les piscicultures privées, réputées exemptes de poissons malades. Dans un souci de simplification, il est préférable d'obtenir des gamètes, puisque la manutention, le transport, la conservation et l'évacuation des œufs et de la laitance exigent des installations supplémentaires et un personnel expérimenté. La fertilité des œufs subit l'influence de la maturité des gonades de la femelle, et il faudrait trouver le

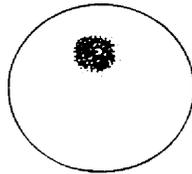
1. Fécondation



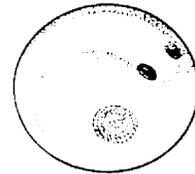
2. Gonflement de l'œuf, du fait de l'eau absorbée



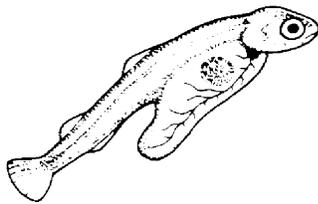
3. Début de la division cellulaire



4. Stade de l'œuf embryonné



5. Alevin



6. Jeune poisson (truitelle ou saumoneau)

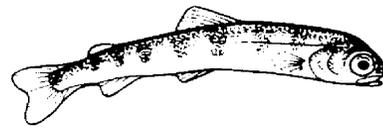


Figure 2. — Aspect général des salmonidés aux premiers stades de leur développement
(d'après Sedgewick, 1982)

moment optimal de l'évacuation des œufs (annexe D) pour assurer à la fécondation un bon taux de réussite.

L'ensemble des œufs qui serviront à l'épreuve toxicologique doit provenir d'au moins quatre femelles (v. annexe D, y compris la note 46). En outre, la laitance doit provenir d'au moins trois mâles.

Il faut, préalablement à la fécondation, contrôler la mobilité des spermatozoïdes dans la laitance, afin d'améliorer la probabilité de fécondation. La méthode suivante (Novak, 1996) s'est révélée efficace. Nous la recommandons. Comme l'expérience a montré que la laitance de 25 à 50 % des mâles peut être inactive, il faut prélever des échantillons sur au moins trois sujets ayant atteint la maturité sexuelle et les conserver dans des fioles distinctes (Novak, 1996 ; Fennell *et al.*, 1998). À l'installation expérimentale, on doit placer une mince couche de laitance de chaque fiole sur une lamelle de verre sèche et l'examiner immédiatement sous le microscope composé, à environ 100 de grossissement. Le sperme devrait paraître inactif. On ajoute ensuite un peu d'eau fraîche (ou de liquide ovarien), que l'on mêle rapidement à la laitance sur la lamelle. Les spermatozoïdes devraient s'agiter pendant 20 à 30 secondes, puis redevenir inactif après 60 secondes. Il ne faut

pas utiliser pour la fécondation les fioles renfermant du sperme inactif. Si elles contiennent toutes du sperme inactif, il faut obtenir des échantillons de laitance fraîche.

Si l'on obtient des géniteurs, on recommande un dépistage des maladies bactériennes avant de procéder à l'évacuation des gamètes (v. annexe D). Il faudrait faire approuver, le cas échéant, par les autorités provinciales ou régionales, l'obtention, le transport et le transfert de gamètes ou de géniteurs. La province peut exiger un permis pour importer le poisson ou ses gamètes, que l'espèce y soit indigène ou non. La circulation de stocks de poissons pourrait aussi être régie par un comité fédéral-provincial des introductions et transplantations d'espèces. Le bureau régional de la Protection de l'environnement (annexe B) peut donner des conseils sur les sources d'approvisionnement en poissons et sur la façon de communiquer avec le comité ou les autorités provinciales. Dans les régions dont *O. mykiss* n'est pas une espèce indigène, par exemple le nord de certaines provinces ou le Yukon et les Territoires du Nord-Ouest (v. la répartition de l'espèce dans l'annexe D), il faut demander un permis au comité susmentionné, à l'agence provinciale compétente ou au directeur général régional du ministère des Pêches et des Océans (MPO), selon les marches à suivre en vigueur à chaque endroit.

Section 3

Système expérimental

3.1 Installations, matériaux

L'essai devrait se dérouler dans une installation isolée des causes générales de perturbation du laboratoire. Faute d'une pièce isolée, le secteur affecté à l'essai devrait être entouré d'un rideau opaque (p. ex. de plastique noir) afin de réduire au minimum le stress chez les embryons, les alevins ou les truitelles. La poussière et les émanations devraient être réduites au minimum.

On doit pouvoir maintenir une température moyenne journalière de $14 \pm 1,0$ °C dans toutes les solutions d'essai (v. § 4.3.3). Pour cela, on pourrait devoir assurer le chauffage ou le refroidissement, sur canalisation, de l'eau témoin ou de l'eau de dilution, et on pourrait avoir besoin d'un vivier expérimental thermostaté, avec programmation de la photopériode, et de divers types d'équipement comme des appareils portatifs de chauffage ou de refroidissement de l'eau.

Le laboratoire doit être doté des instruments de mesure des variables fondamentales de la qualité de l'eau (température, conductivité, OD, pH) et il devrait être prêt pour l'analyse rapide et fidèle d'autres variables telles que la dureté, l'alcalinité, l'ammoniacque et le chlore résiduel.

Les matériaux ou l'équipement qui pourraient entrer en contact avec les substances ou les solutions d'essai ou l'eau témoin ou de dilution ne doivent aucunement renfermer de substances qui peuvent être

entraînées par lixiviation dans l'échantillon, les solutions ou l'eau à des concentrations susceptibles de provoquer des effets toxiques. Il faudrait utiliser des matériaux tels que le verre borosilicaté (p. ex. PyrexZ), l'acier inoxydable, la porcelaine, le nylon, le polystyrène haute densité ou les plastiques à base d'hydrocarbures perfluorés. On peut utiliser également d'autres plastiques non toxiques tels que le polypropylène ou le polyéthylène, mais, on ne devrait les réutiliser qu'après nettoyage à fond (p. ex. lavage à un détersif non phosphaté, puis trempage dans l'acide et plusieurs rinçages à l'eau désionisée) pour réduire au minimum le risque de libération ultérieure de toxiques adsorbés. Pour les essais employant des produits chimiques (v. section 5), on recommande le verre pour les récipients et l'appareillage entrant en contact avec les solutions d'essai, avant et durant ce dernier.

3.2 Éclairage

L'essai devrait se dérouler à l'obscurité jusqu'à la première semaine après l'éclosion des embryons³. Pendant le reste de l'essai, il faudrait un éclairage tamisé. L'intensité lumineuse à la surface de l'eau devrait se

3. On peut se servir d'un éclairage incandescent faible (c'est-à-dire moins de 200 lux) sur de courtes périodes, pendant les observations et l'entretien (R. Watts, Centre des sciences de l'environnement du Pacifique, North Vancouver, communication personnelle). On recommande aussi l'éclairage incandescent rouge (de chambre noire) [G. van Aggelen, Centre des sciences environnementales du Pacifique, North Vancouver, communication personnelle].

situer dans la fourchette de 100 à 500 lux. Selon les exigences et l'objectif de l'essai, l'éclairage, vertical et en spectre continu, devrait provenir de luminaires fluorescents⁴. La photopériode devrait normalement être de 16 ± 1 h. On recommande une transition de 15 à 30 min entre la clarté et l'obscurité⁵.

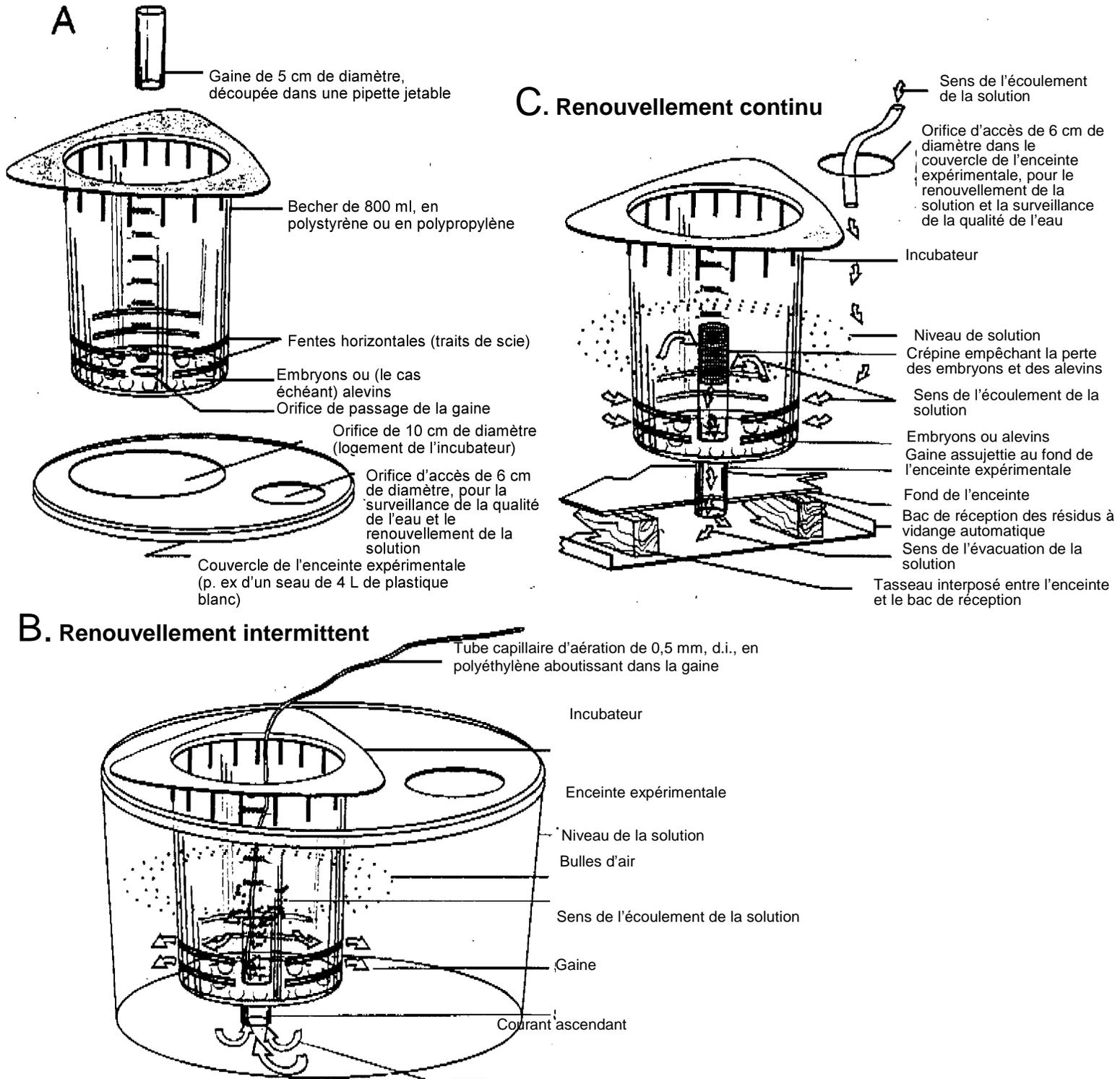
3.3 Appareillage

En 1996, on a remis sur la planche à dessin l'appareillage représentée dans Environnement Canada (1992a), qui avait servi dans un certain nombre d'essais toxicologiques employant des embryons ou des alevins de salmonidés (McLeay et Gordon, 1980 ; Martens *et al.*, 1980 ; Hodson *et al.*, 1991). Le nouvel appareillage s'est révélé efficace quand on l'a éprouvé (Yee *et al.*, 1996). L'incubateur et

l'appareillage connexe que l'on recommande désormais (figure 3) se montent facilement et à peu de frais et ils permettent l'aération selon un débit lent et/ou la circulation ininterrompue des solutions d'essai à proximité des embryons ou des alevins ainsi que le renouvellement facile des solutions avec le minimum de dérangement pour le milieu. En outre, l'incubateur permet aux embryons et aux alevins de rester immergés dans la solution d'essai au cours de son renouvellement. L'incubateur est constitué d'un becher de plastique de 800 mL (au moins) Tri-PourZ[®], de forme légèrement tronconique. Contrairement au modèle antérieur, qui exigeait d'en remplacer le fond par un grillage de plastique (EC, 1992a), le fond du nouveau becher reste intact, et on découpe, dans la paroi, près du fond, une série de fentes horizontales, pour permettre la circulation des solutions d'essai dans le becher (Yee *et al.*, 1996 ; fig. 3A). On perce un orifice circulaire dans le fond du becher, au centre, dans lequel on insère par pression un tube, amovible, de 5 cm de longueur, découpé dans une pipette jaugée de polystyrène jetable de 10 mL. Ce tube fera office de gaine. On peut facilement suspendre l'incubateur dans une enceinte expérimentale en l'insérant dans un orifice de 10 cm de diamètre découpé dans le couvercle de l'enceinte (p. ex. le couvercle de plastique d'un seau de plastique blanc de 4 L). On peut découper dans le couvercle un second orifice, plus étroit (environ 6 cm de diamètre ; Yee *et al.*, 1996) pour permettre la surveillance de la qualité de l'eau au cours de l'essai (§ 4.3). Le volume de solution gardé dans chaque enceinte ne devrait pas être déterminé de façon arbitraire, mais il devrait découler de l'examen du volume de solution d'essai fraîche à fournir chaque jour

4. Lampes fluorescentes ou équivalentes, donnant un éclairage en spectre continu, avec apport, si on le souhaite, de la lumière naturelle du jour. Cet éclairage simule la lumière naturelle dans la gamme du visible. Cependant, les luminaires en spectre continu n'émettent pas dans l'ultraviolet (UV-B) à une intensité qui approche de celle de l'éclairage naturel, et la toxicité de certains effluents et de certaines substances chimiques peut être modifiée de façon marquée par les réactions de photolyse provoquées par le rayonnement UV-B. Pour certains essais (p. ex. ceux dans lesquels on se préoccupe de la photo-activation ou de la photodégradation des toxiques par les UV), on peut choisir des luminaires dotés de qualités spectrales particulières (p. ex. les lampes à arc à vapeur de mercure à haute pression). On trouve à cet égard des orientations utiles dans ASTM (1996).

5. On recommande une période de transition qui évoque l'aube ou le crépuscule parce que les changements brusques d'intensité de la lumière provoquent un effet de surprise et du stress chez le poisson. Pour augmenter ou diminuer de façon graduelle l'intensité de l'éclairage fluorescent, il existe des gradateurs automatisés, mais ils sont coûteux. On peut aussi utiliser une source secondaire de lumière incandescente, actionnée par minuterie, et un rhéostat automatisé pour assurer la période de transition.



- A. Vue éclatée de l'incubateur modifié et des pièces connexes, y compris des fentes horizontales dans sa paroi.
 B. Incubateur suspendu dans l'enceinte expérimentale et les trajets de l'air et de l'eau (courant ascendant).
 C. Incubateur suspendu dans l'enceinte expérimentale, non aéré, avec vue de la gaine d'évacuation et du courant créé par la circulation de la solution.

Figure 3. — Montages recommandés pour le renouvellement intermittent ou continu des solutions d'essai durant l'incubation des embryons ou des alevins

(§ 4.3.2) tout au long de la période d'exposition des embryons ou des alevins. On renouvelle journallement (ou plus souvent) chaque solution d'essai, par aspiration ou siphonnement d'environ 80 % de la vieille solution et par son remplacement immédiat par une solution fraîche, de même titre (c'est-à-dire essai à renouvellement intermittent) ou par l'adjonction continue d'une solution fraîche à l'enceinte (c'est-à-dire à renouvellement continu [§ 4.3.2]).

L'enceinte expérimentale devrait pouvoir s'adapter, selon leurs exigences et leurs objectifs, aux essais avec renouvellement intermittent ou continu⁶. On recommande pour les essais avec renouvellement intermittent (§ 4.3.2) le montage expérimental montré dans la figure 3B. Dans ce montage, on fait barboter l'air filtré, exempt d'huile, qui parcourt une longueur convenable (p. ex. 60 cm) de tube capillaire de polyéthylène de 0,5 mm, d.i., inséré dans la gaine centrale émergeant du fond de l'incubateur (fig. 3B)⁷. Ce système

6. Avec de nombreux types de substances, l'essai avec renouvellement des solutions à toutes les 12 ou 24 heures, lorsqu'il est bien exécuté, est aussi sensible et précis que l'essai avec renouvellement continu (Sprague, 1973). Il pourrait aussi être souhaitable ou nécessaire quand on s'intéresse aux produits de dégradation de la substance d'essai. Par ailleurs, une forte DCO ou DBO, ou la forte volatilité ou instabilité de certaines substances peuvent imposer le renouvellement continu. Ce dernier est également nécessaire si l'incubation des embryons ou des alevins doit se faire sans aération des solutions d'essai, afin d'assurer un échange continu de solution dans l'incubateur.

7. On peut rapidement monter un système simple et pratique qui permet l'aération simultanée de plusieurs incubateurs, en insérant trois ou quatre longueurs de tube capillaire de 0,5 mm, d.i., dans une longueur (p. ex. 40 cm) de tube d'aération ordinaire pour aquarium. On peut se servir de silicone translucide pour boucher le joint et empêcher les fuites d'air (Yee

d'aération qui peut aussi se prêter aux essais à renouvellement continu, débite un courant ininterrompu d'eau aérée aux embryons ou aux alevins.

Pour les essais à renouvellement continu (v. § 4.3.2), le montage de la figure 3C est recommandé. On peut l'utiliser avec ou sans aération^{6,8}. Les embryons ou alevins baignent dans un courant continu de solution fraîche traversant l'enceinte expérimentale (fig. 3C). En s'inspirant du montage pour l'essai en conditions statiques montré à la figure 3C, on suspend l'incubateur à une hauteur, autour de la gaine assujettie qui en traverse le centre et le fond de l'enceinte expérimentale. À l'extrémité supérieure de la gaine, on fixe une crépine de plastique pour retenir les embryons ou les alevins.

Qu'un ou plusieurs incubateurs y soient suspendus, chaque enceinte expérimentale, constitue une répétition. Pour chaque concentration d'essai ou pour chaque témoin, on doit compter au moins trois

et al., 1996). D'autres dispositifs, par exemple un tube au bout duquel on fixe un cône d'Eppendorf, permettent aussi de produire de petites bulles et, ainsi, d'assurer un lent débit d'aération au travers d'un orifice de petit diamètre. On peut aussi se servir de pipettes Pasteur jetables ou d'autres dispositifs d'aération utilisés ordinairement pour les essais de détermination de la létalité aiguë chez le poisson (p. ex. EC, 1990b), si le volume des solutions d'essai est d'au moins 6 L.

8. L'aération peut débarrasser la solution de ses constituants volatils ou en accélérer l'oxydation et la dégradation en d'autres substances. Une aération à faible débit (§ 4.3.4) pourrait être souhaitable ou même nécessaire au cours d'un essai à renouvellement continu, pour maintenir une concentration convenable d'OD lorsque la DCO ou la DBO de la substance est particulièrement forte. Si l'aération doit être assurée à l'aide d'un montage pour renouvellement continu (p. ex. fig. 3C), l'extrémité du tube d'aération devrait plonger dans la solution d'essai, à l'extérieur de la gaine.

enceintes expérimentales séparées, assurant une véritable répétition de conditions, ce qui permet le calcul convenable de l'erreur expérimentale (v. § 4.1 et 4.5). S'il faut vérifier des hypothèses, par exemple estimer le rapport CSEO/CEMO, on devrait utiliser quatre enceintes expérimentales distinctes ; c'est là le minimum exigé s'il fallait utiliser des tests statistiques non paramétriques.

On peut utiliser un autre type d'enceinte expérimentale (p. ex. Canaria *et al.*, 1996), à la condition d'atteindre les objectifs de l'essai et de respecter les critères de validité (§ 4.6). Cependant, il est recommandé d'utiliser l'appareillage représenté à la figure 3, pour l'incubation des embryons et des alevins, dans le souci d'une normalisation plus poussée des conditions d'incubation.

3.4 Eau témoin et dilution

Selon la nature de la substance d'essai et l'objectif de l'essai (sections 5 à 7), l'eau témoin ou l'eau de dilution peut être de l'eau souterraine ou de surface (d'un cours d'eau ou d'un lac) « non contaminée » ; de l'eau reconstituée, du pH et de la dureté voulus (p. ex. simulant ceux de l'eau réceptrice) ; un échantillon d'eau réceptrice prélevé en amont de la source de contamination ou à proximité, mais à l'abri de son influence ; ou de l'eau déchlorée de la municipalité⁹.

9. Si l'on doit utiliser l'eau potable de la municipalité pour l'élevage du poisson et comme eau témoin ou de dilution, on doit, au moyen d'une déchloration efficace, débarrasser l'eau de toute concentration nocive de chlore. Il est difficile de supprimer les dernières traces de chlore résiduel et de substances organochlorées, qui pourraient être toxiques pour le poisson au cours de son développement. L'aération vigoureuse de l'eau, puis un passage sur charbon actif (charbon d'os) peuvent éliminer une partie du chlore

On devrait avoir montré que l'eau d'alimentation pourvoit de façon constante et fiable à la santé, à la survie et à la croissance des organismes en expérience. On devrait contrôler et évaluer aussi souvent que nécessaire les variables telles que la teneur en chlore résiduel (si on utilise l'eau de la municipalité), le pH, la dureté, l'alcalinité, la teneur en carbone organique total, la conductivité, la teneur en matières en suspension, en OD, en gaz totaux en dissolution, la DCO, la température, la teneur en azote ammoniacal, les nitrites, les métaux et les pesticides, aussi souvent que cela est nécessaire pour étayer la qualité de l'eau (p. ex. mensuellement ou plus souvent encore si on soupçonne ou on constate une dégradation de la qualité de l'eau) [v. tableau 1]. Les conditions du prélèvement, du transport et de l'entreposage des échantillons d'eau réceptrice, si cette dernière sert d'eau témoin et d'eau de dilution, devraient être conformes à celles que l'on décrit au § 6.2.

Si on utilise de l'eau de surface comme eau témoin ou eau de dilution, on devrait la filtrer et/ou la stériliser. Convendraient à cette fin un filtre à sable classique ou un filtre commercial sur canalisation. On peut

gazeux volatil, tandis que l'exposition aux UV (Armstrong et Scott, 1974) peut, ensuite, éliminer la plus grande partie des composés organochlorés et de la chloramine résiduels. Le séjour de l'eau dans des bassins de rétention aérés pourrait aussi aider. On ne recommande pas l'addition de thiosulfate ou d'autres substances chimiques à l'eau de dilution pour supprimer le chlore résiduel. La valeur cible du chlore résiduel total, recommandée pour la protection de la vie dulcicole, est de 0,002 mg/L, au plus (CCREM, 1987). Au-dessus de cette concentration, la toxicité du chlore risque d'interagir avec celle du composé d'essai (Brungs, 1973 ; NAS/NAE, 1974). Outre le dosage du chlore, la surveillance de la production d'œufs et de la survie des poissons permet de déterminer si la qualité de l'eau est suffisante.

filtrer les petites quantités d'eau à l'aide d'un filet à mailles serrées ($\leq 60 \mu\text{m}$). La stérilisation aux UV est recommandée pour réduire le risque d'introduction de pathogènes dans le laboratoire et les viviers.

L'eau doit être préalablement réglée à la température exigée pour les essais (v. § 4.3.3). La pression totale de gaz de cette eau ne devrait pas

Tableau 1. — Recommandations relatives à la qualité de l'eau témoin ou de dilution^a

Variable	Limites recommandées d'exposition
pH	6,5 à 8,5 (7,5 à 8,0 souhaitable)
Dureté	15 à 150 mg de CaCO_3/L
Alcalinité	20 à 200 mg de CaCO_3/L
Aluminium	< 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ (à $\text{pH} \leq 6,5$) < 0,1 mg/L (à $\text{pH} > 6,5$)
Ammoniac (non ionisé)	< 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ (de préférence non décelable)
Cadmium	< 0,3 $\mu\text{g}/\text{L}$ (dans l'eau douce) < 0,5 à 0,75 $\mu\text{g}/\text{L}$ (dans l'eau dure)
Chlore	< 2 $\mu\text{g}/\text{L}$
Cuivre	< 6 $\mu\text{g}/\text{L}$ (dans l'eau douce) < 30 $\mu\text{g}/\text{L}$ (dans l'eau dure)
Dioxyde de carbone dissous	0,03 à 15 mg/L
Oxygène dissous	90 à 100 % de saturation
Cyanure d'hydrogène	< 10 $\mu\text{g}/\text{L}$
Sulfure d'hydrogène	< 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ (de préférence non décelable)
Fer	< 0,3 mg/L
Plomb	< 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ (dans l'eau douce) < 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ (dans l'eau dure)
Mercurure	< 0,05 $\mu\text{g}/\text{L}$
Nitrites	< 60 $\mu\text{g}/\text{L}$ (de préférence non décelable)
Azote (gazeux, en dissolution)	< 100 à 103 % (pression partielle maximale) < 103 % (pression totale de gaz)
Sélénium	< 10 $\mu\text{g}/\text{L}$
Matières totales en suspension	< 3 mg/L au cours de l'incubation < 25 mg/L au cours du stade des alevins et des truitelles
Zinc	< 0,03 mg/L (dans l'eau douce) < 0,3 mg/L (dans l'eau dure)

a. Pour les salmonidés (d'après Klontz *et al.*, 1979 ; CCREM, 1987 ; et Gordon *et al.*, 1987). Est dite douce l'eau dont la dureté totale, en carbonate de calcium (CaCO_3), est d'au plus 60 mg/L. Le présent tableau vise à donner une orientation générale sur la qualité de l'eau. Les conditions locales, notamment les variations de la dureté, de l'alcalinité et de la matière organique en dissolution, peuvent abaisser ou relever le seuil de toxicité des métaux. On devrait consulter les études accessibles sur la toxicité des métaux dans l'eau locale.

On devrait aussi surveiller d'autres variables importantes telles que la teneur en carbone organique, la DCO et la concentration de résidus de pesticides dans l'eau témoin ou celle de dilution et on devrait évaluer leurs effets possibles sur la toxicité.

excéder 100 %¹⁰. En outre, sa teneur en OD devrait être de 90 à 100 % de la valeur de saturation en air, avant emploi. Si c'est nécessaire, on devrait aérer vigoureusement l'eau (en faisant traverser de la pierre

poreuse à de l'air comprimé exempt d'huile) immédiatement avant l'emploi et vérifier que la concentration d'oxygène correspond au taux de saturation de 90 à 100 %.

10. L'eau admise dans l'enceinte expérimentale ne devrait pas être sursaturée en gaz (c'est-à-dire que la PTG devrait être au plus de 100 %). Dans les cas où l'on craint à juste titre la sursaturation en gaz de l'eau d'alimentation (p. ex. source d'eau souterraine ne subissant pas par la suite de dégazage) ou lorsque l'eau témoin ou de dilution est chauffée de façon active ou passive pour atteindre une température précisée pour l'essai, il faudrait vérifier fréquemment la PTG dans l'eau d'approvisionnement (Bouck, 1982). Le cas échéant, on devrait corriger la situation (p. ex. par l'emploi de colonnes d'aération ou par une aération vigoureuse dans un réservoir ouvert), si la PTG excède 100 % de saturation. Il est difficile d'éliminer complètement la sursaturation, et il faudrait des vérifications fréquentes si le problème est soupçonné d'exister ou s'il est avéré.

Section 4

Modes opératoires universels

Les modes opératoires décrits dans les pages qui suivent s'appliquent à chacun des essais toxicologiques d'un produit chimique, d'une eau usée ou d'une eau réceptrice décrits dans les sections 5, 6 et 7. Il faut y intégrer tous les aspects du système expérimental décrit dans la section 3. La liste sommaire de contrôle des conditions expérimentales et des modes opératoires recommandés du tableau 2 ne décrit pas seulement les modes opératoires propres à chaque espèce, mais aussi les modes opératoires d'essai de types précis de substances.

4.1 Préparation des solutions d'essai

Il faut nettoyer et rincer à fond tous les récipients, appareils de mesure, agitateurs et tout l'équipement de manipulation des poissons, conformément aux modes opératoires normalisés. Le rinçage final devrait se faire à l'eau de contrôle ou de dilution.

Pour chaque essai visant à déterminer la CE 50, la CL 50, la CIP ou le rapport CSEO/CEMO (§ 4.5), il faut préparer au moins cinq concentrations d'essai ainsi qu'un témoin (eau de dilution à 100 %). Pour les essais EA et EAT, dont les multiples paramètres ultimes de mesure se fondent sur les effets létaux et sublétaux (§ 4.5), on recommande un plus grand nombre de concentrations (p. ex., 6 à 8 plus le témoin) afin d'améliorer la possibilité d'atteindre chaque paramètre ultime recherché de mesure. La série de dilutions

peut être géométrique (p. ex. 100, 32, 10, 3,2, 1,0 ; ou 100, 46, 22, 10, 4,6, 2,2, 1,0). On peut choisir les concentrations à partir d'autres séries logarithmiques convenables (v. annexe E). Dans les cas où l'on est moins sûr de la gamme des concentrations susceptibles d'être toxiques, on recommande une série géométrique dans laquelle chaque concentration successive est la moitié de celle qui la précède (p. ex. 100, 50, 25, 12,5, 6,3). Habituellement, on n'améliore pas beaucoup la précision en utilisant des coefficients de dilution inférieurs à 50 % (c'est-à-dire des concentrations plus proches les unes des autres). Si on doute fortement des concentrations toxiques, on devrait utiliser un nombre plus grand de concentrations pour en obtenir un grand étalement, plutôt que d'utiliser un coefficient moindre de dilution. Les volumes à utiliser pour les essais varieront selon l'option (E, EA ou EAT) utilisée (v. § 4.3.2, 5.1, 6.1 et 7.1).

Pour les besoins de la réglementation, les essais pourraient porter sur une concentration unique (p. ex. réussite ou échec [tout ou rien]), c'est-à-dire, normalement, sur l'effluent, l'élutriat, le lixiviat ou l'eau réceptrice non diluée ou une concentration arbitraire ou réglementaire. L'emploi de témoins obéirait à la même logique que les essais avec concentrations multiples. Nous ne décrivons pas d'essais avec concentration unique, mais le mode opératoire est évident, et toutes les règles s'appliquent, à ceci près que l'essai porte sur une seule concentration et utilise un témoin.

Tableau 2. — Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés**Méthodes universelles**

Options	— <i>Essai E</i> : avec des embryons, pour des contrôles fréquents ou périodiques ; — <i>Essai EA</i> : avec des embryons et des alevins pour mesurer les effets sur plusieurs stades de développement ; — <i>Essai EAT</i> : avec des embryons, des alevins et des truitelles pour les enquêtes définitives.
Type d'essai	— à renouvellement continu ou intermittent.
Espèces	— truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).
Début de l'essai	— dans les 30 min suivant immédiatement les 5 à 20 min de fécondation des œufs à sec.
Fin de l'essai	— <i>Essai E</i> : 7 jours après la fécondation ; — <i>Essai EA</i> : 7 jours après constat de l'éclosion de la moitié des œufs chez le groupe témoin ; — <i>Essai EAT</i> : 30 jours après constat de nage libre chez la moitié des truitelles survivantes dans le groupe témoin.
Eau témoin ou de dilution	— eau souterraine, eau de surface, eau reconstituée, ou, si nécessaire, eau municipale déchlorée ; eau d'amont pour évaluer l'effet toxique local.
Appareillage, renouvellement des solutions	— pour les embryons et les alevins, becher de plastique de 800 mL, à fond plein, aux parois percées de fentes, suspendu dans un seau de plastique ou un aquarium de verre (l'enceinte expérimentale), dans lequel on assure le renouvellement continu ou intermittent des solutions d'essai à raison d'au moins 0,5 L/(g·j) ; pour les truitelles, seau de plastique ou aquarium de verre, avec renouvellement continu ou intermittent des solutions à raison d'au moins 0,5 L/(g·j).
Nombre d'organismes et de répétitions	— témoin plus au moins cinq concentrations ; <i>pour l'essai E</i> : au moins 120 embryons à chaque concentration, y compris le témoin ; <i>pour l'essai EA ou EAT</i> : 120 à 320 embryons à chaque concentration ; au moins trois répétitions pour les techniques ordinaires d'estimation statistique ponctuelles (c'est-à-dire au moins 40 embryons dans chacune des trois répétitions de l'essai E) ; s'il faut effectuer un test d'hypothèse, au moins quatre répétitions par concentration seraient nécessaires si l'analyse non paramétrique devait se révéler invalide et si l'analyse paramétrique était nécessaire (c'est-à-dire au moins 30 embryons dans chacune des quatre répétitions) ; au moins un incubateur par enceinte expérimentale, cette dernière constituant une répétition.
Température	— moyenne journalière de 14 ± 1 °C, tout au long de l'essai (E, EA ou EAT).
Oxygène ou aération	— 90 à 100 % de la saturation en OD dans l'eau témoin ou de dilution, avant de l'utiliser ; normalement aucune aération préalable sauf si la teneur en OD dans l'échantillon ou la solution d'essai est inférieure à 60 % ou supérieure à 100 % lors de sa préparation, auquel cas, on aère préalablement l'échantillon ou toutes les solutions pendant 30 min et, si c'est nécessaire, pour encore au plus 90 min, à raison de $6,5 \pm 1$ mL/(min·L) ; si le renouvellement des solutions est intermittent, aération peu vigoureuse ; si le renouvellement est continu, aérer, si c'est nécessaire ou voulu, de façon à maintenir le taux d'OD à 60 à 100 % de saturation et/ou

Tableau 2. — Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés

	accroître le débit d'échange.
Éclairage	— obscurité jusqu'à une semaine après la fin de l'éclosion, avec éclairage atténué ou lumière rouge durant le renouvellement des solutions ; ensuite, éclairage contrôlé à raison de 100 à 500 lux à la surface de l'eau, avec photopériode de 16 ± 1 h, de préférence avec gradation et éclairage fluorescent en spectre continu ou l'équivalent.
pH	— aucun réglage si le pH des solutions d'essai est dans l'intervalle de 6,5 à 8,5 ; un deuxième essai, dans un milieu au pH ajusté, pourrait être nécessaire ou convenable, si le pH de départ est à l'extérieur de cet intervalle.
Alimentation	— <i>Essais E et EA</i> : pas d'alimentation ; — <i>Essai EAT</i> : aliment de démarrage du commerce à raison de 4 % du poids des truitelles chaque jour, au moins quatre fois par jour, dès que la moitié des témoins survivants commencent à nager (truitelles), pendant une exposition de 30 jours, mais sans alimentation au cours des 24 dernières heures d'exposition.
Observations, sur chaque répétition	— <i>Essai E</i> : pourcentage d'embryons non viables à la fin de l'essai (<i>E</i>) ; — <i>Essai EA</i> : pourcentage d'alevins non viables et compte rendu descriptif sur le retard de l'éclosion et les alevins difformes ; — <i>Essai EAT</i> : pourcentage de sujets non viables au début du stade de la truitelle, taux de mortalité des truitelles au cours des 30 dernières journées, poids sec moyen des truitelles survivantes à la fin de l'essai et comptes rendus descriptifs sur l'éclosion retardée, les alevins difformes, le retard du début du stade de la truitelle et le comportement anormal des truitelles.
Mesures	— OD et pH dans des concentrations représentatives, au début et à la fin de périodes de 24 heures, si le renouvellement des solutions est intermittent, ou mesures journalières, dans les essais à renouvellement continu ; facultativement, mesure de la conductivité de chaque nouvelle solution d'essai avant sa distribution.
Paramètres (ultimes) de mesure	— <i>Essai E</i> : CE 50 et/ou CE 25 pour les embryons non viables ; — <i>Essai EA</i> : CE 50 et/ou CE 25 pour les alevins non viables (non atteinte du stade de l'alevin) ; comptes rendus descriptifs sur l'éclosion retardée et les difformités chez les alevins ; — <i>Essai EAT</i> : CE 50 et/ou CE 25 pour les sujets non viables au stade de la truitelle (mortalité à toutes les étapes jusqu'au début du stade de la truitelle) ; CL 50 pour les truitelles ; CI 25 pour le poids sec moyen des truitelles survivantes à la fin de l'essai ; comptes rendus descriptifs sur les alevins difformes, le stade de la truitelle retardé et le comportement anormal des truitelles.
Toxique de référence	— phénol, zinc ou les deux ; effectuer un essai E au moment où on entreprend chaque essai E, EA ou EAT, en utilisant une partie du même lot d'œufs fécondés utilisés pour entreprendre l'essai définitif ; utiliser le mode opératoire décrit dans le présent rapport pour effectuer un essai E avec un produit chimique ; déterminer la CE 50.
Validité de l'essai	— invalidité dans les cas suivants : <i>Essai E</i> : > 30 % des témoins sont non viables à la fin de l'essai ; <i>Essai EA</i> : > 35 % des témoins sont non viables à la fin de l'essai ; <i>Essai EAT</i> : > 40 % des témoins sont non viables au moment où on constate que 50 % des survivants ont atteint le stade de la truitelle.

Tableau 2. — Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés***Produits chimiques***

Solvants	— utilisés dans des circonstances particulières seulement ; concentration maximale : 0,1 mL/L.
Concentration	— mesures recommandées : hebdomadaires si renouvellement intermittent, dans des solutions de concentration élevée, médiane et faible et témoin(s) représentatives, immédiatement après le renouvellement des solutions d'essai et immédiatement avant, ce qui représente habituellement un intervalle de 24 heures ; hebdomadaire dans toutes les répétitions des essais avec renouvellement continu.

Effluents, lixiviats et éluutriats

Besoins en échantillons	— pour les essais à l'extérieur, au moins un échantillon prélevé (effluent, lixiviat) ou préparé (éluatriat) hebdomadairement ; pour les essais sur place, échantillons prélevés journallement.
Transport et entreposage	— si la température de l'échantillon est supérieure à 7 °C, il faut le refroidir à 1 à 7 °C avec de la glace ordinaire (et non de la glace sèche) ou au moyen de sachets réfrigérants congelés, dès le prélèvement ; transporter, à l'obscurité, dans cette gamme de température (de préférence à 4 ± 2 °C) dans la glace ordinaire ou les sachets réfrigérants, si besoin est ; l'échantillon ne doit pas congeler au cours du transport ou de l'entreposage ; garder à l'obscurité, à 4 ± 2 °C ; utiliser pour les essais le plus tôt possible après le prélèvement, obligatoirement dans les trois jours qui l'ont suivi (ou après l'extraction, dans le cas d'un éluatriat) pour les essais dans un laboratoire éloigné ou moins d'une journée, pour les essais sur place.
Eau témoin ou de dilution	— selon les indications données ou l'objet de l'essai ; eau du laboratoire ou eau réceptrice d'amont, pour la surveillance et la conformité.
Forte teneur en matières solides	— le second essai avec un échantillon filtré est facultatif, pour évaluer les effets des matières solides dans l'échantillon non filtré.

Eau réceptrice

Besoins en échantillons	— mêmes conditions qu'à la rubrique <i>effluents, lixiviats et éluutriats</i> .
Transport et entreposage	— mêmes conditions qu'à la rubrique <i>effluents, lixiviats et éluutriats</i> .
Eau témoin ou de dilution	— selon les indications données ou l'objet de l'essai ; si on étudie les répercussions locales, utiliser de l'eau d'amont.

On doit entreprendre l'essai avec au moins trois répétitions de chaque concentration, y compris les témoins. Si les paramètres ultimes de mesure doivent être calculés au moyen de tests d'hypothèses (c'est-à-dire rapport CSEO/CEMO), il faut au moins quatre répétitions par concentration¹¹. L'essai doit débuter avec un nombre égal de répétitions par concentration, y compris les témoins. Si, accidentellement, une répétition est détruite au cours de l'essai, on peut analyser un ensemble asymétrique de résultats, mais avec moins de puissance (EC, 1998b).

Dans un essai donné, il faut utiliser la même eau témoin ou de dilution pour préparer le témoin et toutes les concentrations d'essai. Chaque solution doit être constituée d'un

11. Pour l'estimation ponctuelle de la CIp comme paramètre ultime de mesure, au moins trois répétitions sont utiles. La CIp pourrait encore se calculer à l'aide de deux répétitions, mais on y perdrait en puissance et on élargirait les limites de confiance. Les répétitions ne sont pas nécessaires pour les estimations quantiques (CL 50, CE 50 et CE 25), puisque les résultats sont combinés pour chaque concentration. Les trois répétitions sont toutefois utiles à la manipulation et pour assurer des conditions stables aux nombreux œufs et embryons utilisés dans l'essai, et les résultats y gagnent en sécurité au cas où une répétition serait accidentellement endommagée ou perdue.

S'il faut effectuer un test d'hypothèse pour servir de paramètre de mesure (v. § 4.5), il faut au moins trois répétitions par concentration pour les analyses statistiques paramétriques ordinaires. Un nombre plus élevé de répétitions donnerait plus de puissance à l'analyse statistique. Si des anomalies dans les données invalident ces méthodes, il faudrait quatre répétitions pour autoriser l'emploi de statistiques non paramétriques (USEPA, 1994 ; EC, 1998b). Par exemple, le test de Dunnett (paramétrique) exige au moins trois répétitions pour chaque concentration, tandis que le test non paramétrique de classement « multi-univoque » de Steel, (*Many-One-Rank test*) exige au moins quatre répétitions (Steel et Torrie, 1960). Si on voulait estimer le rapport CSEO/CEMO, il serait prudent d'utiliser au moins quatre répétitions.

volume identique et être bien agitée au moyen d'une tige de verre propre, d'une barre aimantée de Téflon^Z ou par tout autre instrument propre fait d'un matériau non toxique.

On devrait ajuster la température de l'échantillon (ou des échantillons) ou des solutions d'essai (y compris de l'eau témoin ou de dilution) selon les exigences de chaque option ou de chaque stade vital (v. § 4.3.3). Au besoin, on peut l'ajuster par chauffage ou refroidissement dans un bain d'eau ou par un refroidisseur à immersion, d'un matériau non toxique (p. ex. d'acier inoxydable). Il ne faut pas réchauffer les échantillons ou les solutions d'essai par des thermoplongeurs, lesquels peuvent altérer les constituants chimiques et la toxicité. On pourrait devoir régler le pH de ces milieux (v. § 4.3.5) ou aérer les solutions au préalable (§ 4.3.4).

Pour l'évaluation de l'effet toxique en un lieu donné, on peut se servir d'eau d'amont comme eau témoin ou de dilution. On ne peut pas utiliser d'eau d'amont si cette dernière est manifestement toxique, d'après les critères de l'essai auquel elle est destinée (v. § 4.6). Dans ce cas, il faut la prendre ailleurs (§ 3.4).

4.2 Début de l'essai

Les œufs doivent être fécondés à sec (consulter l'annexe D) afin de prévenir le début de la fermeture du micropyle et le durcissement à l'eau avant leur transfert dans les solutions d'essai¹². Il importe que la

12. Afin de maximiser la sensibilité et la comparabilité des résultats, il faut normaliser la mise en route de l'essai afin d'assurer le durcissement pendant l'exposition aux solutions d'essai. De

taille des œufs fraîchement fécondés soit aussi uniforme que possible, car elle peut influencer sur celle des alevins et des truitelles (Beacham *et al.*, 1985). On devrait mettre au rebut tous les œufs qui, à l'œil, sont nettement ou trop gros ou trop petits. Pour l'essai E, il faut utiliser au moins 120 embryons par concentration ; pour l'essai EA ou EAT, il en faut 120 à 320 (§ 4.3.1). À chaque concentration, y compris le ou les témoins, doivent correspondre au moins quatre enceintes expérimentales, si l'on prévoit un traitement statistique, y compris des tests d'hypothèses ; et il faut au moins trois répétitions par concentration si on prévoit d'appliquer des techniques d'estimation de paramètres ponctuels (p. ex. CE 50, CIp) [v. § 4.1 et 4.5].

Dans chaque enceinte, on devrait ajouter un nombre identique d'embryons. À raison de 40 embryons par répétition¹³, un essai comptant trois répétitions (comprenant cinq concentrations plus un témoin) exige

préférence, on transporte les gamètes au laboratoire, on procède à la fécondation, puis on dépose les œufs fécondés dans les solutions d'essai. Dans certains cas, il pourrait être pratique de transporter les récipients renfermant les répétitions des solutions d'essai à l'écloserie ou à l'endroit où se trouvent les géniteurs. Après leur fécondation, on dépose les œufs dans les solutions d'essai, deux heures, pour les faire durcir à l'eau, puis on les rapporte au laboratoire pour les répartir dans les récipients d'essai convenables. On peut transporter et manipuler les œufs durcis à l'eau pendant quelques heures, sans causer de mortalité inutile, mais il existe une période de sensibilité relative aux chocs dans les quelques heures qui coïncident avec le durcissement et qui le suivent immédiatement. Il faudrait alors être très prudent au cours de cette période lorsqu'on les dépose ou les manipule (v. annexe D).

13. Chaque enceinte expérimentale représente une répétition d'une concentration donnée. Dans cette enceinte, on peut suspendre au moins un incubateur, mais tous les incubateurs réunis dans la même enceinte représentent une répétition.

720 œufs. De même, un essai employant 80 embryons par répétition, trois répétitions et cinq concentrations plus un témoin exige 1 440 œufs. Les œufs doivent provenir d'un lot d'œufs évacués par pression de l'abdomen d'au moins quatre femelles de taille semblable (v. § 2.2 et annexe D).

On doit essayer « d'homogénéiser les unités expérimentales », pour éviter, entre les récipients, tout écart qui serait relié à l'expulsion provoquée des gamètes. On y parvient de deux façons. Les deux sont valides et conviennent aux mêmes analyses statistiques des résultats (Hubert, 1991). Dans la première, on peut réunir les embryons provenant de géniteurs différents ou d'opérations différentes d'expulsion des œufs, qui ont été gardés séparés, avant d'exposer ces embryons aux solutions d'essai. Dans la seconde, on peut répartir de façon égale les embryons provenant d'une opération donnée d'expulsion entre toutes les répétitions de toutes les concentrations, puis répartir de même les embryons obtenus semblablement d'autres femelles, entre tous les incubateurs pour constituer l'effectif complet de la répétition. La seconde méthode exige plus de soins et d'efforts d'élevage et de manipulation. Elle devrait cependant réduire le « bruit » des variations entre les répétitions de la même concentration et prévenir le risque, auquel est exposée la première méthode, d'obtenir de fortes proportions d'œufs non fécondés dans une répétition donnée, dans l'éventualité d'une telle fluctuation reliée à l'expulsion provoquée.

La fécondation doit être assurée par le brassage à sec des œufs et de la laitance pendant au moins cinq minutes (Fennell *et al.*, 1998) et au plus 20 minutes (Birge

et al., 1985). Après ce brassage, on devrait transvaser aussi rapidement que possible les groupes d'œufs fraîchement fécondés (*les embryos*) dans les solutions d'essai (consulter l'annexe D). Ce transvasement devrait se faire dans les 10 minutes suivant immédiatement les 5 à 20 minutes de fécondation et elle doit se terminer dans les 30 minutes suivant immédiatement la fécondation. Un court rinçage (de pas plus de 10 secondes) de chaque groupe d'embryons transvasés pourrait être nécessaire pour éliminer les débris et la laitance excédentaire. À cette fin, on pourrait utiliser soit de l'eau témoin ou de dilution ou une partie aliquote de la solution d'essai à laquelle sont destinés les embryons. Si on utilise de l'eau, son contact avec les embryons ne doit pas durer plus de quelques secondes, entre le moment de la fécondation et la mise en contact des œufs avec la solution d'essai. Il ne faut pas retenir pour l'essai d'œufs présentant des anomalies (p. ex. opaques ou blanc laiteux) ou qui sont notablement de taille insuffisante ou de taille excessive par rapport aux autres œufs. Il faut éliminer tout embryon peut-être blessé au cours du transvasement ; pour ce faire, on peut utiliser des pincettes ou une pipette de gros diamètre intérieur (7 à 10 mm) coiffée d'une poire en caoutchouc.

Il faut prendre bien soin de ne pas heurter ou laisser choir les embryons durant leur transfert vers les incubateurs ou de ne pas les manipuler inutilement. Dans les incubateurs, les embryons ont besoin d'un espace suffisant pour assurer un échange suffisant d'oxygène et l'évacuation des déchets du métabolisme. On doit les répartir uniformément sur le fond de chaque incubateur, pour qu'ils forment une couche d'une seule épaisseur et qu'ils ne soient pas

agglutinés ou empilés les uns sur les autres. Cette répartition facilite également la reconnaissance et le dénombrement des embryons non viables ou de ceux qui éclosent ¹⁴.

Au début de l'essai, il faut compter les embryons transvasés dans chaque incubateur, puis les recompter pour s'assurer de la présence du nombre exigé et apporter tous les correctifs nécessaires. Au cours du dénombrement, on peut, au besoin, soulever doucement l'incubateur jusque sous la surface de la solution d'essai. On devrait corriger le nombre d'embryons dans l'incubateur, au besoin, en récupérant les embryons excédentaires à l'aide d'une pincette ou d'une pipette de fort calibre munie d'une poire et en complétant les groupes déficitaires avec le nombre nécessaire d'œufs transférés doucement et avec prudence du ou des groupes restants d'œufs fécondés pour les besoins de l'essai. On devrait aussi alors examiner l'aspect de tous les embryons dans chaque incubateur et on devrait mettre au rebut et remplacer tout embryon à la taille, à la forme ou à la couleur atypiques.

En outre, on doit affecter formellement au hasard le groupe d'embryons de chaque incubateur à des concentrations et à des répétitions particulières. Il faut aussi, dans l'installation expérimentale, randomiser la position des concentrations expérimentales. Chaque enceinte expérimentale doit être

14. Selon la superficie du fond de l'incubateur et la taille des œufs, il pourrait être nécessaire de suspendre plus d'un incubateur dans l'enceinte expérimentale pour obtenir le nombre nécessaire d'embryons répartis sur une seule épaisseur. Si l'on suspend plus d'un incubateur dans l'enceinte expérimentale, les embryons devraient être répartis également entre eux.

clairement codée ou étiquetée afin d'identifier la substance et la concentration d'essai ainsi que la date et l'heure de mise en route de l'essai. On devrait vérifier et régler, si cela est nécessaire ou autorisé, la température, la concentration d'OD et le pH dans les enceintes expérimentales, pour les ramener à des valeurs acceptables (v. § 4.3.3, 4.3.4 et 4.3.5) avant d'y admettre les organismes.

Il est recommandé de mesurer la conductivité de chaque solution d'essai fraîche avant de la distribuer dans les enceintes expérimentales, pour en vérifier préalablement la concentration. On devrait aussi en vérifier la température, la concentration d'OD et le pH, au besoin, avant de l'employer.

Les embryons de salmonidés sont extrêmement sensibles à toute perturbation ou choc mécanique jusqu'au moment où l'on peut percevoir l'œil au travers la paroi de l'œuf (v. annexe D). C'est pourquoi il faut exécuter avec un surcroît de prudence les opérations suivies d'entretien (p. ex., le renouvellement intermittent des solutions) tout au long de l'essai E et dans la partie des essais EA et EAT qui précède la pigmentation de l'œil. Tant que l'œil n'est pas visible, l'élimination des embryons manifestement morts (c'est-à-dire opaques) ou des œufs non fécondés pour maîtriser les infections cryptogamiques devrait se faire avec beaucoup de prudence (sans perturber aucun des embryons survivants), à l'aide d'une pipette de gros calibre (7 à 10 mm) coiffée d'une poire de caoutchouc.

4.3 Conditions d'essai et modes opératoires

4.3.1 Options

On peut utiliser au moins une des trois options suivantes : un essai sur les embryons (E) pour la surveillance fréquente ou périodique ; un essai sur les embryons et les alevins (EA), pour mesurer les effets toxiques sur quelques stades du développement ; un essai sur les embryons, les alevins et les truitelles (EAT) pour les enquêtes de caractère définitif (v. sections 5 à 7). Les trois options commencent au début du développement des embryons et mesurent le développement et la survie au bout des premiers stades du cycle biologique. L'essai E doit débuter avec au moins 120 embryons par concentration (p. ex. trois répétitions de 40 embryons chacune par concentration) et il se termine normalement 7 jours après la fécondation. Cependant, on peut le prolonger jusqu'à 10 jours après la fécondation (Birge, 1996). Cette prolongation peut être indiquée pour l'obtention de résultats concluants, si les essais antérieurs ont montré que les embryons se développaient lentement. L'essai EA débute normalement avec 120 à 320 embryons par concentration¹⁵ et il prend

15. Pour l'essai EA ou EAT, le nombre d'embryons par répétition et concentration dépend d'un certain nombre de facteurs, notamment les taux prévus de fécondation et de réussite de l'éclosion. Ces taux à leur tour sont déterminés par l'expérience du laboratoire dans l'utilisation des mêmes sources de gamètes ainsi que d'eau témoin et de dilution. Le nombre initial d'embryons est aussi déterminé par des facteurs tels que le volume disponible d'échantillon à soumettre à l'essai, de la contenance et du type d'enceintes expérimentales, des paramètres ultimes de mesure, du besoin ou non de sujets pour des mesures supplémentaires telles que la présence de contaminants dans l'organisme (v. note 25). Le minimum recommandé est de trois répétitions par

fin 7 jours après que l'on a constaté un taux d'éclosion de 50 % parmi les embryons survivants non nourris du groupe témoin. L'essai EAT débute aussi normalement avec 120 à 320 embryons par concentration¹⁵ et il se termine 30 jours après que 50 % des sujets survivants du groupe témoin ont commencé à nager librement (v. § 4.3.6). Au cours des 30 jours de l'essai EAT, on nourrit journalièrement les truitelles, sauf le dernier jour. À la fin, on mesure le taux moyen de survie et le poids sec moyen des truitelles survivantes.

On peut appliquer n'importe laquelle de ces trois options pour évaluer des échantillons de produit chimique, d'effluent, d'élutriat, de lixiviat ou d'eau réceptrice, selon les objectifs de l'essai. L'essai E doit durer au moins 7 jours, l'essai EA une trentaine de jours et l'essai EAT environ 70 jours, selon les conditions expérimentales et les modes opératoires.

L'essai E ne mesure qu'un paramètre biologique ultime (la non-viabilité des embryons de truite arc-en-ciel). Cette option convient à la surveillance fréquente ou périodique, mais, parfois, on recommande une comparaison initiale avec l'essai EA ou EAT, plus définitif, ou l'utilisation de cet essai (v. § 5.1, 6.1 et 7.1). Cette comparaison ou l'utilisation d'un essai EA ou EAT pourrait convenir à certaines substances possédant des modes inhabituels d'action, à la surveillance d'effets de certains types d'effluents sur l'environnement ou à un lixiviat ou à un effluent particulier.

concentration et, en conséquence, à 40 embryons par répétition, 120 embryons par concentration, tandis que trois répétitions à raison de 80 embryons par répétition entraînent la nécessité d'employer 240 embryons par concentration.

4.3.2 Type d'essai et renouvellement des solutions

Les essais peuvent se dérouler avec renouvellement intermittent ou continu des solutions. Avec de nombreux types de substances, les essais en conditions statiques, avec renouvellement des solutions aux 12 ou aux 24 heures peuvent, s'ils sont réalisés correctement, être aussi sensibles et précis que les essais à renouvellement continu (Sprague, 1973). Avec certaines substances exerçant une forte DCO ou DBO ou, encore, instables, il pourrait être nécessaire de renouveler en continu (rapidement) les solutions.

Dans les essais à renouvellement intermittent, il existe deux façons de renouveler les solutions journalièrement ou plus fréquemment encore :

1. préparer des solutions fraîches dans des enceintes expérimentales propres, puis déplacer prudemment et suspendre de nouveau les incubateurs renfermant les embryons ou les alevins survivants dans les solutions fraîches ;
2. laisser les organismes dans le même récipient tout en renouvelant presque complètement les solutions par aspiration de 80 % du volume et son remplacement par une solution fraîche jusqu'à l'obtention du volume initial.

On pourrait se servir de cette dernière méthode dans les essais E avec renouvellement intermittent et, dans les essais EA ou EAT, au cours des deux premières semaines, à peu près. On devrait aspirer les vieilles solutions, en prenant les précautions voulues, puis ajouter la solution fraîche lentement, parce que les embryons sont très sensibles à toute perturbation ou choc mécanique tant qu'ils n'ont pas atteint

le stade de l'œuf embryonné (v. § 4.2 et annexe D). Cette étape franchie, on peut suivre l'une ou l'autre des méthodes de renouvellement.

Les essais avec renouvellement continu exigent un système qui distribue aux enceintes expérimentales une série de concentrations prémélangées d'eau usée ou d'une autre substance d'essai, à un débit contrôlé. Divers dispositifs pourraient produire une série de plus en plus diluée de solutions filles de la solution mère ou d'une substance d'essai au moyen de pompes doseuses ou de dilueurs proportionnels. On devrait vérifier journalièrement, durant l'essai, le débit des solutions d'essai ou des solutions mères et de l'eau témoin ou de dilution, et sa valeur ne devrait pas varier de plus de 10 %.

La quantité minimale de solution d'essai dans chaque répétition est déterminée par deux conditions dont l'une a préséance sur l'autre ; il faut effectuer les calculs à l'égard de chacune de ces conditions, et il faut adopter celle qui exige le plus de solution d'essai fraîche. La première condition découle de la biomasse des organismes dans la répétition ; la quantité de solution d'essai fraîche exigée chaque jour augmente en proportion directe du croît des sujets. Dans ce cas, il faudra la même quantité de solution dans l'essai à renouvellement continu que dans celui à renouvellement intermittent. La deuxième condition est que, à toutes les 24 heures, il faut remplacer avec de la solution fraîche la plus grande partie de la vieille solution dans le récipient. Les volumes relatifs exigés en renouvellement continu ou intermittent dépendent du volume que renferme le récipient. Quand ce volume augmente, la seconde condition (concernant son remplacement) tend à l'emporter sur la première, laquelle,

déterminée par la biomasse, devient moins importante. De même, le chercheur ne devrait pas choisir la contenance du récipient de façon arbitraire, mais il devrait fonder sa décision sur le calcul d'un volume convenable de solution dans le récipient, en ne négligeant pas la quantité disponible d'échantillons ou de produit chimique d'essai.

Ces deux conditions absolues sont minimales. Dans certains cas, un renouvellement minimal pourrait se traduire par une toxicité mesurée plus faible que celle que l'on aurait constatée par suite d'un apport plus généreux de solution d'essai. D'autres facteurs, c'est tout à fait possible, pourraient intervenir et accroître les besoins en solution fraîche. Par exemple, on pourrait avoir besoin de plus de cette dernière si les milieux présentaient des signes d'épuisement de l'oxygène.

La condition relative à la biomasse se formule comme suit : il devrait y avoir au moins 0,5 L de solution par gramme d'embryon ou d'alevin et par jour, c'est-à-dire $\geq 0,5 \text{ L}/(\text{g}\cdot\text{j})$ et, pour les truitelles, cette quantité minimale est obligatoire. On peut estimer le chiffre en fonction de la biomasse maximale prévue au cours de l'essai ou on peut l'ajuster périodiquement quand l'essai est de longue durée. Par exemple, dans un essai EA (avec des truites arcs-en-ciel), 40 alevins de moyenne taille (p. ex. 125 mg, selon l'annexe D) représenterait en 5 g par répétition. Il faut donc au moins 2,5 L de solution fraîche d'essai par jour, que celle-ci soit renouvelée en continu ou par intermittence. Le débit d'alimentation de chaque répétition serait réglé de façon à fournir cette quantité, si c'est là la condition prioritaire.

La deuxième condition consiste à remplacer au moins 80 % de la solution d'essai de chaque récipient, chaque jour. En renouvellement intermittent, l'enceinte renfermerait normalement un volume de solution au moins égal à l'alimentation journalière exigée pour la biomasse, c'est-à-dire 0,5 L/(g·j). À toutes les 24 heures ou plus fréquemment, il faut renouveler ce volume, selon les méthodes déjà décrites. Le renouvellement intermittent pourrait devoir être plus fréquent, selon la nature de la substance d'essai¹⁶. Dans un essai avec renouvellement continu, pour remplacer 80 % des molécules de la solution d'essai, il faudrait que le débit journalier entrant dans l'enceinte expérimentale égale au moins 1,6 fois le volume de liquide qui s'y trouve, dans l'hypothèse d'un brassage complet dans l'enceinte (Sprague, 1973).

Voici quelques exemples. Si le récipient doit renfermer 2 L de solution d'essai, à renouveler par intermittence journalièrement, 80 % de ce volume serait remplacé, c'est-à-dire 1,6 L. Ceci est moins que les 2,5 L exigés par la condition relative à la biomasse, énoncée dans l'exemple qui précède, mais ce n'est pas toujours ce qui se produit. Dans un essai à renouvellement continu, dans lequel chaque récipient renferme 2 L, le débit entrant devrait être de $1,6 \times 2 \text{ L} = 3,2 \text{ L}$, ce qui est plus que ce qu'exige l'essai avec renouvellement intermittent et plus que ce qu'exige la condition relative à la biomasse. On pourrait corriger ce volume s'il suffisait de 1 L, dans

le récipient, pour recouvrir les embryons, et le débit entrant n'aurait à être que de 1,6 L/j. La réduction du volume que renferme le récipient et un apport continu relativement important pourraient être souhaitables si des toxiques volatils étaient présents dans la substance d'essai.

4.3.3 Température

Le rythme initial de développement de la truite arc-en-ciel et d'autres salmonidés dépend intimement de la température de l'eau (Peterson *et al.*, 1977 ; Gordon *et al.*, 1987 ; Peterson et Martin-Robichaud, 1989 ; Beacham et Murray, 1990), et différentes températures peuvent correspondre au développement et à la croissance optimaux de chaque stade ou de chaque espèce. Dans l'essai E, la température moyenne journalière doit être de $14 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ pour les embryons de la truite arc-en-ciel (Fennell *et al.*, 1998) ; la température instantanée à laquelle les répétitions doivent se trouver ne doit pas varier de plus de $3 \text{ }^\circ\text{C}$. Cet intervalle, même s'il excède l'optimum pour les embryons, reste néanmoins acceptable pour le bon développement des embryons de truites. Cette température accélère à peine le développement des embryons et l'action des toxiques, ce qui procurera aux paramètres ultimes de mesure une plus grande netteté dans le court intervalle de temps de cet essai (Yee *et al.*, 1996).

Durant un essai EA ou EAT, la température moyenne journalière à laquelle chaque organisme est exposé (c'est-à-dire les embryons et les alevins dans l'essai EA ; les embryons, les alevins et les truitelles dans l'essai EAT) doit être de $14 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (Fennell *et al.*, 1998). En outre, la température instantanée à laquelle les répétitions sont exposées ne doit pas varier de plus de $3 \text{ }^\circ\text{C}$.

16. Il faudra renouveler plus souvent les solutions d'essai contenant des substances très volatiles ou qui se dégradent très rapidement, peut-être à toutes les 12 heures ou même à toutes les 6 heures. Les essais portant sur des eaux usées instables pourraient le mieux se dérouler sur place, avec renouvellement continu, afin de remplacer fréquemment chaque solution d'essai.

Il faut ajuster au besoin la température de l'échantillon ou de la solution à la valeur acceptable pour chaque solution (14 ± 1 °C). Il ne faut pas chauffer les échantillons ou les solutions d'essai par des thermoplongeurs, puisque ces derniers pourraient altérer les constituants chimiques et la toxicité. Il faut déterminer la température par des mesures effectuées dans des enceintes expérimentales représentatives (c'est-à-dire renfermant au moins les concentrations maximale, médiane et minimale plus la solution témoin, si l'essai utilise plusieurs concentrations). Dans un essai avec renouvellement intermittent, les mesures doivent se faire et être enregistrées au début et à la fin de chaque période d'exposition de 24 heures (ou plus fréquemment, le cas échéant), dans la solution fraîche et dans la solution usée, immédiatement avant le renouvellement de cette dernière. Dans l'essai à renouvellement continu, les mesures et les enregistrements doivent être journaliers. En outre, on recommande de mesurer en continu tout au long de l'essai la température d'au moins une solution d'essai.

4.3.4 Oxygène dissous et aération

La teneur en OD de l'eau témoin ou de l'eau de dilution servant à la préparation des solutions d'essai devrait être de 90 à 100 % de la teneur de saturation, avant l'emploi et, au besoin, il faudrait aérer vigoureusement l'eau pour atteindre ce taux.

Il pourrait être obligatoire ou convenable d'aérer au préalable (avant l'exposition des organismes d'essai) ou au cours de l'essai chaque solution d'essai, selon la nature de la substance d'essai, le type de l'essai et ses objectifs (v. § 3.3, 4.3.2, 5.3, 6.3 et 7.3). L'appareillage servant à exposer les embryons et les alevins aux solutions d'essai, aérées ou non, est décrit au § 3.3.

Si on effectue une aération préalable (v. § 5.3, 6.3 et 7.3), chaque partie aliquote d'échantillon ou de solution servant au renouvellement devrait être préalablement aérée¹⁷ pendant 30 min au débit de $6,5 \pm 1$ mL/(min·L). Immédiatement après, on devrait mesurer la teneur en OD de l'échantillon ou des solutions. Ce n'est que si le taux mesuré dans au moins une solution est inférieur à 60 % ou supérieur à 100 % de saturation en air et que l'on devrait poursuivre, au même débit, pendant pas plus de 90 min, l'aération préalable de l'échantillon ou de toutes les solutions d'essai (y compris du témoin). Cette période supplémentaire doit être le moindre des deux temps suivants : 90 min ou le temps pris pour atteindre un taux de saturation de 60 % dans le milieu à la concentration maximale de substance d'essai (ou un taux de saturation de 100 %, en cas de sursaturation manifeste)¹⁸. Immédiatement après, il faut exposer le poisson à chaque solution d'essai,

17. On devrait préparer dans un récipient non toxique d'une contenance convenable un volume d'échantillon ou de chaque solution d'essai, qui permettrait de préparer ou de renouveler le milieu de toutes les répétitions (v. § 4.3.2). Pour l'aération préalable, on devrait utiliser de l'air comprimé exempt d'huile, fourni au moyen d'une pipette fine, d'un tube capillaire ou d'un diffuseur du commerce. Un diffuseur convenable, mesurant 3,8 cm sur 1,3 et adapté à un tube d'aération jetable de plastique de 0,5 cm (diamètre extérieur) est offert en catalogue, article AS-1 d'Aqua Research Ltd. (C.P. 208, North Hatley, Québec, J0B 2C0 ; tél. : 819-842-2890).

18. L'aération pourrait entraîner les produits chimiques volatils qui se trouvent dans l'échantillon ou les solutions d'essai ou elle pourrait accélérer leur oxydation et leur dégradation en d'autres substances. Cependant, l'aération préalable pourrait être nécessaire en raison de la demande d'oxygène qu'exerce la substance d'essai (p. ex. épuisement de l'oxygène dans l'échantillon au cours de l'entreposage). S'il faut aérer préalablement la solution d'essai, il faut traiter de même *toutes* les solutions. De même, s'il faut aérer une enceinte expérimentale au cours de l'essai, il faut traiter de même *toutes* les solutions, y compris les témoins.

qu'un taux de saturation de 60 à 100 % ait été atteint ou non dans l'échantillon ou dans toutes les solutions d'essai. Il faut signaler dans les rapports toute aération préalable, y compris sa durée et son débit (section 8).

En cas de renouvellement intermittent (v. § 4.3.2), on devrait aérer chaque solution d'essai, y compris les témoins, continuellement tout au long de l'essai, pour assurer un échange permanent de solution dans le milieu entourant immédiatement les embryons ou les alevins qui se développent. Le débit d'aération de chaque solution d'essai doit être minimal et contrôlé, pour éviter le dégazage indu des toxiques volatils ou la détoxification excessive et incontrôlée des constituants toxiques oxydables. Si un groupe d'organismes en expérience est exposé à un volume de solution d'au moins 6 L, on peut et on devrait lui assurer une aération de $6,5 \pm 1$ mL/(min·L) au moyen d'un appareillage d'aération et de vannes de réglage classiques (v. note 7). Si le volume de chaque solution d'essai est inférieur à 6 L, ce faible débit d'aération ne peut pas être atteint ni maîtrisé à l'aide de vannes de régulation classique. Dans ce cas, on devrait donc pratiquer une aération lente, au moyen d'une conduite fine (p. ex. 0,5 mm, d.i.), à raison de pas plus de 100 bulles à la minute (EC, 1992b ; USEPA, 1994). Le § 3.3 décrit l'appareillage convenant à l'aération dans un essai à renouvellement intermittent (v. note 7 et fig. 3B).

On peut effectuer un essai avec renouvellement continu (§ 4.3.2), avec ou sans aération de solutions d'essai, puisque l'apport continu de solution fraîche assure l'échange permanent de la solution dans laquelle baignent les embryons ou les alevins qui se développent. Le § 3.3 décrit et représente (fig. 3C) un appareillage qui convient à ce genre d'essai, avec ou sans

aération. On devrait prendre en considération la nature de la substance d'essai (p. ex. sa volatilité, sa demande d'oxygène, sa stabilité) lorsque l'on décide si le renouvellement continu de la solution est le régime indiqué et si l'aération est de mise ou non. Selon la demande d'oxygène, une lente aération de chaque solution d'essai pourrait être nécessaire au cours de ce type d'essai pour maintenir le taux d'OD à des valeurs convenables, de 60 à 100 % de saturation (v. § 6.3). Si on pratique l'aération, chaque répétition (y compris les témoins) doit être aérée à un débit semblable et contrôlé, comme nous l'avons décrit. Pour maintenir le taux d'OD à 60 à 100 % de saturation, il faudrait peut-être, en outre, accélérer le renouvellement des solutions.

Si l'objet de certains essais (p. ex. pour la recherche) englobe l'évaluation de la forte demande d'oxygène exercée par la substance d'essai, dans le cadre de la mesure de son effet total, on recourrait au renouvellement continu (v. § 3.3 et 4.3.2) et on n'assurerait aucune aération des solutions au cours de l'essai.

Il faut surveiller et enregistrer la teneur en OD de solutions représentatives, tout au long de l'essai. Dans les essais avec renouvellement intermittent, il faut la mesurer au début et à la fin de chaque intervalle de renouvellement, dans au moins une répétition des concentrations du ou des témoins et aux concentrations maximale, médiane et minimale. Dans les essais avec renouvellement continu, il faut la mesurer dans chaque répétition, au début de l'essai, de même que journallement par la suite dans au moins le ou les témoins ainsi qu'aux concentrations maximale, médiane et minimale.

La teneur en oxygène dans les enceintes expérimentales ne devrait pas descendre sous 60 % de saturation. Si cela se produit, il faudrait être sensibilisé au fait que l'essai ne mesure pas la toxicité *intrinsèque* de la substance, mais l'effet total de la substance (p. ex. l'effluent), y compris son influence désoxygénante¹⁹. Les mesures initiales révéleront les éventuels problèmes reliés à l'OD et, dans ce cas, il faut vérifier continuellement la concentration d'oxygène. L'utilisation obligatoire d'eau témoin ou de dilution saturée en oxygène et le renouvellement journalier ou continu des solutions maintiennent, dans la plupart des cas, l'OD au-dessus des taux qui sont très stressants pour les salmonidés en train de se développer et influent fortement sur les résultats.

4.3.5 pH

On doit mesurer le pH des solutions témoins et des solutions aux concentrations maximale, médiane et minimale au début de l'essai, avant l'introduction des embryons. On devrait également mesurer le pH dans des répétitions représentatives, immédiatement avant et immédiatement

19. À remarquer que la limite inférieure de 60 % de saturation fixée pour l'OD des solutions d'essai est arbitraire et qu'un taux d'oxygène supérieur peut aussi stresser le jeune poisson. Pour un développement optimal, les embryons et alevins de salmonidés exigent des taux supérieurs (76 à 95 %) de saturation (Davis, 1975). Toute réduction sous la saturation provoque, de fait, une charge métabolique chez le poisson et diminue le rendement de son métabolisme (Doudoroff et Shumway, 1970). Ainsi, au-dessus du taux de 60 % de saturation, pour cet essai, le stress découlant de concentrations d'oxygène inférieures à la saturation pourrait interagir avec le stress dû au(x) toxique(s). Le cas échéant, ce phénomène est mesuré comme faisant partie de l'échantillon, que ce soit de l'effluent ou d'une autre substance. Cette interaction a été acceptée, dans ce mode opératoire, comme faisant partie de l'effet que l'on mesure.

après chaque renouvellement, dans les essais à renouvellement intermittent, et journallement, dans les essais à renouvellement continu.

On devrait normalement réaliser les essais toxicologiques sans régler le pH. Cependant, si l'échantillon de la substance d'essai déplace le pH d'une solution à l'extérieur de l'intervalle de 6,5 à 8,5 et si on évalue la toxicité de la substance plutôt que les effets nocifs ou perturbateurs du pH²⁰, il faudrait ajuster le pH des solutions ou de l'échantillon ou mener parallèlement un second essai, avec le pH ajusté. Pour ce second essai, on peut neutraliser (en le réglant à 7,0) le pH initial de l'échantillon, de la solution mère (essai à renouvellement continu) ou de chaque solution fraîche avant le renouvellement (essai à renouvellement intermittent), selon les objectifs ou on peut l'ajuster à 0,5 unité près, au pH de l'eau témoin ou de dilution avant d'y exposer le poisson. Serait également acceptable pour ce second essai le réglage du pH de 6,5 à 7,0 (si le pH de l'échantillon est inférieur à 6,5 ou si l'échantillon entraîne la baisse du pH à moins de 6,5) ou de l'abaisser entre 8,0 et 8,5 (si le pH est supérieur à 8,5, du fait de l'échantillon). Pour ces réglages, on devrait normalement utiliser de l'acide chlorhydrique (HCl) ou de l'hydroxyde de sodium (NaOH) titrant au plus 1 N. Dans certains cas (p. ex. échantillons d'effluents fortement tamponnés), on pourrait devoir utiliser un acide ou une base de titre plus élevé.

Abernethy et Westlake (1989), fournissent des indications utiles pour le réglage du pH.

20. Inférieur à 6,5 ou supérieur à 8,5, le pH peut aggraver la mortalité, engendrer un comportement anormal, nuire à la croissance des alevins et des stades ultérieurs (Gordon *et al.*, 1987).

Après chaque addition d'acide ou de base, on devrait laisser s'équilibrer les parties aliquotes d'échantillons ou de solutions d'essai dont on règle le pH. Le temps d'équilibrage dépend du pouvoir tampon de la solution ou de l'échantillon. Dans le cas d'échantillons d'effluent, on recommande une période de 30 à 60 min (Abernethy et Westlake, 1989). Une fois l'essai en marche, on surveille le pH de chaque solution, mais sans l'ajuster.

Si l'objet de l'essai toxicologique est d'élucider la nature des toxiques présents dans la substance d'essai, l'ajustement du pH est l'une des nombreuses techniques (p. ex. oxydation, filtration, dégazage par entraînement à l'air, addition d'un chélateur) pour caractériser et déterminer la toxicité de l'échantillon. Ces techniques d'évaluation quantitative de la toxicité mettent à la disposition du chercheur des méthodes utiles d'évaluation de la nature physico-chimique du ou des toxiques et la mesure dans laquelle il(s) se prête(nt) à la détoxification (USEPA, 1991a et b).

4.3.6 Périodes de transition

Si les salmonidés traversent plusieurs étapes de développement au début de leur cycle biologique, trois grandes transitions servent de points repères dans l'essai. La première est la transition de l'œuf venant d'être fécondé à l'embryon, y compris l'imperméabilisation relative de sa membrane semi-perméable (c'est-à-dire son durcissement à l'eau) et le début du développement embryonnaire (c'est-à-dire la division cellulaire rapide chez l'embryon). La deuxième transition est celle de l'embryon à l'alevin (c'est-à-dire l'éclosion réussie) ; la troisième est celle de l'alevin à la truitelle (c'est-à-dire résorption de la vésicule vitelline et passage à l'alimentation externe).

La transition de l'œuf qui vient d'être fécondé au début du développement de l'embryon, avant l'imperméabilisation relative de la membrane de l'œuf (jusqu'à deux heures environ après la fécondation) est une période critique, pendant laquelle l'embryon est très vulnérable à l'exposition directe aux solutions toxiques²¹. C'est pourquoi on a normalisé le début de l'essai (E, EA et EAT) pour s'assurer que cette période coïncide avec l'exposition aux solutions d'essai. Pour maximiser la sensibilité et la comparabilité, l'essai devrait débiter le plus tôt possible après la fécondation et il doit débiter dans les 30 min qui suivent immédiatement le mélange complet, à sec, des œufs et de la laitance, auquel on accorde au moins 5 min et au plus 20 (§ 4.2).

Dans la transition de l'embryon à l'alevin (essai EA ou EAT seulement), le début du stade de l'alevin est défini comme le moment où la moitié du nombre initial d'œufs a éclos. L'observateur n'est pas susceptible d'enregistrer l'heure à laquelle 50 % exactement des poissons sont sortis de l'œuf ; dans la pratique, on note le temps où on compte pour la première fois comme éclos au moins la moitié des embryons et où le taux d'éclosion est assez près de 50 %. Dans l'essai EA, lorsque l'on constate pour la première fois l'éclosion de la moitié du nombre initial d'œufs témoins, on considère que le stade de l'alevin a débuté, et l'essai prend fin sept jours plus tard. À la fin, on dénombre tous les alevins survivants dans chaque répétition, afin de déduire le nombre et le pourcentage d'alevins non viables (c'est-à-dire les œufs non fécondés, les

21. Certains toxiques pourraient aussi diffuser au travers de la membrane, après le durcissement à l'eau et pourraient ainsi exercer un effet toxique sur l'embryon au-delà de cette période critique.

embryons morts, les embryons qui ne sont pas sortis de l'œuf ou les embryons qui ne se sont pas développés normalement)²².

Le début du stade de la truitelle se définit comme le moment où la moitié des poissons survivants nagent activement²³. Dans l'essai EAT, une étape de l'essai prend fin et l'étape finale commence lorsque la moitié des poissons témoins survivants commencent à nager. Il faut alors compter tous les alevins, tous les alevins difformes et toutes les truitelles dans chaque répétition, après quoi, on se débarrasse des alevins²⁴. On libère dans l'enceinte expérimentale une partie ou la totalité des truitelles de chaque répétition qui se trouvent dans l'incubateur ou les incubateurs. Au § 4.3.7, il est question du nombre de truitelles à utiliser et de la

22. On pourrait faire d'autres observations, plus particulièrement le pourcentage d'éclosion dans toutes les répétitions au moment où le taux d'éclosion chez les témoins est de 50 %. Les répétitions où le taux d'éclosion est inférieur à 50 % pourraient être surveillées pour enregistrer le temps où elles atteindront le taux d'éclosion de 50 %. Ces observations seraient utiles à la description du retard survenu à l'éclosion, qui fait partie de la documentation sur l'essai. À la fin de l'essai, on pourrait déterminer le stade d'évolution des embryons survivants (v. § 4.4), ce qui permettrait une comparaison plus détaillée de la vitesse de développement d'une concentration à l'autre.

23. Le poisson maîtrise alors ses évolutions dans la colonne d'eau, ordinairement gagnant la surface et s'y tenant pendant de longues périodes. Il a aussi résorbé sa vésicule vitelline. On dit que l'alevin s'est « boutonné ». Cependant, la résorption pourrait ne pas être complète et il pourrait subsister du vitellus dans l'abdomen. En conséquence, la capacité natatoire de l'alevin et sa capacité de se nourrir à l'extérieur sont, plus que la résorption de la vésicule vitelline, des indicateurs plus définitifs du stade de la truitelle.

24. Comme il peut être difficile de juger si la moitié des poissons ont commencé à nager pendant qu'ils sont confinés dans l'incubateur, il pourrait être utile de laisser aller le poisson dans l'enceinte expérimentale pour faciliter l'observation. Il n'est pas à conseiller de libérer les alevins prématurément dans l'enceinte expérimentale.

possibilité d'éclaircissage²⁵. On commence à nourrir les truitelles (v. § 4.3.8) et on continue pendant 29 journées consécutives. Ensuite, on les fait jeûner 24 heures, on met fin à l'exposition et on recueille les données sur les taux de mortalité, les anomalies et le poids moyen des truitelles survivantes dans les répétitions (v. § 4.4).

4.3.7 Réussite de la fécondation et éclaircissage

Quel que soit l'essai (E, EA ou EAT), on peut se faire une première idée de la réussite de la fécondation et de la viabilité des témoins quelques jours après la fécondation, en gardant des répétitions supplémentaires dans de l'eau témoin ou de dilution, dans des conditions identiques à celles des essais, en les clarifiant et en les examinant au microscope (v. note 28, § 4.4) pour y déterminer l'incidence des embryons non viables. Si le pourcentage moyen d'embryons témoins non viables (y compris les œufs non fécondés) est alors supérieur à 30 %, on doit mettre fin à l'essai et le reprendre à zéro en utilisant une autre population d'œufs fraîchement fécondés.

25. Le nombre de truitelles à utiliser, par répétition, à cette étape de l'étude dépend d'un certain nombre de facteurs, notamment du débit minimal de renouvellement des solutions, c'est-à-dire $\geq 0,5 \text{ L}/(\text{g}\cdot\text{j})$, de la taille des truitelles à cette étape, de la quantité nécessaire d'échantillons et de solutions, et du nombre de truitelles survivantes dans chaque répétition. Si l'on peut utiliser plus de 10 truitelles par répétition (p. ex. 15 à 30), tout en pouvant gérer ce nombre, on pourrait améliorer la sensibilité de l'essai.

Selon les objectifs de l'étude et la nature de la substance d'essai, on pourrait prélever à cette étape un ou des sous-échantillons d'au moins 10 truitelles survivantes de chaque répétition de l'essai EAT. Ces sous-échantillons pourraient ensuite être congelés ou autrement traités en vue d'analyses de la charge de certains contaminants dans les tissus. On devrait assurer la sélection aléatoire des sujets, en suivant les instructions sur l'éclaircissage données au § 4.3.7.

Le taux de réussite de la fécondation, le taux de survie jusqu'à l'éclosion et le développement des alevins peuvent varier fortement, d'un lot de gamètes à l'autre. Si un taux de fécondation de 100 % et un taux de survie de 100 % sont des témoins souhaitables, on les atteint rarement.

L'*éclaircissage* consiste à éliminer au hasard un certain nombre d'organismes en expérience d'une ou de plusieurs répétitions, afin de réduire l'encombrement, de maintenir une densité acceptable de charge ou réduire au minimum le volume des solutions d'essai exigés à chaque renouvellement (§ 4.3.2). On ne peut pas le pratiquer au cours de l'essai E ou EA, ni durant le stade de l'embryon ou de l'alevin de l'essai EAT. On pourrait croire qu'il est souhaitable d'entreprendre l'essai avec un nombre excédentaire d'œufs, puis de choisir des nombres égaux d'embryons viables lorsqu'il est possible de les distinguer des œufs apparemment infertiles, en raison du risque d'un faible taux de fécondation à toutes les concentrations y compris les témoins. Or, c'est cela qu'il ne faut pas faire, cependant, parce que cela pourrait compromettre la validité des tests statistiques. L'exposition au toxique avant l'éclaircissage pourrait influencer sur la viabilité à certaines concentrations, créant une distorsion dans le choix des organismes. Il n'y a qu'un seul moment dans l'essai EAT où l'éclaircissage est praticable, si on le souhaite, et c'est au début de la dernière étape de l'essai de mesure de la survie et de la croissance des truitelles (v. § 4.3.8).

Dans les préparatifs de l'essai EA ou EAT, on recommande des études préliminaires. Ces études devraient déterminer le nombre maximal d'embryons que l'on peut réunir, au début, dans chaque incubateur, sans

provoquer les effets négatifs dus à l'encombrement (p. ex. le manque d'oxygène ou l'accumulation des déchets du métabolisme). En étalant les embryons sur une seule couche sur le fond de l'incubateur, on facilite aussi la reconnaissance et le dénombrement rapides des embryons viables par rapport aux non viables (y compris les œufs non fécondés). Le nombre maximal par incubateur devrait être déterminé en fonction de la taille de l'embryon, du débit, des dimensions de l'incubateur, de la quantité de solution d'essai alimentant l'enceinte expérimentale et la taille prévue des alevins ou des truitelles à la fin de l'essai. Dans les cas où on suspend plus d'un incubateur dans l'enceinte expérimentale, on peut déplacer les embryons ou les alevins d'un incubateur à l'autre pour les répartir également. Cependant, il ne faut pas transvaser d'organismes d'une enceinte expérimentale (c'est-à-dire d'une répétition) à une autre.

Dans l'essai EAT, l'éclaircissage des truitelles peut précéder le début des 30 dernières journées d'exposition, c'est-à-dire au moment où la moitié des organismes témoins manifestent un comportement de nage. On pourrait le pratiquer pour satisfaire à la condition relative à la biomasse et réduire au minimum les besoins connexes en échantillon et en solution (§ 4.3.2). L'éclaircissage pourrait aussi viser à mieux équilibrer les effectifs, p. ex. égaliser le nombre de sujets par répétition pour la dernière étape de l'essai. Le degré d'éclaircissage peut être indépendant, d'une répétition à l'autre, et il n'est pas nécessaire qu'il soit équilibré d'une répétition à l'autre ou d'une concentration à l'autre. Le nombre de truitelles dans une répétition donnée doit, cependant, être réduit de façon aléatoire. On ne peut pas éclaircir les truitelles au cours de

la durée d'exposition de 30 jours, ce qui invaliderait l'essai²⁶.

Il est avantageux de conserver toutes les truitelles, plutôt que d'en sacrifier, si les installations et la quantité de substance d'essai l'autorisent. Toutes autres choses étant égales, plus le nombre d'organismes en expérience est élevé, plus les limites de confiance à l'égard des paramètres ultimes de mesures sont étroites, par exemple la CL 50 pour les truitelles. L'éclaircissage devrait, idéalement, aboutir à l'obtention du même nombre élevé de truitelles dans chaque répétition. Il est préférable de conserver dans chaque répétition au moins 10 truitelles, mais on pourrait en utiliser moins, au besoin, tant que l'on satisfait aux exigences minimales énumérées au § 4.3.8.

4.3.8 Étape finale de l'essai EAT

Lorsque l'on constate que la moitié des témoins survivants de l'essai EAT ont atteint le stade de la truitelle, débute alors la période finale de 30 jours d'exposition. On dénombre les alevins et les alevins difformes de chaque répétition, puis on les sacrifie. Ces données servent aux comptes rendus

26. En outre, l'éclaircissage ne peut pas se faire avant, ni pendant les essais E ou EA. L'éclaircissage effectué quand on est bien engagé dans l'exposition des sujets est des plus susceptible d'engendrer des déséquilibres et des distorsions, parce que les effets cumulatifs de l'exposition différeraient selon les concentrations. Il faut donc s'assurer de fournir aux organismes en train de se développer au moins le débit journalier de renouvellement de la solution par gramme de biomasse, c'est-à-dire au moins 0,5 L/(g.j). L'éclaircissage n'est autorisé qu'au début de la période d'exposition de 30 jours des truitelles, parce qu'on se trouve alors à la fin d'une étape de l'essai et de l'observation des effets exercés et au début d'une autre étape. Certains effets de la première étape de l'essai pourraient être reportés dans la deuxième, par le truchement de l'état de santé relatif des truitelles soumises aux diverses concentrations. On accepte cela comme faisant partie du résultat.

descriptifs des résultats de l'essai EAT (v. § 4.4). On dénombre aussi les sujets qui, dans chaque répétition, sont *non viables au début du stade de la truitelle* (v. § 4.4) et on enregistre cette donnée comme étant le premier paramètre (« ultime ») de mesure de l'essai EAT (§ 4.4).

On devrait libérer de l'incubateur les truitelles de toutes les répétitions, les laisser pénétrer dans l'enceinte expérimentale, puis on devrait les compter. Ce sont là les sujets que l'on peut utiliser à la dernière étape de l'essai. Au besoin, ou si on le souhaite, on pourrait éclaircir leurs effectifs (§ 4.3.7). On se sert par la suite de ces groupes de poissons pour les observations ultérieures de la mortalité, du comportement et de la croissance. Une répétition doit compter au moins cinq truitelles, faute de quoi il faut l'exclure de l'étape finale de l'essai EAT (30 j). À une concentration donnée, on doit disposer d'au moins deux répétitions, faute de quoi on n'expose pas de poissons à cette concentration. Il doit y avoir au moins deux répétitions du milieu témoin, chacune comptant au moins cinq truitelles, faute de quoi on ne peut réaliser cette dernière partie de l'essai EAT. On ne peut pas, pour satisfaire aux besoins, transférer des truitelles d'une répétition à l'autre. L'essai doit aller de l'avant avec un nombre inégal de répétitions ou un nombre inégal de truitelles par répétition²⁷.

27. Dans la partie finale de l'essai EAT (30 jours), les répétitions et les concentrations peuvent compter un nombre inégal de truitelles, et le nombre de répétitions peut être inégal. C'est là une issue moins souhaitable qu'un nombre équilibré de sujets et de répétitions, mais on peut encore se servir des résultats pour estimer un paramètre ultime de mesure. En autorisant un nombre inégal de truitelles (au moins cinq) par répétition ou inégal de répétitions (au moins deux) par concentration, on pourra inclure dans cette étape de l'essai certaines concentrations (élevées) qui, autrement, auraient été exclues.

On entreprend de nourrir des truitelles de chaque répétition et on poursuit leur alimentation pendant 29 jours, on les fait jeûner la dernière journée, puis on met fin aux 30 journées d'exposition et on effectue toutes les observations et mesures finales (§ 4.4).

On devrait nourrir les truitelles arcs-en-ciel avec un aliment de démarrage convenable. Chaque jour, la truitelle devrait recevoir 4 % de son poids en nourriture, en portions à peu près égales, au moins quatre fois par jour. On peut aussi utiliser des artémias venant d'éclore.

Le fond de chaque enceinte expérimentale devrait être nettoyé quotidiennement, par siphonnement, pour être débarrassé de toute accumulation de nourriture ou de matières fécales. Dans les essais avec renouvellement intermittent, on peut combiner l'opération avec le siphonnement et le remplacement quotidiens de chaque solution d'essai. On devrait veiller, au cours du siphonnement, à ne pas blesser le poisson. À l'embouchure du siphon, une crépine évite d'aspirer le poisson dans le tube.

4.3.9 Toxique de référence

L'utilisation systématique d'un toxique ou de toxiques de référence est pratique et nécessaire pour évaluer, dans des conditions normalisées, la sensibilité relative du groupe d'embryons utilisés ainsi que la précision et la fiabilité des données obtenues par le laboratoire à l'égard du ou des toxiques de référence (EC, 1990a). Il faut évaluer, au moment où on réalise chaque essai E, EA ou EAT, la sensibilité des embryons au(x) toxique(s) recommandé(s) de référence, en utilisant une partie du même groupe d'œufs fraîchement fécondés servant au démarrage de l'essai. L'essai toxicologique entrepris en

parallèle au début de ces essais devrait être un essai E, en raison de la longue durée de l'essai EA ou EAT.

Voici les critères qui font recommander les toxiques convenables de référence pour cet essai :

- produit facilement accessible à l'état pur ;
- stabilité en conservation (longue durée de conservation) ;
- forte solubilité dans l'eau ;
- stabilité en solution aqueuse ;
- danger minime pour l'utilisateur ;
- analyse précise et facile ;
- bonne courbe dose/effet pour les embryons de salmonidés ;
- influence connue sur le plan quantitatif et qualitatif, du pH sur la toxicité pour les organismes en expérience ;
- influence connue, sur le plan qualitatif et quantitatif, de la dureté de l'eau sur la toxicité pour les embryons d'arc-en-ciel.

On recommande comme toxiques de référence pour cet essai le phénol ou le zinc (préparé à l'aide du sulfate) de qualité réactif. On devrait évaluer la sensibilité des embryons arcs-en-ciel à l'un de ces toxiques ou aux deux dans des essais E et on devrait déterminer la CE 50 de l'une de ces substances ou des deux (v. § 4.5).

Les conditions et les modes opératoires des essais E employant un ou des toxiques de référence doivent être fidèles à ceux qui ont été décrits ailleurs dans le présent rapport.

On devrait utiliser dans une installation expérimentale, chaque fois que l'on y

exécute un essai avec toxique de référence, les mêmes conditions et modes opératoires (p. ex. avec renouvellement intermittent ou continu ; eau témoin ou de dilution de même origine). Les essais avec toxique(s) de référence appliqués aux embryons devraient normalement utiliser l'eau témoin ou de dilution servant aux essais E définitifs dans le laboratoire. Ou bien, si on souhaite un degré plus poussé de normalisation, on devrait préparer de l'eau douce reconstituée (d'une dureté de 40 à 48 mg/L en CaCO₃, d'un pH de 7,2 à 7,5 [v. note 37, § 5.4]). Cette eau devrait servir dans les milieux témoins et aux dilutions (USEPA, 1985b ; EC, 1990b).

On doit préparer une carte de contrôle (EC, 1990 et 1998b) et la mettre à jour pour chaque toxique de référence utilisé. Sur ce diagramme, on reporte les CIP. L'analyse de la carte permet de déterminer si les résultats se trouvent à $\pm 2 \sigma$ (limite de la zone de confiance) des valeurs obtenues au cours des essais antérieurs ayant utilisé le même toxique de référence et le même mode opératoire. On recalcule la moyenne et l'écart-type du logarithme des CE 50 disponibles à chaque essai successif jusqu'à ce que la statistique se stabilise (EC, 1990 et 1998b). La carte de contrôle devrait représenter le logarithme de CE 50 sur l'axe vertical en fonction de la date de l'essai (ou du numéro de l'essai) sur l'axe horizontal.

Dans tous les calculs de la moyenne et de l'écart type et sur tous les graphiques, on devrait utiliser le logarithme de la concentration (log CE 50). On continue ainsi d'adhérer à l'hypothèse selon laquelle on a estimé chaque CE 50 d'après le logarithme des concentrations. On peut construire la carte de contrôle en reportant les valeurs logarithmiques de la moyenne et ses limites

sur du papier graphique ordinaire ou en reportant les valeurs arithmétiques sur du papier logarithmique ou semi-logarithmique. Si on devait montrer catégoriquement que les CE 50 n'obéissent pas à la loi log-normale, la moyenne et des limites arithmétiques pourraient se révéler plus convenables.

On devrait comparer chaque nouvelle CE 50 du toxique de référence aux limites de la zone de confiance. On considère cette valeur comme acceptable si elle se trouve entre les limites de la zone de confiance. Si une valeur donnée de la CE 50 se retrouve à l'extérieur, la sensibilité des embryons ainsi que la réalisation et la précision de l'essai sont suspectes. Comme le phénomène pourrait survenir 5 % du temps, par le seul jeu du hasard, une CE 50 aberrante n'est pas nécessairement le signe d'une sensibilité ou d'une précision douteuses. Ce serait plutôt un avertissement que ce pourrait être le cas. La vérification de toutes les conditions et modes opératoires de l'essai et antérieurs à l'essai est pour le moment exigée.

Des résultats qui restent dans la zone de confiance, il ne faut pas déduire que le laboratoire obtient des résultats constants. Des résultats extrêmement variables que donne un toxique de référence élargissent la zone de confiance ; un nouveau résultat pourrait s'y retrouver même s'il représente un écart indésirable. Environnement Canada (1990) propose provisoirement comme limite raisonnable un coefficient de variation de pas plus de 30 %.

On devrait préparer les solutions mères de phénol la journée de leur utilisation. On devrait préparer les solutions mères de zinc immédiatement avant de les utiliser, auquel cas l'ajout d'un conservateur est inutile, ou

on pourrait les acidifier à l'acide nitrique de façon à en abaisser le pH à moins de 2, si on veut les entreposer (APHA *et al.*, 1995). Les solutions acides de zinc que l'on conserve devraient être gardées à l'obscurité, à 4 ± 2 °C, et on peut alors les conserver plusieurs semaines avant l'emploi. Le sulfate de zinc (habituellement $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dont le poids moléculaire est 4,398 fois celui du zinc) devrait servir à la préparation des solutions mères de zinc. La concentration de zinc devrait s'exprimer en mg de Zn^{++}/L .

On devrait doser par les méthodes convenables (p. ex. APHA *et al.*, 1995) les toxiques de référence présents dans toutes les solutions mères. Lors de la préparation des solutions, on devrait prélever des parties aliquotes des concentrations témoins, minimale, médiane et maximale et les analyser directement ou les conserver en vue d'une analyse ultérieure, si la CE 50 se révélait tomber à l'extérieur des limites de confiance. Les parties aliquotes d'échantillons, si on les entrepose, devraient être gardées à l'obscurité, à 4 ± 2 °C. Avant de les mettre en entreposage, on devrait ajouter aux solutions de zinc et de phénol un agent de conservation, selon les instructions convenables données dans APHA *et al.* (1995). Les parties aliquotes gardées en entreposage et qui exigent un dosage chimique devraient être analysées rapidement après la réalisation de l'essai toxicologique. Il est souhaitable de doser les mêmes solutions à la fin de l'essai, après avoir terminé les observations biologiques. Les calculs de la CE 50 devraient se fonder sur la moyenne géométrique des concentrations mesurées si ces dernières sont notablement différentes (c'est-à-dire d'au moins 20 %) des concentrations théoriques et si l'exactitude des analyses chimiques est satisfaisante.

4.4 Observations et mesures

Dans tous les essais, on devrait retirer tous les embryons, tous les alevins et toutes les truitelles manifestement morts (c'est-à-dire opaques) dès qu'on les découvre et en enregistrer le nombre. Il ne faut pas retirer les sujets vivants, qu'ils soient ou non difformes. Notamment, on ne devrait pas déranger ni retirer du milieu les embryons en développement qui ne sont manifestement pas morts, mais qui semblent atypiques, en vue de l'examen microscopique avant la fin de l'essai (si c'est un essai E) ou, du moins, tant que l'œil n'est pas visible (si c'est un essai EA ou EAT). Lorsque l'on récupère les cadavres, on devrait veiller à ne pas heurter ni endommager les embryons ou les alevins adjacents, qui sont alors extrêmement sensibles et délicats (v. § 4.2). On doit notamment prendre des précautions extrêmes pour ne pas déranger les autres embryons avant le stade de la formation de l'œil.

Dans tous les essais, on devrait recenser journallement tous les cadavres retirés de chaque répétition. Dans les essais de longue durée, il faudrait également recenser journallement le nombre de sujets éclos, le nombre de truitelles, le nombre d'alevins et de truitelles difformes et le nombre de truitelles présentant un comportement anormal, notamment : incoordination de la nage, tranquillité atypique, comportement d'alimentation atypique, hyperventilation, perte d'équilibre.

Il faut mesurer régulièrement les conditions expérimentales de la façon énoncée dans les autres paragraphes. Il faut mesurer journallement la température et la teneur en OD dans des enceintes expérimentales représentatives (§ 4.3.3 et 4.3.4). On doit

aussi mesurer l'OD dans chaque échantillon ou solution d'essai avant ce dernier et pratiquer au besoin une aération préalable (§ 4.3.4). Il faut mesurer le pH dans les solutions témoins et dans des enceintes expérimentales représentatives au début de l'essai, avant d'y admettre les embryons, et on devrait le mesurer journalièrement ensuite (§ 4.3.5). Dans les essais avec plusieurs concentrations, les mesures de la température, de l'OD et du pH doivent comprendre au moins les concentrations maximale, médiane et minimale plus le ou les solutions témoins. Dans le § 4.2, on recommande certaines mesures de la conductivité.

À la fin de l'essai E, normalement sept jours après la fécondation, il faut enregistrer dans chaque répétition les observations du nombre et du pourcentage d'embryons non viables, y compris des œufs non fécondés ainsi que des embryons vivants mais manifestement difformes (p. ex., bicéphales). À la fin de l'exposition, on devrait transvaser le groupe d'embryons et d'œufs non fécondés subsistant dans chaque incubateur, ensemble, dans une fiole étiquetée renfermant une solution de fixateur et d'agent clarifiant²⁸. Après clarification, on

28. On devrait déposer des embryons et les œufs non fécondés dans l'une des solutions suivantes jusqu'à leur clarification : solution saturée de sel (NaCl) ; solution de Stockard ; (mélange 85/6/5/4 d'eau, de glycérine, de formaldéhyde et d'acide acétique glacial ; ASTM, 1991a) ; ou mélange 1/1/1 d'acide acétique glacial, de méthanol et d'eau. Après clarification, on les examine sous un microscope de dissection pour déceler les signes de division du disque germinatif ou une traînée blanche qui est l'embryon. Si le contenu des fioles se trouble au cours de l'entreposage, on peut le clarifier de nouveau avant l'examen microscopique, par l'ajout d'une quantité supplémentaire de sel.

La coloration vitale pourrait se révéler avantageuse pour surveiller le développement embryonnaire,

devrait transvaser le contenu de la fiole dans un récipient peu profond, par exemple une nacelle, et on pourrait l'examiner soigneusement sous un stéréo-microscope à dissection (Yee *et al.*, 1996).

À la fin de l'essai E, on doit enregistrer comme *viable ou non viable* chaque embryon ou œuf non fécondé. Les embryons viables semblent s'être développés normalement jusqu'à l'étape typique des contrôles. Les non-viables comprendraient les œufs qui ne semblent pas fécondés, les embryons souffrant d'un retard marqué du développement et les embryons manifestement difformes ou autrement atypiques, y compris les jumeaux. Tout œuf non fécondé ou tout embryon qui s'est opacifié et qui a été retiré du milieu avant la fin de l'essai doit être compté comme embryon non viable. Si le dénombrement révèle que des sujets manquent à l'appel, comparativement au nombre initial, il faut les classer dans la catégorie des non-viables. Les observations devraient débiter avec les groupes témoins, pour se familiariser avec l'aspect des embryons normaux en cours de développement. Yee *et al.* (1996) donnent une série de microphotographies en couleur pour aider à distinguer les embryons viables des non viables. On trouve d'autres renseignements à ce sujet dans Vernier (1969) et Velsen (1980)²⁹.

différencier les embryons viables des non viables et confirmer le stade exact de développement où on se trouve à la fin de l'essai. Ce mode opératoire pourrait être mis en œuvre à l'aide d'au moins une répétition par concentration, que l'on réserverait à cette fin, si on voulait surveiller le développement des sujets. Il pourrait exiger une clarification du chorion par dissection, avant l'examen des embryons (Birge, 1992).

29. Au cours des quelques premiers jours de l'essai, il est difficile de distinguer les œufs non fécondés des embryons en développement, même après

Dans l'essai EA, sept jours après que l'on constate l'éclosion de la moitié des sujets dans le groupe témoin, ce qui marque la fin de l'essai, on détermine et on enregistre le nombre et le pourcentage d'alevins non viables dans chaque répétition. On classe tous les sujets comme *alevins viables* ou *non viables*. La non-viabilité englobe les échecs survenant à toutes les étapes : non-fécondation de l'œuf ; mortalité de l'embryon ou de l'alevin ; non-éclosion à la fin de l'essai ; embryons ou alevins manifestement difformes ou autrement atypiques (p. ex. bicéphales). Si le dénombrement révèle que certains sujets manquent à l'appel, d'après le nombre initial dans la répétition, il faut compter les disparus dans la catégorie des *alevins non viables*.

On effectue les observations des répétitions sept jours après que l'on a constaté un taux d'éclosion de 50 % chez les témoins. Dans chaque répétition, on compte le nombre d'œufs apparemment non fécondés, le nombre d'embryons morts, le nombre d'embryons vivants, le nombre d'alevins morts, le nombre d'alevins vivants mais difformes ou autrement atypiques et le nombre d'alevins vivants et apparemment normaux.

clarification et examen microscopique (v. note 28). Au-delà de cette courte période, on peut distinguer les jeunes embryons morts par la perte marquée de leur aspect translucide, leur changement de coloration causé par la coagulation ou la précipitation des protéines, qui leur donnent un aspect blanc opaque. Chez les embryons plus âgés (dont l'œil est visible), les signes de la mort sont l'absence de mouvement et de battement cardiaque. Chez les alevins et les truitelles, les signes de la mort sont l'immobilité et l'absence de réaction aux stimulus mécaniques, de même que l'absence de mouvement respiratoire et de battement cardiaque : on observe aussi habituellement une coloration blanc opaque du système nerveux central.

Il faut faire un compte rendu descriptif sur l'une des deux catégories d'effets observés au cours de l'essai EA ou les deux, lorsqu'il n'existe aucun paramètre officiel ultime de mesure. Dans chaque cas, il faut décrire les écarts apparents ou l'absence d'écart par rapport au témoin. On devrait fournir dans ce compte rendu des données numériques approximatives sur les écarts ou des données sous forme de tableaux, s'il y a lieu.

- *Éclosion retardée.* — Les comparaisons utiles avec les témoins pourraient être, selon le cas : a) les délais approximatifs pour parvenir au taux médian d'éclosion à chaque concentration ; b) le pourcentage approximatif et estimatif d'éclosion correspondant à chaque concentration au moment où le taux d'éclosion chez le groupe témoin est de 50 %.
- *Alevins difformes.* — Le pourcentage approximatif d'alevins difformes à chaque concentration, y compris dans le groupe témoin. Recenser les difformités tout au long de l'essai et les totaliser pour obtenir le nombre total d'alevins difformes (les morts comme les vivants). Exprimer en pourcentage du nombre ayant éclos à chaque concentration.

On pourrait faire d'autres observations et les signaler, si cela peut enrichir l'information tirée de l'essai, notamment : proportions d'embryons non viables et taux de mortalité chez les alevins après l'éclosion. L'essai E parallèle à l'essai EA renseigne sur les premiers stades du développement.

Dans l'essai EAT, la première étape fournit un paramètre de mesure fondé sur la non-viabilité au moment où les sujets accèdent au stade de la truitelle, tandis que la seconde étape fournit des paramètres discrets de

mesure sur la mortalité et la croissance des truitelles.

Sur chaque répétition de l'essai EAT, il faut déterminer et enregistrer le nombre et le pourcentage d'organismes *non viables au stade de la truitelle*, lorsque l'on constate que les groupes témoins ont accédé à 50 % à ce stade. On enregistre, dans cette catégorie de *non-viables*, tous les échecs à toutes les étapes jusqu'au début du stade de la truitelle : non-fécondation des œufs ; mortalité des embryons, des alevins ou des jeunes truitelles ; non-éclosion ; embryons, alevins ou jeunes truitelles manifestement difformes ou autrement atypiques. Si le dénombrement révèle que certains sujets manquent à l'appel, par rapport au nombre initial de sujets dans la répétition, on doit aussi les inclure dans la catégorie des *non-viables au stade de la truitelle*.

Les observations se font lorsque l'on a constaté, dans le groupe témoin, un taux de 50 % de truitelles. Dans chaque répétition, on compte le nombre d'œufs apparemment non fécondés, le nombre d'embryons morts, le nombre d'embryons vivants, le nombre d'alevins morts, le nombre d'alevins vivants mais difformes ou autrement atypiques, le nombre d'alevins vivants et apparemment normaux, le nombre de truitelles mortes, le nombre de truitelles vivantes mais difformes ou autrement atypiques et le nombre de truitelles vivantes et apparemment normales. On se débarrasse ensuite de tous les alevins, ce qui marque la fin de la première étape de l'essai EAT.

Débutent alors la deuxième étape de l'essai EAT. Cette étape compte 30 jours d'exposition pendant lesquels on nourrit les truitelles et on en mesure le taux de mortalité et le poids. S'il faut éclaircir les

groupes de truitelles, c'est le moment de le faire, avant d'entreprendre cette dernière étape (v. § 4.3.7). On peut garder les truitelles dans les mêmes enceintes ouvertes que celles qui ont servi dans la première étape de l'essai ou les transvaser dans des enceintes d'une plus grande capacité, si c'est nécessaire, pour continuer à respecter les conditions relatives à la biomasse, c'est-à-dire $\geq 0,5 \text{ L}/(\text{g}\cdot\text{j})$; (v. § 4.3.2), puisque les sujets se nourrissent et gagnent du poids au cours de cette étape.

Après 29 jours consécutifs d'alimentation, l'exposition se poursuit une autre journée, de jeûne. On enregistre alors le nombre de truitelles mortes dans chaque répétition au cours des 30 jours. Il faut enregistrer le poids sec total (après 24 h à 60 °C) du groupe de truitelles survivantes de chaque répétition, au centième de gramme près. On calcule le poids sec moyen des truitelles survivantes.

Les observations faites au cours de l'essai EAT doivent permettre de rédiger des comptes rendus descriptifs sur les trois catégories suivantes d'effets, qui ne possèdent pas de paramètre officiel de mesure. Dans chaque cas, il faut décrire succinctement les écarts apparents ou l'absence d'écart par rapport au groupe témoin. On devrait fournir dans ce compte rendu des données numériques approximatives sur les écarts ou des données sous forme de tableaux, s'il y a lieu.

- *Alevins difformes.* — Le pourcentage approximatif d'alevins difformes à chaque concentration, y compris dans le groupe témoin.
- *Accession retardée au stade de la truitelle.* — Les comparaisons utiles avec le témoin pourraient être, selon le

cas : *a*) les délais approximatifs pour parvenir au taux médian d'accession au stade de la truitelle à chaque concentration ; *b*) le pourcentage estimatif de sujets nageant librement, à chaque concentration, au moment où le taux de truitelles dans le groupe témoin est de 50 %.

- *Comportement anormal des truitelles.* — Signaler la nature du comportement anormal et son degré.

On pourrait faire d'autres observations et les signaler, si cela peut enrichir l'information tirée de l'essai, notamment : proportions d'embryons non viables, éclosion retardée (comme dans l'essai EA) et taux de mortalité chez les alevins après l'éclosion.

4.5 Paramètres de mesure et calculs

4.5.1 Paramètres biologiques de mesure

Les paramètres à estimer dépendent de l'option choisie (E, EA ou EAT), comme le montre l'énumération suivante.

- L'essai E évalue le nombre d'*embryons non viables*, c'est-à-dire le non-développement d'embryons qui survient parfois au cours de la période d'exposition débutant immédiatement après la fécondation. On estime l'un des paramètres suivants ou les deux pour le même effet : (1) la *concentration efficace se traduisant par un taux de 25 % d'embryons non viables* (CE 25) ; (2) la *concentration efficace médiane d'embryons non viables* (CE 50).
- L'essai EA se fonde sur les nombre d'*alevins non viables*, c'est-à-dire la non-atteinte du stade de l'alevin d'une façon opportune et normale en raison d'un dérèglement à un stade antérieur, notamment la non-fécondation des œufs, la mort d'embryons ou d'alevins, la non-éclosion à la fin de l'essai et un développement anormal. Pour le même effet, on obtient l'un des deux paramètres suivants de mesure ou les deux : (1) la *concentration efficace à laquelle 25 % des sujets n'évoluent pas normalement jusqu'au stade de l'alevin* (CE 25) ; (2) la *concentration efficace médiane empêchant l'évolution normale jusqu'au stade de l'alevin* (CE 50).
- L'essai EAT possède les trois paramètres de mesure suivants : on considère l'effet le plus sensible (c'est-à-dire celui qui correspond à la concentration la plus basse) comme une indication définitive de la toxicité (Woltering, 1984 ; Birge et Black, 1990).
- Les *organismes non viables au stade de la truitelle* comprennent les sujets ne survivant pas à cette étape ou à toute étape antérieure : non-fécondation des œufs ; mort des embryons ; non-éclosion ; mort des alevins, mort des jeunes truitelles ; embryons, alevins ou jeunes truitelles manifestement difformes ou autrement atypiques. Pour cet effet, on estime l'un des deux paramètres suivants de mesure ou les deux : (1) la *concentration efficace à laquelle 25 % des sujets ne se développent pas normalement jusqu'au début du stade de la truitelle* (CE 25) ; (2) la *concentration efficace médiane empêchant l'évolution normale jusqu'au début du stade de la truitelle* (CE 50).
- Le *taux de mortalité des truitelles* mesure, à la fin de l'essai, la mortalité survenue au cours des 30 journées d'exposition des truitelles. On ne compte pas la mortalité antérieure à cette étape.

On estime un paramètre ultime de mesure, la *concentration létale médiane pour les truitelles* (CL 50).

- Le *poids des truitelles* mesure le poids sec moyen des truitelles survivantes, relativement à celui du groupe témoin, à la fin de l'essai, au bout de 30 jours d'exposition. C'est essentiellement une mesure du croît, sauf que l'on n'a pas mesuré le poids initial. On estime un paramètre de mesure, la *concentration inhibitrice entraînant un écart de 25 % entre le poids sec des truitelles exposées et le poids des groupes témoins*, chez les truitelles survivantes à la fin de l'essai (CI 25). On pourrait obtenir un paramètre supplémentaire de mesure en estimant la CSEO et la CEMO, puis en calculant la CESO, si on le souhaite et si on dispose à cette fin un nombre suffisant de répétitions.

Il faut rédiger plusieurs comptes rendus descriptifs sur les observations additionnelles faites au cours des essais EA et EAT, comme nous les énumérons dans les alinéas qui suivent. Ce ne sont pas des paramètres ultimes officiels de mesure et ils n'exigent ni dénombrement ni opération statistique rigoureux. Néanmoins, ces comptes rendus sont exigés comme documentation sur l'essai (v. section 8). Dans chaque cas, on doit décrire rapidement les écarts apparents ou l'absence d'écart par rapport au groupe témoin. On devrait fournir dans ce compte rendu des données numériques approximatives sur les écarts ou des données sous forme de tableaux, s'il y a lieu. Certaines de ces observations pourraient aider à expliquer les résultats obtenus à l'égard des paramètres officiels de mesure déjà énumérés. Un écart apparent par rapport au groupe témoin est chaque fois considéré comme une indication de la

toxicité, mais, faute d'analyse statistique formelle, on ne peut pas le considérer comme définitif.

- *Éclosion retardée (essai EA)*. — Les comparaisons utiles avec les témoins pourraient être : a) les délais approximatifs pour parvenir au taux médian d'éclosion à chaque concentration ; et/ou b) le pourcentage approximatif et estimatif d'éclosion correspondant à chaque concentration au moment où le taux d'éclosion chez le groupe témoin est de 50 %.
- *Alevins difformes (essais EA et EAT)*. — C'est le nombre d'alevins difformes observés tout au long de l'essai (survivants et morts), en pourcentage du nombre éclos à cette concentration.
- *Accession retardée au stade de la truitelle (essai EAT)*. — Les comparaisons utiles avec les témoins pourraient être : a) les délais approximatifs pour parvenir à 50 % de truitelles dans chaque répétition ou concentration ; et/ou b) le pourcentage de truitelles au moment où le taux d'éclosion dans le groupe témoin est de 50 %.
- *Comportement anormal des truitelles (essai EAT)*. — Il faut signaler la nature et la prévalence des comportements anormaux.

On pourrait faire d'autres observations, si on voulait plus d'information, mais elles ne seraient pas considérées comme des paramètres officiels de mesure de l'essai. Ce pourrait être notamment la proportion d'embryons non viables (essais EA et EAT), le retard dans l'éclosion (essai EAT) et la mortalité chez les alevins après l'éclosion,

observés de façon ponctuelle au stade de l'alevin (essais EA et EAT).

4.5.2 Concentrations efficaces et létales

Pour les effets toxiques fondés sur la CE 50, la CE 25 ou la CL 50 (§ 4.5.1), on applique les étapes suivantes au calcul du paramètre ultime de mesure :

- Dénombrer les sujets touchés (ou manquants) dans chaque répétition, mais totaliser les chiffres pour les répétitions d'une concentration donnée.
- On ne peut pas estimer la CE 50 ou la CL 50 à moins qu'une concentration n'aboutisse à un effet touchant au moins 50 % des sujets. On ne peut pas estimer de même la CE 25, à moins que la concentration ne se traduise par un effet touchant au moins 25 % des sujets.
- À l'égard de la CE 50 ou de la CE 25, appliquer la formule d'Abbott aux nombres combinés, pour autoriser un effet de contrôle raisonnable (voir les paragraphes qui suivent). Cela s'applique aux paramètres de mesure qui intègrent la réussite de la fécondation.
- Utiliser la méthode des probits, pour calculer la CE 50 et la CE 25 ou la CL 50 et leurs limites de confiance à 95 %.
- Si les résultats ne satisfont pas aux exigences de la méthode des probits, utiliser la méthode binomiale pour calculer la CE 50 ou la CL 50 et l'intervalle qui couvrirait les limites de confiance à 95 %. Estimer la CE 25 de façon moins formelle, par interpolation ou par d'autres statistiques quantiques acceptables.

Voici des observations sur chacune de ces étapes.

Répétitions. — On compte les sujets touchés (ou manquants) dans chaque répétition, mais on combine les chiffres correspondant à une concentration donnée. Le mode opératoire utilise trois répétitions, pour faciliter les manipulations, obtenir la charge voulue au cours de l'essai et servir de police d'assurance en cas de perte accidentelle d'une enceinte expérimentale ou d'autres problèmes. Le meilleur emploi à trouver aux données qui en résultent est de combiner les répétitions pour obtenir un grand nombre de sujets pour une analyse donnée, ce qui permet de resserrer les limites de confiance.

Restrictions concernant les données. — On ne reconnaît comme valide l'extrapolation des paramètres ultimes de mesure à partir de l'observation d'un effet moins intense. On peut estimer la CE 50 et la CL 50 uniquement à la condition qu'au moins une concentration entraîne un effet touchant au moins 50 % des sujets. De même, on ne peut pas estimer la CE 25 si une concentration n'entraîne pas un effet touchant au moins 25 % des sujets.

Formule d'Abbott (v. Finney, 1971 ou EC 1998b). — Sauf indication du contraire, dans Environnement Canada (1998b), cette formule devrait servir au calcul de la CE x dans les essais E et EA ainsi qu'au calcul de la non-viabilité au début du stade de la truitelle, dans l'essai EAT. La formule permet de corriger l'effet observé, à chaque concentration, par le pourcentage d'effet exercé chez les témoins, ce qui aide à ajuster les écarts de fécondation qui, d'un essai à l'autre, sont attribuables aux variables et aux gamètes (Yee *et al.*, 1996). La formule s'applique après que l'on a combiné les résultats des répétitions.

Pour que ces essais soient valides, le taux d'échec de la fécondation ne doit pas

excéder 30 % (§ 4.6). Le même taux s'applique aux embryons non viables chez les témoins de l'essai E ; la formule d'Abbott devrait s'appliquer à tout effet, jusqu'à concurrence de 30 % chez les témoins. L'essai EA, plus long, concernant les alevins non viables, autorise un taux d'effet de 35 % chez les témoins, à la fin de l'essai, avant de le considérer comme invalide (§ 4.6), et l'on devrait utiliser la formule d'Abbott pour tenir compte de cet effet. L'essai EAT, encore plus long, qui se fonde sur la viabilité des truitelles, autorise un taux d'effet de 40 % chez les témoins avant de considérer l'essai comme invalide (§ 4.6). La formule d'Abbott devrait servir à tenir compte de l'effet observé chez les témoins.

La formule d'Abbott ne doit pas servir à corriger la mortalité compte tenu de celle des témoins dans la deuxième étape de l'essai EAT, avec les truitelles, sauf indication du contraire dans Environnement Canada (1998b). Si, chez les témoins, le taux de mortalité possède 20 % au cours des 30 jours de l'essai, ce dernier est invalide (§ 4.6). Il serait peu avantageux d'utiliser la formule d'Abbott pour appliquer un taux de correction pouvant atteindre 20 %, parce cela influencerait peu sur la valeur calculée de la CL 50³⁰.

30. L'emploi de la formule d'Abbott est motivé dans un guide statistique d'Environnement Canada (EC, 1998b). La correction d'Abbott peut servir à ajuster un effet modéré, observé chez le groupe témoin, dans le cas des paramètres ultimes de mesure qui englobent la réussite de la fécondation. Dans certains essais employant des salmonidés, le taux de fécondation pourrait être faible (c'est-à-dire que le taux d'échec peut atteindre 30 % et que, au-delà, l'essai est considéré comme invalide). Cependant, la fécondation survient avant le début de l'exposition à la substance d'essai, de sorte que la réussite de la fécondation n'est pas reliée aux conditions expérimentales. En outre, la réussite de la fécondation est inconnue au début de l'exposition, de sorte que

Méthode des probits. — Le choix des méthodes statistiques est le même pour chaque analyse visant à déterminer la CE x ou la CL 50. Nous donnons dans le présent rapport des instructions générales sur les démarches statistiques ; des conseils supplémentaires se trouvent dans Environnement Canada (1998b).

À la condition d'avoir choisi l'intervalle convenable de concentrations d'essai et à la condition que des effets partiels se soient manifestés à deux concentrations, on peut recourir à la méthode des probits. Si l'effet — corrigé par la formule d'Abbott — n'atteint pas 50 % à au moins une des concentrations, on ne peut estimer ni la CE 50 ni la CL 50. De même, on ne peut pas estimer la CE 25 à moins d'observer un effet chez 25 % des sujets à une concentration au moins. Si, à une concentration donnée, l'effet est nul, cette information sert à chiffrer l'effet à 0 %. Cependant, si des concentrations successives donnent une série d'effets nuls, une seule d'entre elles sert à estimer la CE 50 et la CL 50, et ce devrait être la concentration maximale de la série, c'est-à-dire celle où l'effet nul est le plus près de la médiane de la distribution des données. De même, si l'on avait observé une série d'effets successifs touchant la totalité des sujets (p. ex. 100 % de non-éclosion aux concentrations supérieures utilisées dans

l'on ne peut appliquer aucune sélection ni correctif avant d'exécuter l'essai toxicologique. C'est pourquoi on autorise la correction (à l'aide de la formule d'Abbott) d'un taux modéré d'échec de la fécondation, pour ce qui concerne les paramètres de mesure mettant en cause la fécondation.

L'emploi de la formule d'Abbott n'est cependant pas autorisé dans l'essai de mesure de la létalité jusqu'au stade de la truitelle. Il s'agit d'un essai quantique simple portant sur 30 journées d'exposition, et le taux de mortalité chez le groupe témoin devrait être faible, quand les conditions sont favorables.

l'essai), on n'utiliserait qu'une seule valeur correspondant à cet effet, encore une fois celle qui est la plus rapprochée de la médiane, c'est-à-dire l'effet à 100 % observé à la plus faible de ces concentrations. Le fait d'utiliser des valeurs supplémentaires correspondant à l'effet nul et/ou total serait susceptible d'entraîner une distorsion dans l'estimation de la CE 50 ou de la CL 50.

On peut se servir de TOXSTATZ (West et Gulley, 1996) ou d'autres progiciels du commerce pour appliquer la méthode ordinaire des probits. Ils permettent d'estimer la CE 50 et la CL 50 et leurs limites de confiance à 95 %. Ces programmes permettent aussi d'estimer la CE 25 et ses limites de confiance ou toute autre CE x choisie.

Il existe un programme statistique en langage BASIC, adopté de Stephan (1977) et simple d'emploi, que l'on peut obtenir d'Environnement Canada (v. annexe B) pour calculer la CE 50 ou la CL 50 avec une limite de confiance à 95 % par la méthode des probits. Le programme permet aussi d'estimer la CE 50 et la CL 50 par la méthode binomiale. On estime aussi la CE 50, avec ses limites de confiance à 95 %, par la méthode des moyennes mobiles, mais cette méthode n'offre aucun avantage sur celle des probits.

On devrait calculer la CE 25, outre la CE 50, pour obtenir un paramètre ultime de mesure quelque peu plus sensible. Certains programmes de surveillance, des règlements ou des expériences pourraient exiger le calcul d'un autre paramètre tel que la CE 20. On peut se servir de programmes du commerce, y compris de TOXSTAT, pour calculer la CE 25 et ses limites de confiance à 95 %. On devrait cependant être conscient du fait que la précision diminue

progressivement quand on détermine ces effets moindres. En outre, les limites de confiance s'élargissent d'autant. On ne recommande pas d'estimation inférieure à la CE 20 (EC, 1998b).

On doit utiliser la *méthode binomiale* pour estimer la CE 50 ou la CL 50 si les données ne dégagent pas au moins deux effets partiels (c'est-à-dire un effet entre 0 et 100 %). Le programme de Stephan (1977) susmentionné est le seul programme informatique connu qui repose sur cette méthode. Le programme calcule aussi les limites extérieures prudentes (larges) à l'intérieur desquelles les véritables limites de confiance de la CE 50 et de la CL 50 se trouveraient. Malheureusement, le programme de Stephan ne permet pas d'estimer la CE 25.

On peut calculer « à la main » un équivalent simple de l'estimation de la CE 50 et de la CL 50 par la méthode binomiale, dans les cas où une concentration entraîne un effet nul et que la concentration supérieure suivante entraîne un effet total. La moyenne géométrique des deux concentrations est la meilleure estimation de la CE 50. Les deux concentrations représentent presque toujours des estimations prudentes des limites de confiance, mais ce n'est pas invariablement le cas, et l'on devrait donner des conseils de prudence quand on les présente comme limites probables. (L'utilité du programme de Stephan est de calculer les probabilités et de choisir les concentrations qui auront incontestablement une portée plus grande que les véritables limites de confiance.) Le calcul « manuel » de la moyenne géométrique peut se faire en passant par le logarithme des concentrations que l'on convertit ensuite en valeur arithmétique. On peut aussi la calculer en extrayant la racine carrée du produit des deux concentrations

dont l'une engendre un effet nul et l'autre un effet total.

On peut aussi calculer la CE 25 à la main, dans les cas où la méthode des probits n'est pas valide. On utilise les probits des proportions observées, pour interpoler le probit auquel, prévoit-on, correspond l'effet à 25 %. Pour les calculs, on utilise les logarithmes de la concentration. On transforme le logarithme obtenu pour la CE 25 en une valeur arithmétique. On peut aussi estimer la CE 25 par une méthode graphique, sur papier log-probabilité. On peut se procurer ce papier dans certaines librairies universitaires ou techniques, ou on peut le copier de la figure qui se trouve dans Environnement Canada (1998b). On peut convertir les pourcentages en probits à l'aide des tables qui se trouvent dans Finney (1971), Newman (1995) ou dans certains manuels de statistique.

Les méthodes binomiales ou manuelles actuelles de calcul de la CE 25 ne fournissent aucune limite de confiance.

4.5.3 Concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet précis

La CI_p et, notamment, la CI 25, sont recommandées comme estimations ponctuelles de la concentration provoquant un certain effet sur des fonctions biologiques quantitatives (graduées), par exemple le poids atteint par les truitelles dans l'essai EAT (§ 4.5.1). Le chercheur choisit le pourcentage p , mais il est habituel de retenir le taux de 25 % (ou de 20 %) pour une performance inférieure à celle du témoin (EC, 1998b). La CI 25 est un paramètre formel de mesure que l'on doit calculer dans l'essai EAT, pour déterminer le poids sec moyen des truitelles après 30 jours d'exposition et d'alimentation. Les limites

de confiance à 95 % doivent aussi être calculées et signalées pour chaque CI_p, afin de permettre les comparaisons statistiques avec d'autres valeurs du genre.

L'analyse visant à déterminer la CI 25 du poids sec moyen des truitelles devrait débiter par le tracé, à la main, du pourcentage de retard pondéral des truitelles par rapport à celles du témoin, en fonction du logarithme de la concentration d'essai. L'objet de ce travail à la main est de vérifier le caractère raisonnable des résultats que donneront les calculs mathématiques ultérieurs. Le pourcentage de retard du croît se calcule, pour une répétition donnée, à partir du poids sec moyen des truitelles survivantes de cette répétition, par rapport au poids moyen global atteint dans les répétitions témoins. On devrait porter sur le graphique le pourcentage de retard du gain de poids de chaque répétition, de façon séparée. On devrait lire la valeur approximative de la CI 25 à partir d'une ligne ajustée à l'œil. Il faut résoudre tout écart important entre la CI 25 approximative déterminée par méthode graphique et la CI 25 calculée ultérieurement sur l'ordinateur. Le graphique montrerait aussi si l'on a obtenu un rapport positif et logique entre la concentration et l'effet caractéristique souhaitable d'un essai valide (EC, 1998b).

Actuellement, la méthode informatisée normale d'estimation de la CI_p avec des limites de confiance de 95 % se fonde sur le lissage des courbes et l'interpolation à l'aide du programme ICPIN (Norberg-King, 1993 ; USEPA, 1994 ; EC, 1998b). Cette modification du programme BOOTSTRP (Norberg-King, 1988) fait partie de la dernière version de TOXSTATZ (West et Gulley, 1996). Le programme ICPIN lisse d'abord les données, au besoin, estime la

CIp, par simple interpolation, puis obtient les limites de confiance, par une méthode dite « bootstrap », de nombreux rééchantillonnages aléatoires à partir des observations réelles (USEPA, 1994, annexe M ; ou EC, 1998b). Pour utiliser ce programme, les chercheurs canadiens doivent soit : a) introduire les concentrations sous forme logarithmique ; b) si la transformation logarithmique est offerte dans un progiciel, s'assurer qu'elle est de fait retenue pour l'analyse. Au moment d'écrire ces lignes, le programme ICPIN semble la seule méthode usuelle de calcul de la CIp avec ses limites de confiance, mais la régression linéaire ou générale procurerait de meilleures estimations (EC, 1998b)³¹. Les chercheurs devraient être à l'affût des progiciels améliorés d'écotoxicologie.

On devrait appliquer certaines contraintes logiques aux estimations de la CI 25. Celle-ci ne devrait pas découler d'une extrapolation. Pour estimer la CI 25, on devrait pouvoir utiliser au moins une concentration abaissant la performance de plus 25 % par rapport au groupe témoin et

31. Actuellement, la méthode qu'utilise le programme ICPIN pour le lissage et l'interpolation linéaire semble la seule usuelle pour obtenir les limites de confiance d'une CIp. Elle souffre de certains défauts de l'interpolation linéaire, tels que la nécessité d'une « non-augmentation monotone des réponses » (USEPA, 1989 et 1994), p. ex. dans un essai EAT, on ne devrait pas observer de plus grosses truitelles à la concentration élevée qu'à la concentration inférieure. Ce n'est pas toujours le cas dans les essais toxicologiques fondés sur la croissance, et la correction apportée par le lissage peut introduire une distorsion dans l'estimation de la CIp par interpolation linéaire. Ensuite, la CIp est interpolée entre deux concentrations supérieure et inférieure, mais le reste de la relation entre la concentration et l'effet ne sert pas à l'estimation finale. Enfin, l'interpolation visant à estimer la CIp concerne des concentrations arithmétiques plutôt que logarithmiques, ce qui introduirait une légère erreur systématique dans le calcul de la CIp.

au moins une concentration l'abaissant de moins de 25 % (mais l'abaissant plus que chez le groupe témoin, c'est-à-dire exerçant un effet non nul)³². La variabilité est supérieure dans les parages des extrêmes de la relation et, notamment, des réductions observées de 0 et de 100 % apporteraient peu d'informations utiles à l'estimation juste de la CIp.

Le calcul de la CIp repose sur l'hypothèse d'une réduction de la performance des organismes en expérience par rapport à ceux du groupe témoin. Dans certains cas, on pourrait observer un effet stimulant aux faibles concentrations (p. ex. accélération de la croissance), mais un effet inhibant aux concentrations supérieures. On ne peut pas supposer que la stimulation soit strictement positive ou bénéfique, pas plus que l'on peut toujours affirmer que l'inhibition soit un effet strictement négatif. Ce que l'on mesure, c'est un écart par rapport à la norme (c'est-à-dire au groupe témoin). Les théoriciens sont divisés : doit-on considérer les effets stimulants à faible concentration (*hormèse*) comme un effet subléthal, dans le calcul de la CIp ? Doit-on plutôt les considérer comme un effet « témoin » parallèle ? Ou, encore doit-on les combiner à la réaction des témoins (comme le fait automatiquement, pour le lissage, le programme ICPIN). Cette dernière option n'est pas recommandée à l'égard de la croissance des truitelles dans l'essai EAT. Nous proposons ici, si l'on constate un effet stimulant, de signaler les résultats de l'essai de deux façons : (1) considérer l'effet

32. La qualité et la distribution des autres résultats de l'essai influent aussi sur la valeur de l'estimation d'une CIp extrême, et on ne peut pas fournir de lignes directrices fermes sur la justesse exigée d'une donnée observée particulière par rapport à l'effet auquel on s'intéresse. L'étalement des limites de confiance donnera toujours une idée de la fiabilité de la CIp.

stimulant comme un écart négatif, et rédiger un compte rendu descriptif du degré de stimulation et de la ou des concentrations qui y correspondent ; (2) lors de l'introduction des données dans le programme pour le calcul de la CI 25, ne pas tenir compte des concentrations correspondant à l'effet stimulant, c'est-à-dire ne pas les saisir. On évite ainsi de déplacer vers le haut, par les calculs, la réaction des témoins.

4.5.4 CSEO et CEMO

Si on le veut, on peut utiliser le test d'hypothèse, en estimant la *concentration sans effet observé* (CSEO) et la *concentration à effet minimal observé* (CEMO). On peut les obtenir, par calcul statistique, à partir des mêmes données quantitatives (graduées) que celles qui ont servi à estimer la CI 25 relative au poids des truitelles (v. § 4.5.3). Si on utilise la CSEO, il faut aussi calculer et signaler l'*écart significatif minimal* (voir ci-dessous).

L'emploi du rapport CSEO/CEMO comme paramètre ultime de mesure souffre de certaines limites. La CSEO n'est pas la concentration sans effet, mais, plutôt, la concentration à laquelle ne correspond pas d'écart statistiquement significatif. La concentration qui s'est révélée être la CSEO pourrait dépendre en grande partie de la taille de l'échantillon, du nombre de répétitions et de la variabilité à l'intérieur de ces dernières. Le laboratoire dont les résultats seraient très variables ou qui aurait utilisé peu de répétitions pourrait obtenir une CSEO supérieure à celle du laboratoire dont les résultats auraient été moins variables et qui aurait utilisé un plus grand nombre de répétitions.

On pourrait déterminer la CSEO et la CEMO correspondant au poids sec moyen

des truitelles survivantes de chaque répétition au terme des 30 jours d'exposition. Si tous les sujets d'une répétition devaient mourir, on exclurait cette répétition, et l'analyse deviendrait asymétrique. De même, si tous les sujets de toutes les répétitions devaient mourir à une concentration donnée, cette concentration serait exclue de l'analyse.

Le programme TOXSTATZ énonce la méthode statistique à suivre³³. Le programme commence par vérifier la normalité et l'homogénéité des données et il fournit les tests de signification convenant aux types particuliers de distribution. Il fournit aussi les tests convenables dans les cas où le nombre de répétitions est inégal en raison de pertes accidentelles ou pour d'autres causes.

Si la distribution des données obéit à la loi normale ou si, à défaut, le programme peut lui faire subir une transformation convenable, il effectue une analyse de la variance. Habituellement, le test de *Williams* permettra de constater les écarts correspondant à chaque concentration. Accessible dans le programme TOXSTAT, il est sensible à l'association entre le degré d'effet et le classement des concentrations par ordre d'intensité. Ce test (*Williams*,

33. Nous n'exposons pas dans le détail les méthodes utilisées par ce programme (West et Gulley, 1996), parce que le mieux est de suivre les instructions écrites accompagnant le programme sur disquette. On peut se procurer la version actualisée (c'est-à-dire 3.5 ou ultérieure) sur disquette, en s'adressant à WEST, Inc. (2003 Central Avenue, Cheyenne [WY], 82001). Le programme, pour le décrire rapidement, vérifie la normalité des données par le test de *Shapiro-Wilks* et leur homogénéité par celui de *Bartlett*. Si les données ne satisfont pas aux exigences, on pourrait les mettre sous forme logarithmique ou arc sinus. La transformation risque de réduire la sensibilité de l'analyse et la capacité de l'essai toxicologique de déceler les différences.

1971 ; 1972) est recommandé parce que plus puissant que celui de *Dunnnett*, qui ne tient pas compte de l'ordre des concentrations (Masters *et al.*, 1991). Si le nombre de répétitions est inégal, on utilise à la place du test de Williams le *test t de Bonferroni*. Tous ces tests sont des tests de comparaison multiple, qui estiment l'écart significatif minimal, c'est-à-dire l'ampleur de l'écart entre les moyennes qui devraient exister entre le groupe témoin et une concentration d'essai avant que l'on puisse conclure que l'effet correspond à cette concentration est significatif (discuté dans USEPA, 1989 et 1994 ; et EC, 1998b).

Si un ensemble de données ne peut pas satisfaire à la normalité ou à l'homogénéité et ne peut pas être transformé pour s'y conformer, le programme TOXSTAT fournit des tests non paramétriques (*test multi-univoque de Steel* ou *test de sommation des rangs de Wilcoxon*, dans le cas d'un nombre inégal de répétitions). Ces tests non paramétriques peuvent s'appliquer aux données dont la distribution n'obéit pas à la loi normale, et ce sont des outils puissants pour ces données. Les tests non paramétriques sont moins puissants que les tests paramétriques, cependant, lorsqu'on les applique à des données obéissant à la loi normale et, dans ce cas, ils pourraient ne pas déceler de différences réelles dans l'effet, c'est-à-dire sous-estimer l'éventuelle toxicité. Il faut aussi se rappeler qu'il faut quatre répétitions pour utiliser les méthodes non paramétriques.

On peut calculer la moyenne géométrique de la CSEO et de la CEMO (c'est-à-dire la *concentration avec effet de seuil observé* ou CESO), pour faire l'économie d'un paramètre au lieu d'avoir à en manipuler deux. On peut utiliser cette valeur et la signaler, reconnaissant qu'elle représente

une estimation arbitraire du seuil d'un effet décelé par une méthode statistique, qui pourrait se trouver n'importe où dans l'intervalle borné par la CEMO et la CSEO. La CESO calculée dépend des concentrations que l'on s'est trouvé à sélectionner pour l'essai. On ne peut pas estimer de limites de confiance pour la CESO, comme c'est aussi le cas pour la CSEO et la CEMO, bien que ces dernières indiquent les limites extérieures de l'estimation.

La signification de « seuil » dans l'expression *effet de seuil observé* est celle du dictionnaire, c'est-à-dire le point auquel on commence à observer un effet. Les effets non décelés peuvent exister à des concentrations inférieures. La moyenne géométrique de la CSEO et de la CEMO est souvent appelée « valeur chronique » (*chronic value*) aux États-Unis, mais l'expression porte quelque peu à confusion. Les options E, EA et EAT décrites dans le présent rapport se déroulent sur moins de 10 % de la durée de vie prévue de la truite arc-en-ciel ; on ne devrait donc pas qualifier les effets qu'elles permettent d'observer comme chroniques.

4.5.5 *Test t de Student*

Si, pour l'essai, on n'utilise qu'une seule concentration, le *test t de Student* est normalement la méthode qui convient pour comparer les résultats donnés par cette concentration avec ceux du groupe témoin. On peut trouver la méthode à suivre pour appliquer ce test dans n'importe quel manuel de statistique. L'effet de la substance d'essai est accepté si l'effet mesuré par un paramètre ultime et normal de mesure diffère de façon significative de la même statistique donnée par le groupe témoin (c'est-à-dire le pourcentage d'embryons non viables, d'alevins non viables, de truitelles

non viables, taux de mortalité des truitelles et poids moyen des truitelles). On pourrait aussi appliquer le test aux effets recommandés pour des observations supplémentaires et aux comptes rendus descriptifs connexes, si l'effet a été documenté de façon sûre et numérique (c'est-à-dire, éclosion retardée, alevins difformes, taux de mortalité chez les alevins, stade de la truitelle retardé ou comportement anormal des truitelles). Il faut satisfaire aux exigences concernant l'homogénéité de la variance et la normalité de la distribution (USEPA, 1994, annexe B ; EC, 1998b) avant d'utiliser le test *t* normal. Si les données ne satisfont pas aux exigences, on pourrait choisir un test non paramétrique, sur les conseils d'un statisticien ; aucun test ne semble encore s'être imposé comme la norme.

4.5.6 Test de Tukey

Parfois, les variantes d'un essai pourraient ne pas représenter les diverses concentrations que l'on trouve dans un seul échantillon d'eau usée ou de produit chimique, mais plutôt un ensemble d'échantillons différents, par exemple les effluents non dilués de différentes industries ou des échantillons d'eaux de surface prélevés en différentes localités. On pourrait vouloir vérifier non seulement si chaque échantillon diffère du groupe témoin, mais, aussi, si les échantillons diffèrent les uns des autres. Le *test de Tukey* permet de répondre à cette question (c'est une option dans le programme statistique TOXSTAT ; West et Gulley, 1996). Ces batteries de tests devraient signaler les résultats de chaque échantillon en pourcentage d'effet pour le(s) paramètre(s) retenu(s), exprimés en pourcentage observé du ou des témoins et elles devraient déterminer (à l'aide du test de Tukey) si ce nombre est significativement différent de la valeur correspondante chez le témoin.

4.6 Validité de l'essai

Dans l'hypothèse où on a suivi tous les modes opératoires recommandés et que l'on s'est conformé aux conditions³⁴, la validité du test doit se fonder sur chacune des observations suivantes : stabilité de la température, maintien des concentrations d'OD ; incidence des embryons non viables (essai E), des alevins non viables (essai EA) ou des truitelles non viables (essai EAT) chez les groupes témoins ; taux de mortalité des truitelles (essai EAT) des groupes témoins ; et variation du poids des sujets des groupes témoins (essai EAT).

Dans tous les cas, un taux d'échec de la fécondation supérieur à 30 % invalide l'essai (Yee *et al.*, 1996). La mesure directe du taux de fécondation peut ne pas être accessible, puisqu'elle n'est pas exigée, mais la limite est implicite dans les conditions suivantes de la validité, moyennant quelques correctifs pour les essais de plus longue durée.

Pour que l'essai E soit valide, le taux moyen d'embryons non viables dans le groupe témoin doit être au plus de 30 %. Les œufs non fécondés sont comptabilisés comme embryons non viables et, de fait, le critère est le même que pour l'échec de la fécondation.

Le taux moyen d'alevins non viables dans le groupe témoin à la fin de l'essai EA ne doit pas excéder 35 %.

34. Plus précisément, on pose que : dans chaque répétition, toutes les pièces de l'appareillage et toutes les substances étaient identiques dans chaque répétition ; toutes les concentrations ont été affectées au hasard aux répétitions ; tous les organismes ont été affectés au hasard aux répétitions ; l'essai n'a pas pris fin prématurément ; toutes les variables physico-chimiques nécessaires ont été surveillées, comme il se devait ; toutes les variables biologiques nécessaires ont aussi été examinées comme il se devait.

Dans l'essai EAT, le taux moyen de truitelles témoins non viables au moment où l'on compte 50 % de truitelles survivantes, ne doit pas excéder 40 %.

Pour que l'essai EAT soit valide, il faut en outre que le taux de mortalité chez les truitelles témoins au cours de la période de 30 jours d'exposition n'excède pas 20 %.

4.7 *Considérations juridiques*

Il faut veiller à l'admissibilité, par les tribunaux, des échantillons prélevés et

analysés dans le dessein d'engager des poursuites. À cette fin, les échantillons doivent être représentatifs de la substance échantillonnée ; ne pas être contaminés par des substances étrangères, être identifiables quant à la date, à l'heure et au lieu du prélèvement ; il faut que la chaîne de leur garde et de leur transmission soit attestée et qu'ils aient été analysés le plus tôt possible après le prélèvement. Les responsables de l'exécution de l'essai et de la transmission des résultats doivent assurer la continuité de la preuve (McCaffrey, 1979) et assurer l'intégrité des résultats.

Modes opératoires particuliers pour la mesure de la toxicité de produits chimiques

La présente section renferme, sur la mesure de la toxicité de produits chimiques, des instructions particulières qui s'ajoutent aux modes opératoires exposés dans la section 4. On effectue habituellement un essai à l'aide de concentrations multiples, afin de déterminer les paramètres ultimes de mesure des options E, EA ou EAT.

5.1 Options

Selon les objectifs et les exigences réglementaires, on peut entreprendre l'évaluation de la toxicité d'un ou de plusieurs échantillons de produits chimiques pour les premiers stades de vie de la truite arc-en-ciel, par l'essai E, l'essai EA ou l'essai EAT (§ 4.3.1 et 4.3.6). L'essai EAT pourrait convenir plus particulièrement aux évaluations réglementaires exigées pour l'homologation d'un pesticide ou d'une catégorie semblable de produits chimiques ou pour d'autres évaluations réglementaires de produits chimiques. Le même essai pourrait aussi servir à des travaux de recherche visant à évaluer définitivement la toxicité d'un produit à l'égard de la truite arc-en-ciel. L'essai EA pourrait servir à ces fins, pour la sélection comparative de plusieurs produits chimiques, à l'égard de leur toxicité relative pour la truite arc-en-ciel, tandis que l'essai E pourrait servir aux surveillances fréquentes. Le choix de l'essai le plus convenable devra prendre en considération les caractéristiques physico-chimiques ainsi que le mode d'action toxique de la substance.

Lorsque l'on organise un essai EA ou EAT, il est recommandé d'établir un essai E employant plusieurs concentrations et de l'exécuter en même temps que les autres, en employant la substance chimique d'essai et des œufs fécondés provenant du même bassin d'organismes d'essai. Les conclusions de l'essai E donneront une idée du taux de réussite de la fécondation chez les témoins des essais EA et EAT et elles seront utiles à l'évaluation de la sensibilité relative à la substance d'essai des options visant à évaluer les caractéristiques aiguës (E) et à plus long terme (EA ou EAT).

Avant de recourir fréquemment ou usuellement à l'essai E à des fins réglementaires ou autres comportant l'évaluation préliminaire de la toxicité de produits chimiques, il est recommandé d'en comparer d'abord la sensibilité à celle de l'essai EAT, afin d'assurer que les résultats offriront une protection suffisante, compte tenu des objectifs poursuivis.

5.2 Propriétés, étiquetage et entreposage de l'échantillon

On devrait se renseigner sur les propriétés du produit à évaluer, y compris sur sa solubilité dans l'eau, sa pression de vapeur, sa stabilité chimique, ses constantes de dissociation et sa biodégradabilité. On devrait consulter, si elles existent, les fiches signalétiques (de santé-sécurité) de la substance d'essai. Lorsque la solubilité dans l'eau est incertaine ou problématique, on devrait se doter des modes opératoires ayant servi à la préparation de solutions aqueuses

du produit et les signaler. On devrait recueillir et consigner d'autres renseignements disponibles tels que la formule développée, le degré de pureté, la nature et le pourcentage des impuretés importantes, la présence et la quantité d'additifs ainsi que le coefficient de partage entre le *n*-octanol et l'eau³⁵. On devrait aussi connaître une méthode acceptable de dosage du produit dans l'eau, aux concentrations prévues pour l'essai, ainsi que sa précision et son exactitude.

Les récipients renfermant le produit chimique doivent être scellés et codés ou étiquetés, dès leur réception (p. ex. nom du produit, fournisseur, date de réception). Les conditions d'entreposage (p. ex. température, protection contre la lumière) sont souvent dictées par la nature du produit, il faudrait suivre les modes opératoires normalisés pour manipuler et entreposer le produit ou, sinon, ceux que recommandent les fabricants, une fiche signalétique ou de semblables sources de renseignements et de conseils.

5.3 Préparation et aération des solutions d'essai

Habituellement, on prépare les solutions du produit chimique par l'ajout de parties aliquotes d'une solution mère dont le solvant est de l'eau témoin ou de l'eau de dilution. On peut aussi, dans le cas des solutions très concentrées ou de volumes importants, ajouter des quantités pesées (à la balance de précision) du produit à de l'eau témoin ou de

dilution pour obtenir les titres nominaux d'essai. Si on utilise des solutions mères, on devrait au préalable en déterminer le titre et la stabilité. On devrait protéger de la lumière les solutions mères susceptibles de photolyse et préparer aussi souvent qu'il est nécessaire les solutions instables, afin de maintenir les concentrations pour chaque renouvellement des solutions d'essai.

Dans le cas des substances peu solubles dans l'eau, on peut préparer les solutions mères à l'aide de la technique de la colonne génératrice (Billington *et al.*, 1988 ; Shiu *et al.*, 1988) ou, ce qui est moins souhaitable, par dispersion ultrasonique. Cette dernière peut produire des gouttelettes non uniformes, de différentes tailles, dont certaines pourraient gagner la surface du liquide ou présenter une assimilabilité biologique variable, ce qui pourrait faire varier la toxicité. On ne devrait pas utiliser de solvants organiques, d'émulsifiants ou de dispersants pour accroître la solubilité du produit, sauf lorsque ces substances risquent d'entrer dans la composition normale de la préparation commerciale du produit. Si on en utilise, on doit préparer une solution témoin supplémentaire, renfermant la même concentration de l'agent solubilisant que dans la solution la plus concentrée du produit chimique d'essai. On devrait utiliser ces agents parcimonieusement, leur concentration ne devant jamais dépasser 0,1 mL/L dans les solutions d'essai. Quant aux solvants, ceux dont l'emploi est préférable sont : le diméthylformamide, le triéthylèneglycol, le méthanol, l'éthanol et l'acétone (USEPA, 1985b).

À la préparation de chaque solution d'essai, y compris du ou des témoins, on devrait en doser l'OD. Ensuite, on devrait aérer préalablement chaque solution d'essai (§ 4.3.4). Dans la plupart des cas, l'aération préalable, (antérieure à l'exposition des

35. La connaissance des propriétés aide à déterminer les précautions ou exigences particulières relatives à la manipulation et aux essais (p. ex. une bonne ventilation des lieux ou la nécessité d'un solvant). L'information sur la solubilité et la stabilité du produit dans l'eau douce aideront aussi à interpréter les résultats.

poissons) et l'aération (durant l'exposition des poissons) des solutions n'est pas nécessaire ni justifiée, et on devrait l'éviter à moins que les concentrations d'OD ne s'écartent de l'intervalle de 60 à 100 % de saturation en un instant déterminé (v. § 3.3, y compris les notes 6 à 8).

Tout essai effectué sans aération devrait être à renouvellement continu (v. § 3.3, 4.3.2 et fig. 3C), pour permettre la circulation continue des solutions d'essai autour des embryons ou des alevins qui se développent. Si l'aération préalable ou l'aération est convenable (p. ex. le taux d'OD dans au moins une solution d'essai est inférieur à 60 % ou supérieur à 100 % de saturation en air), il faudrait suivre les conseils donnés au § 4.3.4.

5.4 Eau témoin ou de dilution

Cette eau peut être de l'eau naturelle souterraine ou de surface, de l'eau reconstituée, de l'eau municipale déchlorée (en dernier recours, si c'est nécessaire ; v. § 3.4) ou un échantillon d'eau réceptrice, si on s'intéresse particulièrement à une situation locale. Le choix dépend de l'objet de l'essai³⁶.

Si, pour les besoins de la comparaison, il faut pousser plus loin l'uniformisation, on devrait préparer une eau reconstituée, douce, et l'utiliser dans le milieu témoin et dans toutes les solutions filles (dureté de 40 à 48 mg de CaCO₃ par litre, pH de 7,2 à 7,5)³⁷

36. Les volumes à utiliser, selon l'option ou le type d'essai (E, EA ou EAT et renouvellement continu ou intermittent) pourraient aussi influencer sur le choix de l'eau témoin ou de dilution (v. aussi § 6.1 et ses notes).

37. Comme le pH, la dureté et d'autres caractéristiques de l'eau de dilution peuvent influencer fortement sur la toxicité de la substance d'essai, une eau reconstituée normalisée procure des résultats

(USEPA, 1985b ; EC, 1990b).

Si l'on doit évaluer l'effet toxique d'un produit chimique dans une eau particulière, on pourrait prélever des échantillons de cette eau réceptrice en un endroit isolé de l'influence du produit, puis l'utiliser comme eau témoin ou eau de dilution³⁸. Par

significativement comparables à ceux que donnent d'autres substances et qu'obtiennent d'autres laboratoires. Il est souhaitable que les essais se déroulent dans de l'eau reconstituée, même si cela exige des volumes importants d'eau. Dans certains laboratoires, cela serait possible, du moins pour les essais avec renouvellement intermittent. On recommande une eau reconstituée, douce, que l'on prépare par ajout des quantités suivantes de sels de qualité « réactif » à de l'eau désionisée, filtrée sur charbon actif ou à de l'eau distillée dans le verre (ASTM, 1991b) :

	<u>sel</u>	<u>mg/L</u>
Bicarbonate de sodium	NaHCO ₃	48
Sulfate de calcium	CaSO ₄ ·2H ₂ O	30
Sulfate de magnésium	MgSO ₄	30
Chlorure de potassium	KCl	2

L'eau reconstituée devrait reposer plusieurs jours (USEPA, 1985b) et être énergiquement aérée avant emploi. On peut s'attendre que sa dureté totale soit de 40 à 48 mg/L et que son pH soit de 7,4 ± 0,2.

38. Les contaminants déjà présents dans l'eau réceptrice pourraient intensifier la toxicité du produit chimique. Dans ce cas, de l'eau de dilution non contaminée (d'origine naturelle ou reconstituée ou une eau municipale déchlorée) permettrait une estimation plus précise de la toxicité, mais pas nécessairement de l'effet global exercé localement.

Quand l'essai vise à déterminer l'effet d'un produit chimique donné sur une eau réceptrice, il importe peu que cette dernière modifie la toxicité parce qu'elle renferme d'autres toxiques ou, inversement, des substances réduisant les effets toxiques, tels que les acides humiques. Si l'accroissement de la toxicité est attribuable à cette eau, il conviendrait pour le moins d'inclure un deuxième témoin constitué d'eau du laboratoire et, au plus, d'inclure une autre série de dilutions dans l'eau du laboratoire.

Les essais utilisant l'eau réceptrice comme eau témoin et eau de dilution exigeraient le transport d'importants volumes d'eau au laboratoire. Cela

exemple, il peut s'agir d'évaluer les effets toxiques, dans un plan d'eau particulier, de déversements ou d'applications intentionnelles, tant réelles que potentielles de substances ou d'un pesticide. À cette fin, on peut se servir de l'eau d'approvisionnement du laboratoire, notamment si le prélèvement et l'utilisation de l'eau réceptrice sont impraticables. L'eau normale de laboratoire convient également à l'évaluation préliminaire ou intralaboratoire de la toxicité d'un produit chimique.

5.5 *Observations et mesures*

Outre les observations relatives à la toxicité exposées dans le § 4.4, il faut en effectuer d'autres, ainsi que des mesures, au cours des essais de produits chimiques.

Pendant la préparation des solutions et à chacune des périodes d'observation prescrites, on devrait examiner chaque solution afin d'observer la présence et l'évolution du produit chimique (p. ex. odeur, couleur, opacité, précipitation ou floculation). On devrait consigner les observations.

Il est souhaitable et recommandé d'analyser les solutions d'essai afin de doser les produits chimiques auxquels les embryons,

pourrait être raisonnable pour l'essai E, mais ce pourrait être impraticable pour les essais EA ou EAT. Si ce n'est pas le cas, on devrait envisager d'effectuer les essais EA ou EAT à proximité du lieu auquel on s'intéresse en pompant l'eau réceptrice d'amont dans un laboratoire mobile.

Un compromis serait de régler le pH et la dureté de l'eau d'approvisionnement du laboratoire ou de l'eau reconstituée pour qu'ils égalent ceux de l'eau réceptrice, en utilisant des sels de qualité « réactif » (ASTM, 1991b ; USEPA, 1985b). Selon la situation, cette correction pourrait se faire en fonction des moyennes saisonnières ou de valeurs mesurées en un instant déterminé.

les alevins et les truitelles sont exposés³⁹. Pour les besoins d'éventuels dosages, on devrait prélever des parties aliquotes de l'échantillon dans toutes les répétitions, pour le moins aux concentrations élevée, moyenne et faible et dans le ou les témoins. On devrait effectuer des analyses séparées des parties aliquotes, de préférence d'échantillons prélevés immédiatement avant le début de l'exposition initiale et à des intervalles hebdomadaires, par la suite, jusqu'à la fin de l'essai. Au cours de ces journées d'échantillonnage, on devrait prélever des parties aliquotes séparées des milieux des essais avec renouvellement intermittent au début et à la fin des périodes de renouvellement ; dans les essais avec renouvellement continu des solutions, on devrait prélever des parties aliquotes deux fois par jour, au moins à six heures d'intervalle.

Si les dosages montrent un déclin des concentrations de plus de 20 % au cours de l'essai, on devrait réévaluer la toxicité du produit chimique au moyen d'un essai dans lequel on renouvelle les solutions plus fréquemment, soit de façon intermittente, soit en continu. Si on constate la disparition ou le déclin rapide du toxique, on pourrait

39. En raison des limites inhérentes aux analyses, des coûts ou de données techniques antérieures indiquant que le produit est stable en solution dans des conditions analogues à celles de l'essai, il n'est pas nécessaire d'entreprendre ces analyses dans tous les cas.

Des analyses chimiques sont particulièrement recommandées si, selon le cas ; les solutions d'essai sont aérées ; la substance d'essai est volatile, insoluble, si elle précipite ou si elle donne lieu à des phénomènes de sorption sur les matériaux dont sont faites les enceintes expérimentales ; le renouvellement des solutions est continu (USEPA, 1985b). Certaines situations (p. ex. l'essai de pesticides en vue de l'homologation) pourraient exiger le dosage du produit dans des solutions d'essai.

utiliser un essai avec renouvellement continu à débit élevé, pour maintenir des concentrations stables du produit en solution (peut-être moindres mais stables) [McKim, 1985].

Dans tout essai où l'on mesure les concentrations, on devrait calculer et exprimer la toxicité en fonction des concentrations mesurées, à moins d'avoir de bons motifs de douter de leur exactitude. En faisant les calculs, on devrait caractériser chaque solution d'essai par la concentration mesurée moyenne géométrique. Le but des intervalles entre les prélèvements et des calculs des moyennes devrait être d'obtenir des concentrations moyennes équilibrées dans le temps et réalistes auxquelles les organismes ont été exposés.

5.6 Paramètres ultimes de mesure et calculs

Les paramètres de mesure des essais effectués avec les produits chimiques seront les paramètres habituels, c'est-à-dire la CE 50 et la CE 25, pour la non-viabilité aux divers stades du cycle biologique, dans les essais E, EA et EAT ainsi que, dans ce dernier essai, la CL 50 après 30 jours et la CI 25 après 30 jours pour le poids moyen

atteint par les truitelles. Dans les essais de longue durée, on demande d'autres comptes rendus descriptifs sur les retards du développement, les difformités et le comportement ainsi que des observations (facultatives) supplémentaires présentées dans le détail, conformément au § 4.5.

Si on utilise un témoin du solvant pour garder la substance d'essai en solution, il faut s'assurer que ce solvant ne provoque pas lui-même d'effets excessifs. L'essai est rendu invalide si le témoin du solvant (ou le témoin non traité) ne satisfait pas aux critères de validité de l'essai précisés au § 4.6.

Quand on utilise un solvant ou un autre produit chimique, il devient le témoin pour évaluer l'effet du toxique. Les données relatives au témoin du solvant ne doivent pas être réunies aux données sur l'eau témoin ou de dilution. Cette opération ne conviendrait pas, puisque cela pourrait affecter les calculs des paramètres ultimes de mesure d'une erreur systématique ; l'eau témoin ou de dilution est privée d'un facteur qui pourrait agir sur les organismes aux autres concentrations (c'est-à-dire le solvant).

Section 6

Modes opératoires particuliers pour les essais employant des échantillons d'effluent, d'élutriat et de lixiviat

On trouve dans la présente section des instructions particulières relatives à l'essai d'échantillons d'effluent, d'élutriat et de lixiviat, qui s'ajoutent aux modes opératoires exposés dans la section 4.

6.1 Options

Les essais périodiques employant des échantillons d'effluent, d'élutriat ou de lixiviat (c'est-à-dire d'eau usée), pour la surveillance et la vérification de la conformité aux règlements pourraient utiliser les options d'essais E, EA ou EAT (§ 4.3.1). Avant d'adopter l'une de ces options pour un emploi périodique ou fréquent (p. ex. dans le cadre d'un programme de surveillance des effets sur l'environnement) au moyen d'une eau usée donnée, on recommande une évaluation comparative de ces options afin d'en mesurer les différences de sensibilité. On pourrait effectuer n'importe laquelle des trois options, avec renouvellement intermittent ou continu des solutions, selon les objectifs, la nature de l'échantillon, le volume nécessaire, etc.

Lorsque l'on organise un essai EA ou EAT, il est recommandé d'établir un essai E à plusieurs concentrations et de l'exécuter, en parallèle, à l'aide d'échantillons ou de sous-échantillons de l'eau usée utilisée pour la première semaine de l'essai et d'œufs fécondés du même bassin d'organismes d'essai. Les constatations de l'essai E donneront une idée du taux de réussite de la fécondation pour les témoins des essais EA ou EAT, et elles seront utiles à l'évaluation

de la sensibilité relative de la substance d'essai pour les options à court terme (E) et à plus long terme (EA ou EAT). On pourrait aussi effectuer une série d'essais E, employant plusieurs concentrations, toutes les semaines, avec les échantillons ou sous-échantillons d'eau usée, à mesure que se déroule l'essai EA ou EAT, afin de fournir des renseignements sur la toxicité relative de la substance d'essai utilisée chaque semaine (Fennell *et al.*, 1998).

Les programmes réglementaires d'essai pourraient exiger des plans d'expérience et des paramètres ultimes de mesure différents de ceux qui sont normalisés et que nous décrivons ici. Par exemple, un règlement pourrait exiger un essai sur une seule concentration d'au moins trois fractions non diluées de l'échantillon et au moins trois solutions témoins des répétitions. Un paramètre de mesure pourrait se fonder sur les résultats donnés par une seule concentration, habituellement non diluée, d'eau usée. Consulter à ce sujet le § 6.6.

Il faudrait examiner sérieusement, avant d'entreprendre tout programme, les volumes nécessaires d'échantillons d'eau usée. Il faudrait à peu près des volumes égaux d'échantillons pour les essais avec renouvellement intermittent et continu, mais les quantités pourraient différer considérablement selon les différentes options⁴⁰. On pourrait économiser des

40. Voici des exemples hypothétiques pour des essais avec la truite arc-en-ciel. Pour l'essai E, on pourrait poser que les œufs de taille moyenne de ce poisson pèsent environ 75 mg. Avec 40 de ces œufs dans une

volumes appréciables d'eau usée dans les essais EA et EAT en débutant avec les volumes journaliers inférieurs d'eau d'essai nouvelle, exigés au départ, et en les augmentant graduellement, en fonction des besoins de la biomasse réelle dans l'enceinte expérimentale. Vu la voracité de certains essais EA ou EAT pour les échantillons, plus particulièrement ceux qui emploient au moins 50 alevins par répétition et/ou de gros individus, il pourrait être préférable d'entreprendre ces essais à la source des eaux usées, à l'aide d'un laboratoire mobile. Toute stratégie visant à réduire au minimum les besoins en volume d'échantillon doit, bien entendu, garder les groupes de répétitions intacts et séparés des autres répétitions.

Normalement, on ne filtre pas ou on n'agite pas les échantillons d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat au cours de l'essai. Cependant, la présence de matières organiques ou

répétition, on parle d'environ 3,0 g, qui exigeraient environ 1,5 L/j dans chaque répétition, soit 4,5 L/j pour trois répétitions. Sept concentrations plus un témoin (v. § 4.1) dans une série de dilutions géométriques, plus une concentration non diluée (p. ex. 100, 46, 22, 10, 4,6, 2,2, 1,0, 0 %) exigeraient environ deux fois plus de substances d'essai que la seule concentration à 100 % et, ainsi, l'essai exigerait environ 9 L d'eau usée par jour.

Les alevins de truite arc-en-ciel de taille moyenne pourraient peser en moyenne 130 mg (annexe D). Si on comptait 50 alevins par répétition dans un essai EAT, trois répétitions et sept concentrations, comme dans l'exemple ci-dessus, il faudrait à cette étape de l'essai environ 20 L d'échantillon par jour, avec renouvellement intermittent ou continu. Si les poissons pesaient en moyenne 150 mg au début du stade de la truitelle (annexe D), on aurait besoin chaque jour d'environ 23 L d'échantillon. À la fin de l'essai EAT, alors que les truitelles pèsent en moyenne 500 mg et en posant un nombre de 10 truitelles par répétition ainsi que le maintien de trois répétitions aux mêmes concentrations, il faudrait environ 15 L d'eau usée par jour prévoit-on, à la fin de l'essai. Les exigences en échantillon diffèrent si les poissons étaient plus gros ou plus petits ou si la série de concentrations était différente.

inorganiques en suspension ou décantables peut nuire au développement des embryons, des alevins ou des truitelles et provoquer des réactions de stress, ralentir la croissance ou exercer d'autres effets sublétaux chez les truitelles ou les sujets plus âgés à des concentrations d'au plus 100 mg/L (Noggle, 1978 ; McLeay *et al.*, 1987 ; Servizi et Martens, 1987). Les fortes concentrations de solides biologiques dans certains types d'effluents traités peuvent aussi contribuer à la toxicité de l'échantillon, en raison de la production d'ammoniac, de nitrites ou des deux (Servizi et Gordon, 1986). Si l'on soupçonne la contribution à la toxicité par de fortes concentrations de matières en suspension ou de matières décantables dans les échantillons d'effluent, d'élutriat ou de lixiviat et si l'objet de l'étude est de quantifier cette contribution, on devrait réaliser un essai supplémentaire, simultanément. Cet essai serait identique au premier, sauf que la fraction d'échantillon utilisé serait débarrassée des matières par filtration ou décantation.

On recommande de mesurer la létalité aiguë pour les truitelles ou les jeunes arcs-en-ciel de chaque échantillon à utiliser dans un essai EA ou EAT, dès sa réception. Cet essai devrait déterminer la CL 50 après 96 heures ou la mortalité dans un échantillon non dilué, dans une période de 96 heures, conformément aux méthodes d'Environnement Canada (1990b, compte tenu des modifications apportées en 1996). Grâce à la surveillance de la létalité aiguë dans chaque échantillon, on pourrait déceler des variations atypiques de la toxicité due à des déversements de produits chimiques ou à d'autres accidents, à des modifications apportées aux procédés industriels, à l'efficacité d'une station de traitement des eaux usées ou à des variations survenues dans l'environnement au fil du temps (dans le cas du lixiviat). L'information tirée

d'essais parallèles sur la toxicité aiguë sera utile à l'interprétation des effets toxiques qui évoluent dans le temps et qui surviennent au cours des essais EA ou EAT.

6.2 Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons

Les contenants utilisés pour le transport et l'entreposage des échantillons ou des sous-échantillons d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat doivent être fabriqués d'un matériau non toxique. Nous recommandons des contenants souples de polyéthylène ou de polypropylène, pour le transport de l'eau potable (p. ex RelianceZ), dont le volume peut se contracter pour s'adapter à l'intérieur d'une glacière ou dont le volume d'air intérieur peut être maintenu au minimum, lorsque l'on prélève des fractions de l'échantillon au laboratoire pour l'essai toxicologique ou les analyses chimiques. Les contenants doivent être soit neufs, soit nettoyés à fond et rincés à l'eau non contaminée. On devrait aussi les rincer à l'échantillon à prélever. On devrait les emplir complètement de façon à réduire au minimum le volume d'air libre.

Dès le prélèvement, on doit remplir, fermer hermétiquement et étiqueter ou coder chaque contenant. Sur l'étiquette devrait figurer au moins l'indication du type d'échantillon, de son origine, de la date et de l'heure du prélèvement ainsi que du nom du ou des préposés à l'échantillonnage. On ne devrait pas soumettre aux essais les échantillons arrivant au laboratoire non étiquetés ou non codés. On ne devrait pas non plus soumettre automatiquement à l'analyse des échantillons parvenant au laboratoire dans des contenants partiellement remplis, parce que les toxiques volatils s'échappent dans le volume d'air. Cependant, si on sait que la

volatilité ne fait pas problème, le chercheur peut, à son gré soumettre ses échantillons aux essais.

On doit s'efforcer de garder les échantillons d'effluent ou de lixiviat au frais (1 à 7 °C, de préférence 4 ± 2 °C) durant le transport. Lors du prélèvement, les échantillons tièdes (plus de 7 °C) doivent être ramenés à 1 à 7 °C, à l'aide de glace ordinaire (et non de glace sèche) ou de sachets réfrigérants. Au besoin, on doit ajouter dans le contenant de transport des quantités généreuses de glace, de sachets réfrigérants ou d'autres moyens de réfrigération, afin de maintenir la température de l'échantillon dans la fourchette de 1 à 7 °C durant le transport. Pendant ce dernier ou pendant l'entreposage, les échantillons ne doivent pas geler.

À son arrivée au laboratoire, il faut mesurer et noter la température de l'échantillon ou, le cas échéant, de l'un des sous-échantillons (le reste des sous-échantillons n'étant pas ouvert et étant laissé fermé hermétiquement). On peut ramener immédiatement ou durant la nuit la température d'une partie aliquote d'effluent ou de lixiviat dont on a alors besoin à 14 °C et l'utiliser dans l'essai. Le reste de l'échantillon ou des sous-échantillons, dont on a besoin pour le renouvellement ultérieur des solutions, doit être gardé à l'obscurité, dans des contenants fermés hermétiquement, sans volume d'air, à 4 ± 2 °C. Dans le cas des élutriats, de même que dans celui des échantillons destinés à l'élutriation en milieu aqueux puis aux essais sur l'élutriat, les conditions de transport et d'entreposage devraient être les mêmes que celles qui concernent les effluents et les lixiviats.

Les essais employant de l'effluent, un élutriat ou un lixiviat peuvent se faire en un lieu éloigné du lieu de prélèvement, dans les conditions contrôlées de laboratoire. Chaque

essai E, EA ou EAT ainsi mené doit être réalisé suivant l'une des deux méthodes et approches suivantes de collecte :

1. On peut utiliser un seul échantillon d'eau usée pour l'essai E, à la condition de le répartir dans trois contenants distincts, dès son prélèvement, en vue du transport et de l'entreposage. Dans ce cas, il faut utiliser chacun des trois sous-échantillons pour préparer toutes les solutions d'essai durant deux ou trois journées consécutives de ce dernier⁴¹. De même, pour un essai EA ou EAT dans un laboratoire éloigné, on peut utiliser un seul échantillon d'eau usée au cours de chacun des intervalles de 7 jours, à la condition de le répartir dès le prélèvement dans trois contenants entièrement remplis, fermés hermétiquement, puis d'être utilisés de la même manière.
2. Si, au cours des 7 à 10 jours d'entreposage qui précède l'utilisation dans l'essai, on sait que la toxicité des eaux usées évoluera ou si on prévoit ce phénomène, on devrait collecter des échantillons frais, en vue d'un essai E dans un laboratoire éloigné, en au moins trois occasions distinctes, à des intervalles de deux ou trois jours ou moins. On doit utiliser ces échantillons successivement au cours de l'essai⁴². De même, pour les essais EA ou EAT avec des échantillons d'eau usée que l'on sait

être ou que l'on prévoit d'être instables au cours de l'entreposage, on devrait, au cours de chaque semaine de l'essai, appliquer ce régime de prélèvement et d'essai (comportant au moins trois échantillons discrets par semaine).

Dans le cas des eaux usées instables, on peut aussi effectuer ces essais sur place, avec un échantillon frais, avec renouvellement continu ou intermittent (v. § 4.3.2 et 6.1, y compris la note 40).

L'essai employant des échantillons d'effluent et de lixiviat devrait débiter au plus tôt après le prélèvement. Dans un essai, on devrait commencer à utiliser l'échantillon dès la journée du prélèvement, si c'est possible, et on doit l'utiliser pas plus de 3 jours après. Si on utilise des effluents ou des lixiviats dans un laboratoire sur place, les échantillons devraient servir à l'essai dans la journée de leur prélèvement⁴³ (USEPA, 1989).

Les échantillons de sédiment, de sol ou d'autre matière solide prélevés en vue d'une élutriation puis d'un essai sur l'élutriat devraient être extraits et traités le plus tôt possible après le prélèvement et pas plus de 10 jours après leur réception au laboratoire. Pour ce qui concerne les élutriats, on devrait utiliser des parties aliquotes de l'échantillon préparé selon le même calendrier que celui qui a été indiqué pour les effluents ou les lixiviats, si c'est possible. Il n'est pas souhaitable d'entreposer longtemps les échantillons d'élutriat, parce que la toxicité de l'échantillon pourrait ne pas être stable.

41. Par exemple, on pourrait utiliser le premier sous-échantillon au cours des journées 1 et 2 de l'essai, le deuxième au cours des journées 3 et 4 et le troisième au cours des journées 5, 6 et 7.

42. Par exemple, si les trois échantillons étaient prélevés sur une semaine (p. ex. le lundi, le mercredi et le vendredi), on pourrait utiliser le premier au cours des journées 1 et 2 de l'essai, le deuxième au cours des journées 3 et 4 et le troisième au cours des journées 5, 6 et 7.

43. L'essai sur place pourrait se conformer au calendrier et aux modes opératoires décrits pour les essais dans un laboratoire éloigné. Certains essais sur place pourraient aussi exiger un apport continu d'eau usée fraîche (essai avec renouvellement continu) ou à des intervalles d'au plus 12 h dans chaque enceinte expérimentale.

Les essais sur éutriat doivent débiter dans les 3 jours de la préparation de l'échantillon, à moins qu'un règlement ou une méthode prescrite ne précise le contraire.

6.3 Préparation et aération des solutions d'essai

Il faut agiter vigoureusement le contenant dans lequel l'échantillon ou le sous-échantillon a été prélevé ou a été conservé, juste avant de le vider, pour assurer la remise en suspension des matières décantables. Il faut mesurer immédiatement avant l'emploi la teneur en OD et le pH de chaque échantillon ou sous-échantillon. Au besoin, on devrait aérer au préalable chaque solution d'essai (v. § 4.3.4), avant de répartir les fractions aliquotes dans les enceintes expérimentales où se trouvent les répétitions.

Normalement, il n'est pas nécessaire ni recommandé de filtrer les échantillons ou les sous-échantillons. Cependant, s'ils renferment des organismes qui risquent d'être pris pour les organismes en expérience, ou qui risqueraient de les attaquer ou d'entrer en concurrence avec ces derniers pour la nourriture, il faut les passer, au préalable, sur un tamis à mailles de 60 µm (USEPA, 1989 et 1994). Cette filtration pourrait arrêter les matières en suspension qui sont caractéristiques de l'échantillon ou du sous-échantillon et pourraient autrement contribuer à la toxicité ou la modifier. Si l'on craint cet effet, on devrait effectuer en parallèle un deuxième essai à l'aide d'une fraction non filtrée de l'échantillon ou du sous-échantillon.

Au cours des essais E, EA ou EAT employant des échantillons d'effluent, on devrait normalement aérer à faible débit, dans l'enceinte expérimentale, chaque

solution y compris les témoins. On pourrait cependant décider d'effectuer l'essai sans aération, parce que le règlement l'exige, en raison d'une très faible demande d'oxygène par les eaux usées ou parce qu'un objectif de l'essai est d'inclure la demande d'oxygène dans l'effet toxique global. Dans cette éventualité, on recommande un essai avec renouvellement continu (v. § 3.3, 4.3.2 et 4.3.4).

6.4 Eau témoin ou eau de dilution

Les essais employant des échantillons d'effluent ou de lixiviat pour évaluer la conformité aux règlements devraient utiliser de l'eau du laboratoire ou un échantillon de l'eau réceptrice comme eau témoin ou de dilution. Comme les résultats pourraient différer selon les deux types d'eau, il faut décider des objectifs de l'essai avant de choisir l'eau que l'on utilisera. En raison des volumes en jeu, l'emploi de l'eau réceptrice pour les dilutions et les témoins risquerait d'être impraticable pour les essais dans un laboratoire éloigné.

Pour certains essais sur place, il pourrait être souhaitable d'employer l'eau réceptrice comme eau témoin ou de dilution, si l'on souhaite obtenir des renseignements de portée locale. Un exemple important serait la conduite d'essais visant à évaluer l'effet subléthal à la périphérie d'une zone de mélange, conformément à des exigences réglementaires de portée très locale. Le prélèvement, le transport et l'entreposage de ces échantillons devraient être conformes aux instructions du § 6.2.

Si l'on doit utiliser un échantillon d'eau réceptrice d'amont comme eau témoin ou de dilution, il faut préparer une solution témoin distincte à l'aide de l'eau d'alimentation du laboratoire servant normalement à l'élevage

du poisson et aux essais avec ce dernier. Il faut comparer les paramètres biologiques (p. ex. la viabilité des embryons, le taux de mortalité des alevins ou des truitelles, l'incidence de difformités chez le poisson, le poids des truitelles à la fin de l'essai) mesurés chez le poisson exposé à l'eau témoin du laboratoire et chez le poisson exposé à l'échantillon d'eau réceptrice d'amont (§ 4.5).

On peut entreprendre les essais exigeant un degré poussé de normalisation avec de l'eau reconstituée qui sert dans les témoins et aux dilutions. Cela exige des volumes assez importants, mais, dans certains cas, cela pourrait être faisable et souhaitable. On recommande alors l'emploi d'une eau reconstituée douce (dureté de 40 à 48 mg de CaCO₃ par litre, pH de 7,2 à 7,5 ; v. § 5.4). Par exemple, il pourrait valoir la peine d'employer une eau reconstituée douce si l'on voulait réduire au minimum l'influence de l'eau de dilution. Cette situation pourrait se présenter dans les études visant à corréliser les données toxicologiques obtenues sur divers types et sources d'eaux usées, d'un certain nombre de laboratoires ou d'un seul laboratoire où la qualité de l'eau est variable. Il n'est pas recommandé d'ajuster la dureté de l'eau reconstituée à des valeurs supérieures aux valeurs ordinaires de l'eau réceptrice d'une eau usée donnée ni de régler le pH à l'extérieur de la fourchette normale, puisque l'on peut ainsi réduire (ou augmenter) la toxicité de la substance d'essai et arriver à des résultats expérimentaux trompeurs.

6.5 Observations et mesures

On devrait noter journallement le nombre de sujets manifestement morts (essais E, EA et EAT) et difformes (essais EA et EAT) dans chaque répétition. On devrait effectuer le

dénombrement complet des stades pertinents, y compris des sujets manquants, à la fin de chaque stade important de chaque essai (c'est-à-dire 7 jours après la fécondation dans l'essai E, 7 jours après l'éclosion de la moitié des sujets dans le groupe témoin de l'essai EA et au moment de l'accession au stade de la truitelle de la moitié des sujets témoins dans l'essai EAT). Dans ce dernier essai, on mesure le taux de mortalité et le poids sec moyen des truitelles survivantes après 30 jours d'exposition (et alimentation) [v. § 4.4 et 4.5]. On devrait aussi noter journallement le nombre d'alevins sortis de l'œuf (essais EA et EAT) et le nombre de truitelles (essai EAT) dans chaque répétition ainsi que les comportements anormaux.

On devrait effectuer diverses mesures, outre celles qui sont précisées dans les § 4.3.3, 4.3.4, 4.3.5 et 4.4, sur les caractéristiques de l'eau usée et les conditions qui existent au cours de l'essai. Lorsque l'on prépare les solutions à partir de l'échantillon d'eau usée, on devrait noter la couleur de cette dernière, sa turbidité, son odeur et son homogénéité (c'est-à-dire présence de matières flottantes ou décantables). Lors de la dilution à l'eau, on devrait noter les phénomènes de précipitation, de floculation, le changement de couleur, l'odeur ou d'autres réactions. Au cours de l'essai, on devrait noter toute modification d'apparence des solutions, par exemple formation de mousse, dépôt, floculation, variation de la turbidité et de la couleur.

Lorsque les solutions sont très colorées ou opaques ou que, dans une ou plusieurs enceintes expérimentales, les échantillons moussent, on devrait inspecter les embryons et les alevins en soulevant brièvement l'incubateur au-dessus de chaque solution. Au besoin, on devrait transporter l'incubateur rapidement vers un récipient

contenant de l'eau témoin ou de dilution claire, le temps de faire des observations sur la mortalité et l'aspect ou les comportements aberrants. Il faut traiter de la même façon toutes les répétitions, y compris les témoins pendant les manœuvres d'inspection.

Lorsque les échantillons d'effluent ont une teneur appréciable en matières solides, il est souhaitable de doser les matières totales en suspension et les matières décantables dès leur réception (APHA *et al.*, 1995). Ces mesures font partie de la description globale de l'effluent et constituent des caractéristiques qui pourraient influencer sur les résultats de l'essai toxicologique. On devrait aussi effectuer des mesures supplémentaires qui sont susceptibles d'aider à caractériser chaque échantillon d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat, notamment le pH, la conductivité, la dureté, l'alcalinité, la couleur, la DCO, la DBO, l'OD et la concentration de certains toxiques (p. ex. acides résiniques, dérivés chlorophénoliques, métaux dissous, chlore, chloramine, ammoniacque).

6.6 Paramètres ultimes de mesure et calculs

Les paramètres ultimes de mesure des essais effectués avec des échantillons d'eau usée seront habituellement les paramètres ordinaires, c'est-à-dire la CE 50 et la CE 25 pour la non-viabilité des truites à leur divers stades de développement dans les essais E, EA et EAT ainsi que, dans l'essai EAT, la CL 50 après 30 jours et la CI 25 après 30 jours, relativement au poids moyen atteint par les truitelles. D'autres comptes rendus descriptifs sur le retard du développement, les difformités et le comportement sont exigés à la fin des essais de plus longue durée, et l'on peut détailler les observations supplémentaires (facultatives), comme il est décrit au § 4.5.

Dans les essais pour surveiller ou réglementer les effluents, les lixiviats ou les élutriats, il faut utiliser les options et les paramètres de mesure standards définis dans la section 4. Dans l'essai EAT, qui possède trois paramètres standards de mesure, l'effet le plus sensible serait pris comme l'indicateur définitif de la toxicité. Les méthodes ordinaires d'analyse s'appliqueraient (v. § 4.5).

Des essais réalisés à des fins de surveillance et de conformité aux règlements devraient normalement comprendre, pour le moins, trois répétitions de l'échantillon ou de sous-échantillons non dilués (ou une dilution précisée de l'échantillon) et trois solutions témoins des répétitions. Selon les exigences réglementaires, on pourrait limiter les essais de détermination de la conformité à une seule concentration (eau usée non diluée, sauf indication du contraire) ou on pourrait exiger une série de dilutions (c'est-à-dire un essai employant plusieurs concentrations différentes), plus de l'eau usée non diluée (v. § 4.5). Les essais employant une seule concentration sont souvent un moyen efficace de détermination de la présence d'une toxicité mesurable et aussi d'évaluation rapide d'un nombre important d'échantillons.

On pourrait adapter à des fins spéciales l'essai toxicologique standard, par exemple pour localiser, dans une usine, les sources de toxicité ou pour évaluer l'efficacité de changements de procédés dans une usine ou du traitement des effluents. Les essais pourraient porter sur une série de concentrations ou une seule concentration (échantillon non dilué ou dilué à une concentration convenable, plus un témoin). Les paramètres de mesure dépendraient des objectifs poursuivis, mais ils pourraient englober des limites « tout ou rien » arbitraires, par exemple le pourcentage

maximal d'embryons non viables ou le pourcentage maximal de mortalité des alevins au bout d'un temps convenable. On trouve dans le § 4.5 des instructions utiles sur l'analyse statistique et les comptes

rendus consécutifs aux séries d'essais portant sur différents échantillons, chacun évalué à une concentration seulement.

Section 7

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons d'eau réceptrice

On trouvera dans la présente partie les instructions relatives à l'évaluation d'échantillons d'eau réceptrice, qui s'ajoutent aux instructions fournies dans la section 4.

7.1 Options

Les essais périodiques portant sur une eau réceptrice, pour sa surveillance et la détermination de sa conformité aux règlements, emploient normalement des embryons (essai E) ou des embryons et des alevins (essai EA) [§ 4.3.1]. Les essais mesurant les effets subis à différents stades du cycle biologique de salmonidés utilisent les options EA ou EAT (embryons, alevins et truitelles). Les essais définitifs portant sur les effets sur la survie et la croissance des truitelles utilisent l'option EAT. Avant d'adopter les options E ou EA pour une utilisation périodique ou fréquente (p. ex. dans le cadre d'un programme de surveillance des effets sur l'environnement), il est recommandé d'effectuer des évaluations comparatives de ces options avec l'option EAT, plus complète, afin de quantifier les différences de sensibilité. On peut réaliser les trois options avec renouvellement intermittent ou continu des solutions, selon les objectifs de l'essai, la nature de l'échantillon, les volumes nécessaires, etc.⁴⁴. Un essai et ses

paramètres de mesure pourraient se borner à l'emploi d'au moins trois fractions non diluées de l'échantillon et d'au moins trois solutions témoins des répétitions (c'est-à-dire essai employant une seule concentration), ou ils pourraient exiger au moins trois répétitions de chaque concentration d'une série de dilutions de l'échantillon, y compris de l'échantillon non dilué. Consulter le § 7.6.

Au moment où l'on se prépare à l'essai EA ou EAT, il est recommandé d'établir et de réaliser en parallèle un essai E, à l'aide des échantillons ou des sous-échantillons d'eau réceptrice utilisés pendant la première semaine de l'essai et des œufs fécondés du même bassin d'organismes d'essai. Les constatations découlant de cet essai E donneront un aperçu du taux de réussite de la fécondation chez les témoins de l'essai EA ou EAT et elles seront utiles à l'évaluation de la sensibilité relative à la substance d'essai utilisée pour les options de mesure de phénomènes aigus (option E) et de phénomènes à plus long terme (options EA ou EAT). On pourrait aussi effectuer hebdomadairement une série d'essais E avec les échantillons ou les sous-échantillons d'eau réceptrice, à mesure que se déroule l'essai EA ou EAT, pour obtenir des renseignements sur la toxicité relative de la substance d'essai utilisée pendant chaque semaine de l'essai (Fennell *et al.*, 1998).

44. Les volumes exigés d'échantillon diffèrent selon le stade du cycle biologique où se trouve le poisson et la taille (biomasse) de ce dernier ainsi que selon le type d'essai choisi. Pour certains essais EA et EAT (v. § 4.3.2 et la note 40 du § 6.1), le besoin de gros volumes d'échantillon ainsi que la décision d'utiliser

de l'eau d'amont comme eau témoin pourraient faire en sorte qu'il soit préférable ou plus pratique d'entreprendre ces essais sur place, dans un laboratoire mobile ou dans des installations existantes.

Il pourrait être indiqué ou non indiqué d'évaluer systématiquement la létalité aiguë de chaque échantillon qui doit être utilisée dans un essai EA ou EAT. Cette évaluation conviendrait si on soupçonnait ou prévoyait que l'eau réceptrice non diluée sera létale, n'importe quand au cours de l'essai portant sur les premiers stades du cycle biologique des poissons. L'information pourrait être utile à l'interprétation des effets toxiques survenus à des moments particuliers au cours des essais EA ou EAT. L'essai portant sur la létalité pourrait employer une fraction de l'échantillon, dès la réception de ce dernier, pour déterminer la létalité aiguë pour les truitelles arcs-en-ciel (CL 50 après 96 heures ou taux de mortalité dans l'échantillon non dilué pendant 96 heures), conformément aux méthodes d'Environnement Canada (1990b, avec les modifications apportées en 1996).

7.2 Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons

On trouve dans le § 6.2 les modes opératoires de l'étiquetage, du transport et de l'entreposage des échantillons. Les essais toxicologiques devraient débuter le plus tôt possible, de préférence dans les 24 heures suivant le prélèvement et pas plus de 3 jours après.

7.3 Préparation et aération des solutions d'essai

On devrait agiter les échantillons qui se trouvent dans les contenants de leur prélèvement, avant de les verser, pour en assurer l'homogénéité. On devrait composer les sous-échantillons de la façon décrite dans le § 6.3.

On devrait passer les échantillons susceptibles de renfermer les organismes peut-être nuisibles au développement des salmonidés sur un tamis à mailles de 60 µm (§ 6.3), avant de les utiliser. Si on craint que ce tamisage ne modifie la toxicité, on devrait effectuer parallèlement un deuxième essai employant l'échantillon non filtré.

On doit mesurer, dès la préparation des solutions d'essai, la teneur en OD dans chacun d'eux, y compris le ou les témoins. Ensuite, on devrait exposer les organismes aux solutions ou, encore, on pourrait préalablement aérer chaque solution d'essai (avant d'y exposer les organismes). Dans la plupart des cas, l'aération préalable ou l'aération au cours de l'essai ne seront pas nécessaires ni indiqués (v. § 3.3, y compris les notes 6 à 8) et on devrait les éviter. L'essai effectué sans aération devrait comporter le renouvellement continu des solutions, afin de faire circuler sans interruption ces solutions autour des embryons ou des alevins qui se développent (v. § 3.3, y compris la fig. 3C et le § 4.3.2). Si la teneur en OD est inférieure à 60 % de saturation en air ou supérieure à 100 %, on pourrait recourir à l'aération préalable ou à l'aération avec renouvellement des solutions par intermittence ou en continu, conformément au § 4.3.4.

7.4 Eau témoin ou de dilution

Pour les échantillons d'eau de surface prélevés près d'un exutoire d'eau usée, du théâtre d'un déversement de produits chimiques ou de toute autre source de contamination ponctuelle, on peut prélever en même temps de l'eau d'amont et s'en servir comme eau témoin et eau de dilution des échantillons prélevés en aval (v. § 5.4). Il faudrait prélever cette eau aussi près que possible de la source de contamination, mais

en amont ou à l'extérieur de sa zone d'influence. On devrait filtrer l'eau de surface pour la débarrasser des organismes (v. § 7.3).

Si l'on utilise de l'eau d'amont comme eau témoin ou de dilution, il faut préparer une solution témoin distincte de l'eau de laboratoire normalement utilisée pour l'élevage du poisson et les essais avec ce dernier. Les modes opératoires de la préparation et de l'évaluation de chaque solution témoin devraient être identiques (v. § 4.1 et 5.4). On devrait comparer les résultats des essais à ceux des milieux témoins dans lesquels on a utilisé de l'eau réceptrice (§ 4.5).

Il pourrait être déraisonnable d'utiliser de l'eau d'amont dans un témoin, soit pour des raisons de logistique, soit en raison des effets toxiques prévus, soit pour d'autres considérations pratiques propres à l'emplacement. C'est pourquoi on devrait utiliser l'eau du laboratoire que l'on emploie normalement à l'élevage du poisson comme eau témoin et pour toutes les dilutions. On pourrait en ajuster certains paramètres pour simuler en partie les propriétés de l'eau d'amont (v. § 5.4).

7.5 Observations et mesures

Les principales observations faites des organismes en expérience devraient être conformes aux descriptions du § 4.4.

En outre, on devrait observer, dans l'échantillon et les solutions, la couleur, la turbidité, la formation de mousse, la précipitation, etc. conformément aux descriptions du § 6.5, tant au cours de la préparation des solutions que, ultérieurement, au cours de l'essai.

On devrait faire la caractérisation chimique de chaque échantillon d'eau réceptrice. Selon la nature prévue des toxiques, les mesures pourraient comprendre celles du pH, de la conductivité, de la dureté, de l'alcalinité, de la couleur, de la DCO, de la DBO et des dosages de certains toxiques (p. ex. acides résiniques, composés chlorophénoliques, métaux dissous, chlore, chloramine, ammoniacque).

7.6 Paramètres ultimes de mesure et calculs

Les paramètres de mesure des essais effectués avec l'eau réceptrice devraient normalement être les paramètres standards décrits au § 4.5. Les modalités des options et des démarches devraient être conformes à celles qui sont décrites aux § 4.5 et 6.6.

Les essais devraient utiliser des séries de concentrations ou une seule concentration (dans ce dernier cas non diluée ou diluée de façon convenable, plus un témoin). Les essais visant à déterminer le degré de conformité aux règlements comprennent souvent l'évaluation d'au moins trois parties non diluées de l'échantillon et emploient au moins trois solutions témoins des répétitions. Les essais réglementaires pourraient utiliser une seule concentration, habituellement l'eau réceptrice non diluée. Les essais employant une seule concentration sont souvent une méthode efficace pour déterminer la présence d'une toxicité mesurable et aussi pour l'analyse rapide d'un nombre élevé d'échantillons (p. ex. provenant de divers endroits de la même eau réceptrice). Les tests statistiques appliqués aux résultats de ces essais et le compte rendu de ces résultats devraient suivre les modalités exposées au § 4.5.

Si les échantillons d'eau réceptrice sont probablement toxiques et si l'on veut connaître le degré de dilution nécessaire pour permettre une croissance et un développement normaux de la truite arc-en-ciel, il faudrait mener un essai employant plusieurs concentrations, comme il est exposé dans les § 4.1 et 4.5, afin de déterminer les paramètres standards et convenables de mesure, c'est-à-dire la CE 50 et la CE 25, pour la non-viabilité des divers stades de développement, au terme des essais E, EA et EAT et, en sus, dans

l'essai EAT, tous les deux après 30 jours, la CL 50 et la CI 25 pour le poids moyen atteint par les truitelles. Les séries de dilution testées devraient comprendre au moins un échantillon non dilué. Lorsque l'on signale les constatations de l'essai EA ou EAT, il faut leur ajouter un compte rendu descriptif du retard de développement, des difformités et du comportement (essai EAT seulement) et on peut exposer dans le détail les observations supplémentaires (facultatives) [v. § 4.5].

Section 8

Rapports à produire

Le procès-verbal de chaque essai doit mentionner tout écart par rapport aux exigences exposées dans les sections 2 à 7 de la présente méthode et, le cas échéant, fournir des précisions. Le lecteur doit pouvoir établir si les conditions et les modes opératoires expérimentaux et préalables ont rendu les résultats valides et acceptables pour l'usage qu'on entend en faire.

Le § 8.1 énumère les renseignements à intégrer dans le procès-verbal de l'essai ; le § 8.2, ceux à soit intégrer dans le procès-verbal de l'essai, soit communiquer séparément dans un rapport général, soit archiver pour au moins cinq années. Des programmes de surveillance ou des protocoles expérimentaux connexes pourraient exiger de faire figurer dans le procès-verbal certains des renseignements énumérés dans le § 8.2 ou de les reléguer à l'archivage (p. ex. des précisions sur les substances d'essai ou les modes opératoires et conditions précis ayant coïncidé avec le prélèvement des échantillons, leur manutention, leur transport et leur entreposage).

À l'égard de certains modes opératoires et conditions communs à une série d'essais courants (p. ex. les essais toxicologiques systématiques de surveillance ou de contrôle de la conformité aux règlements), correspondant aux exigences énoncées dans le présent document, on peut renvoyer à un rapport général ou joindre ce dernier. Dans ce rapport, on expose dans ses grandes lignes la pratique ordinairement suivie en laboratoire.

On doit archiver au laboratoire, pour au moins cinq ans, les précisions se rapportant à la réalisation et aux constatations de l'essai, qui ne sont pas reproduites dans le procès-verbal ni dans le rapport général, de sorte que l'on peut fournir l'information convenable si l'essai doit faire l'objet d'une vérification (audit). L'information archivée devrait comprendre les éléments suivants :

- L'enregistrement de la chaîne de transmission des échantillons analysés dans un dessein de surveillance ou de réglementation ;
- Copie du dossier d'acquisition de l'échantillon ou des échantillons ;
- Les résultats d'analyses chimiques de l'échantillon ou des échantillons ;
- Les notes d'observations et de mesures en laboratoire prises au cours de l'essai ;
- Les notes de laboratoire et les cartes de contrôle portant sur les essais toxicologiques de référence ;
- Les dossiers détaillés concernant l'origine des géniteurs et leur état de santé ;
- Toute l'information pertinente sur les méthodes utilisées pour provoquer l'expulsion des gamètes, sur leur manutention, leur conditionnement et leur entreposage ainsi que sur le processus ultérieur de fécondation ;
- Des renseignements sur l'étalonnage de l'équipement et des instruments.

Le personnel de laboratoire effectuant les essais devrait signer ou parafer l'original des feuilles de données.

8.1 Exigences minimales pour le procès-verbal de l'essai

Voici la liste des renseignements que l'on doit intégrer dans chaque procès-verbal de l'essai.

8.1.1 Substance d'essai

- Une courte description du type d'échantillon (p. ex. produit chimique, effluent, éluviat, lixiviat ou eau réceptrice) dans la forme où on l'a communiquée, le cas échéant, au personnel de laboratoire ;
- Des renseignements sur l'étiquetage ou le codage de chaque échantillon ou sous-échantillon ;
- Les dates du prélèvement de chaque échantillon ou sous-échantillon ; la date et l'heure de sa réception au laboratoire ;
- Les dates ou les journées d'utilisation de chaque échantillon ou sous-échantillon au cours de l'essai ;
- Dans le cas d'un échantillon d'effluent ou de lixiviat, sa température ou, s'il existe de nombreux sous-échantillons, la température d'un seul de ces derniers, à sa réception au laboratoire ;
- Les mesures de l'OD et du pH de l'échantillon ou du sous-échantillon d'eau usée ou d'eau réceptrice, immédiatement avant sa préparation ou son emploi dans l'essai toxicologique ;
- La date de préparation de l'éluviat et la description de la marche suivie à cette fin ; les dates ou les journées au cours desquelles, dans un essai sur éluviat, on a utilisé des échantillons ou des sous-échantillons.

8.1.2 Organismes d'essai

- Le nom de l'espèce, y compris son nom vernaculaire ;
- L'origine des gamètes ou des géniteurs, le nombre de femelles et de mâles utilisés pour la fécondation ;
- Une courte description du mode opératoire utilisé pour vérifier la motilité des spermatozoïdes ;
- Une courte description (y compris des intervalles de temps) de la méthode utilisée pour la fécondation des gamètes ;
- Le laps de temps pris pour parachever la fécondation jusqu'à l'exposition de tous les groupes d'œufs aux solutions d'essai ;
- Tout aspect ou traitement inhabituels des gamètes ou des œufs, avant leur emploi dans l'essai.

8.1.3 Installations et appareillage

- Les nom et adresse du laboratoire d'essai ;
- Le nom de la personne ou des personnes ayant réalisé l'essai ;
- Une courte description des enceintes expérimentales et de l'appareillage connexe (p. ex. incubateurs ; pompes ou autres appareils, si l'essai était à renouvellement continu).

8.1.4 Eau témoin ou de dilution

- Les type(s) et origine(s) de l'eau utilisée comme eau témoin et eau de dilution ;
- Le type et la quantité de tout produit chimique ajouté à l'eau témoin ou de dilution.

8.1.5 *Méthode d'essai*

- Mention de la méthode d'essai biologique utilisée (c'est-à-dire conformément au présent document) ;
- Courtes mention et description des options choisies (p. ex. essai E, EA ou EAT ; renouvellement intermittent ou continu des solutions) ;
- Conception et description du mode opératoire, s'il est spécial (p. ex. renouvellement des solutions d'essai à d'autres intervalles que journaliers ; préparation et utilisation d'un éluatriat ; préparation et utilisation d'un solvant et, le cas échéant, d'un témoin de ce dernier) ;
- Courte description des modes opératoires, dans les cas où on a filtré un échantillon, un sous-échantillon ou la solution d'essai ou on en a corrigé la dureté ou le pH ;
- Courte description de la fréquence et de la nature de toutes les observations et de toutes les mesures effectuées au cours de l'essai ;
- Nom du ou des programmes ainsi que des méthodes de calcul des paramètres de mesure statistiques et renvoi à ces programmes et méthodes.

8.1.6 *Conditions expérimentales et modes opératoires*

- Le pourquoi et la description de tout écart aux modes opératoires et aux conditions ou de toute exclusion de modes opératoires et de conditions exposés dans le présent document ;
- Le nombre de solutions d'essai, y compris les témoins et leur titre ; le volume et la profondeur de solutions dans chaque enceinte expérimentale ;

- Le nombre de sujets par enceinte expérimentale et le nombre de répétitions par concentration ;
- Une brève mention sur la présence ou l'absence d'aération, y compris d'aération préalable ; le cas échéant, le débit et la durée de l'aération de l'échantillon ou de solution d'essai, avant et pendant l'exposition des organismes ;
- Le mode et le débit de renouvellement des solutions d'essai, c'est-à-dire L/(g.j) ;
- Les dates du début et de la fin de l'essai ;
- Toutes les mesures exigées de la température, du pH et de l'OD (mg/L et pourcentage de saturation) dans l'échantillon et les solutions d'essai, y compris les témoins, avant et pendant l'essai.

8.1.7 *Résultats*

- Le nombre moyen et le pourcentage d'embryons non viables dans chaque répétition et à chaque concentration, y compris dans les témoins (essai E), 7 jours après la fécondation ; la CE 50 et ses limites de confiance à 95 % et la CE 25 ;
- Le nombre moyen et le pourcentage d'alevins non viables dans chaque répétition et à chaque concentration, y compris les témoins, 7 jours après la sortie de l'œuf de la moitié des sujets dans les groupes témoins (essai EA) ; la CE 50 et ses limites de confiance et la CE 25 ;
- Le nombre moyen et le pourcentage de sujets non viables au moment où la moitié des sujets des groupes témoins ont atteint le stade de la truitelle, dans chaque répétition et à chaque

concentration, y compris dans les témoins (essai EAT) ; la CE 50 et ses limites de confiance et la CE 25 ;

- Le nombre de truitelles mortes à chaque concentration après 30 jours d'exposition avec alimentation et le nombre de truitelles au début de l'exposition (essai EAT) ; la CL 50 et ses limites de confiance ;
- Le poids sec moyen des truitelles ayant survécu à l'exposition de 30 jours, avec alimentation, dans chaque répétition et à chaque concentration (essai EAT) ; la CI 25 et ses limites de confiance à 95 % ;
- Un ou des comptes rendus descriptifs sur les retards de l'éclosion et les difformités chez les alevins à chaque concentration (essai EA) ; la description de tout écart apparent au témoin ;
- Un ou des comptes rendus descriptifs sur les alevins difformes, le retard pour parvenir au stade de la truitelle et le comportement anormal des truitelles à chaque concentration (essai EAT) ; la description de tout écart apparent au témoin ;
- Les résultats des essais E effectués avec un ou des toxiques de référence, parallèlement, ainsi que la moyenne géométrique ($\pm 2 \sigma$) pour les mêmes toxiques de référence, obtenus dans le laboratoire, à la faveur des essais antérieurs ;
- Tout phénomène inhabituel relatif à l'essai, tout écart aux modes opératoires décrits dans le présent rapport, tout problème observé, toute mesure prise pour y remédier.

8.2 Exigences supplémentaires

Voici la liste des renseignements qu'il faut

soit faire figurer dans le procès-verbal de l'essai, soit dans le rapport général ou, encore qu'il faut archiver pour au moins cinq années.

8.2.1 Substance d'essai

- Le nom des préleveurs ou des fournisseurs des échantillons ou de sous-échantillons ;
- La chaîne de transmission et les fiches d'inscription des échantillons ou des sous-échantillons ;
- L'état (p. ex. température, obscurité, récipient scellé) dans lequel se trouvaient les échantillons ou les sous-échantillons à leur réception et pendant leur entreposage.

8.2.2 Organismes d'essai

- Les antécédents des géniteurs (p. ex. fécondité ; dossiers des maladies observées et de leur traitement) ;
- Le mode opératoire du prélèvement des gamètes et les observations faites au cours de l'opération (p. ex. degré de maturité des femelles ; motilité du sperme) ;
- Les conditions dans lesquelles ont été effectués le transport et l'entreposage des gamètes, la détermination de la motilité du sperme avant la fécondation, la fécondation même ainsi que les modes opératoires suivis et des détails des modalités de la fécondation.

8.2.3 Installations et appareillage expérimentaux

- La description des systèmes de régulation de l'éclairage et de la température dans l'installation ;
- La description du système d'aération et

de régulation de l'aération des enceintes expérimentales ;

- La description détaillée ou la représentation graphique des enceintes expérimentales et de l'appareillage connexe (p. ex. taille, forme, type de matériau, conception) ;
- La description des modalités de nettoyage ou de rinçage de l'appareillage.

8.2.4 Eau témoin ou de dilution

- Des précisions sur le prélèvement d'échantillon et l'entreposage, si l'eau témoin ou l'eau de dilution était une eau réceptrice d'amont ;
- Des précisions sur tout traitement préalable que l'on a fait subir à l'eau (p. ex. filtration, stérilisation, chloration et déchloration, réglage de la température, dégazage, aération) ;
- Les variables connexes de la qualité de l'eau (p. ex. métaux en dissolution, ammoniacale, pesticides, matières en suspension, acides humiques et fulviques) mesurées avant et/ou pendant l'essai toxicologique.

8.2.5 Méthode expérimentale

- Description de l'expérience que possède le laboratoire à l'égard de l'option choisie et des modes opératoires connexes décrits dans le présent document ;
- Le mode opératoire ayant servi à la préparation et à l'entreposage des solutions mères ainsi que des solutions filles de produits chimiques, description et concentration(s) de tout solvant utilisé ;
- Les méthodes utilisées pour l'analyse

chimique des solutions d'essai ou de l'échantillon, avec renvois ; précision concernant le prélèvement, la préparation des échantillons et leur entreposage, préalablement à l'analyse chimique ;

- L'utilisation et la description des essais préliminaires et des essais visant à déterminer les intervalles de manifestation de la toxicité.

8.2.6 Conditions expérimentales et modes opératoires

- La photopériode, la source d'éclairage et l'intensité de ce dernier à la surface des solutions d'essai ;
- La description de l'éclaircissage des truitelles avant le début de la deuxième étape de l'essai EAT (méthode, nombres, moment) ;
- La description de la source de nourriture, de son type et de la ration (quantité et fréquence des repas) distribuée aux truitelles durant l'essai EAT ;
- Toute autre caractérisation chimique effectuée sur l'échantillon, les solutions mères et les solutions d'essai (p. ex. concentration de substance chimique, teneur en matières en suspension, conductivité, dureté et alcalinité), avant et/ou pendant l'essai ;
- L'aspect de l'échantillon ou des solutions d'essai ; changements d'aspect observés au cours de l'essai ;
- Les conditions et modes opératoires de la mesure de la CE 50 des toxiques ou du toxique de référence utilisés dans l'essai E.

8.2.7 Résultats

- Les observations et les données

numériques supplémentaires étayant les comptes rendus descriptifs des effets observés au cours de l'essai EA ou EAT, pour lesquels il n'existe aucune observation formelle (v. § 4.4 et 8.1.7), y compris l'information relative : à la proportion d'embryons non viables (essais EA et EAT) ; à l'éclosion retardée (essais EA et EAT) ; à la mortalité des alevins après l'éclosion (essais EA et EAT) ; aux alevins difformes (essais EA et EAT) ; à l'accession retardée au stade de la truitelle (essai EAT) ; le comportement anormal des truitelles (essai EAT) ;

- Les résultats des essais visant à établir la

gamme des concentrations significatives (le cas échéant) ;

- Les cartes de contrôle présentant les résultats les plus récents et les antécédents des essais toxicologiques effectués avec le ou les toxiques de référence ;
- La présentation graphique des données ;
- Les résultats des essais de la létalité aiguë effectués en parallèle avec des truitelles ou de jeunes arcs-en-ciel et une partie de l'échantillon ou des solutions d'essai.

Références

- ABERNETHY, S.G. et G.F. WESTLAKE,
« Guidelines for pH Adjustment of
Effluent Samples for Toxicity Testing »,
ministère de l'Environnement de
l'Ontario, Rexdale, ON, 11 p. [N° ISBN
0-7729-5947-1] (1989).
- APHA, AWWA, et WPCF (American
Public Health Association, American
Water Works Association, and Water
Environment Federation), *Standard
Methods for the Examination of Water
and Wastewater*, 19^e éd., APHA,
AWWA, et WPCF, Washington, DC
(1992).
- ARMSTRONG, F.A.J. et D.P. SCOTT,
« Photochemical Dechlorination of
Water Supply for Fish Tanks with
Commercial Water Sterilizers », *J. Fish.
Res. Board Can.*, 31: 1881-1885 (1974).
- ASTM (American Society for Testing and
Materials), « Standard Guide for
Conducting Early Life-stage Tests with
Fishes », E1241-88, p. 857-882, dans :
*1991 Annual Book of ASTM Standards,
Volume 11.04, Pesticides, Resource
Recovery, Hazardous Substances and
Oil Spill Response, Waste Disposal, and
Biological Effects*, ASTM, Philadelphie,
PA (1991a).
- ASTM (American Society for Testing and
Materials), « Standard Practice for
Conducting Acute Toxicity Tests with
Fishes, Macroinvertebrates, and
Amphibians », E729-88, p. 378-397,
dans : *1991 Annual Book of ASTM
Standards, Volume 11.04, Pesticides,
Resource Recovery, Hazardous
Substances and Oil Spill Response,
Waste Disposal, and Biological Effects*,
ASTM, Philadelphie, PA (1991b)
- ASTM (American Society for Testing and
Materials), « Standard Guide for the Use
of Lighting in Laboratory Testing »,
E1733-95, p. 1279-1289, dans : *1996
Annual Book of ASTM Standards,
Volume 11.05, Pesticides, Resource
Recovery, Hazardous Substances and
Oil Spill Response, Waste Disposal, and
Biological Effects*, ASTM, Philadelphie,
PA (1996).
- BEACHAM, T.D. et C.B. MURRAY,
« Temperature, Egg Size, and
Development of Embryos and Alevins of
Five Species of Pacific Salmon: A
Comparative Analysis », *Trans. Am.
Fish. Soc.*, 119: 927-945 (1990).
- BEACHAM, T.D., F.C. WITHLER, et R.B.
MORLEY, « Effect of Egg Size on
Incubation Time and Alevin and Fry
Size in Chum Salmon (*Oncorhynchus
keta*) and Coho Salmon (*Oncorhynchus
kisutch*) », *Can. J. Zool.*, 63: 847-850
(1985).
- BENOIT, D.A., « Toxic Effects of
Hexavalent Chromium on Brook Trout
(*Salvelinus fontinalis*) and Rainbow
Trout (*Salmo gairdneri*) », *Water Res.*,
10: 497-500 (1976).
- BENOIT, D.A., E.N. LEONARD, G.M.
CHRISTENSEN, et J.T. FIANDT, « Toxic
Effects of Cadmium on Three
Generations of Brook Trout (*Salvelinus
fontinalis*) », *Trans. Am. Fish. Soc.*, 105:
550-560 (1976).
- BILLINGTON, J.W., G.-L. HUANG, F. SZETO,
W.Y. SHIU, et D. MACKAY,
« Preparation of Aqueous Solutions of
Sparingly Soluble Organic Substances: I.
Single Component Systems », *Environ.
Toxicol. Chem.*, 7: 117-124 (1988).
- BIRGE, W.J., communication personnelle,
School of Biological Sciences,
Université du Kentucky, Lexington, KY
(1992).

- BIRGE, W.J., communication personnelle, School of Biological Sciences, Université du Kentucky, Lexington, KY (1996).
- BIRGE, W.J. et J.A. BLACK, « *In Situ* Toxicological Monitoring: Use in Quantifying Ecological Effects of Toxic Wastes », p. 215-231, dans : *In Situ Evaluations of Biological Hazards of Environmental Pollutants*, S.S. Sandhu (éd.), Plenum Press, New York, NY (1990).
- BIRGE, W.J., J.A. BLACK, et A.G. WESTERMAN, « Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents », *Environ. Toxicol. Chem.*, 4: 807-821 (1985).
- BOUCK, G.R., « Gasometer: An Inexpensive Device for Continuous Monitoring of Dissolved Gases and Supersaturation », *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 111: 505-516 (1982).
- BRENNER, F.J. et W.L. COOPER, « Effect of Suspended Iron Hydroxide on the Hatchability and Embryonic Development of the Coho Salmon: », *Ohio J. Science*, 78: 34-38 (1978).
- BRUNGS, W.A., « Effects of Residual Chlorine on Aquatic Life », *J. Water Pollut. Control Fed.*, 45: 2180-2193 (1973).
- BURKHALTER, D.E. et C.M. KAYA, « Effects of Prolonged Exposure to Ammonia on Fertilized Eggs and Sac Fry of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) », *Trans. Am. Fish. Soc.*, 106: 470-475 (1977).
- CANARIA, E.C., J.R. ELPHICK, et H.C. BAILEY, « A Simplified Procedure for Conducting Small Scale Short-term Embryo Toxicity Tests with Salmonids », manuscrit inédit (1996).
- CARL, G.C., W.A. CLEMENS, et C.C. LINDSEY, « The Freshwater Fishes of British Columbia », Handbook No. 5, British Columbia Provincial Museum, Victoria, C.-B. (1973).
- CCREM (Conseil canadien des ministres des Ressources et de l'Environnement), *Recommandations pour la qualité des eaux au Canada*, Groupe de travail sur les lignes directrices relatives à la qualité de l'eau, Environnement Canada, Ottawa (1987).
- DAVIES, P.H., J.P. GOETTL, Jr., J.R. SINLEY, et N.F. SMITH, « Acute and Chronic Toxicity of Lead to Rainbow Trout *Salmo gairdneri*, in Hard and Soft Water », *Water Res.*, 10: 199-206 (1976).
- DAVIS, J.C., *Exigences et critères relatifs à l'oxygène dissous dans l'eau, et leurs particularités à l'environnement canadien*, Comité associé des critères scientifiques concernant l'état de l'environnement, Conseil national de recherches du Canada, Ottawa, CNRC n° 14100, 111 p. (1975).
- DAYE, P.G. et E.T. GARSIDE, « Development and Survival of Embryos and Alevins of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L., Continuously Exposed to Acidic Levels of pH, from Fertilization », *Can. J. Zool.*, 57: 1713-1718 (1979).
- DOUDOROFF, P. et D.L. SHUMWAY, *Dissolved Oxygen Requirements of Freshwater Fishes*, Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome. Fisheries Tech. Paper 86, 291 p. (1970).
- EC (Environnement Canada), *Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence*, Environnement Canada, Conservation et protection, Ottawa, rapport SPE 1/RM/12, 91 p. (1990a).

- EC (Environnement Canada), *Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel*, Conservation et protection, Ottawa, rapport SPE 1/RM/9, 51 p. (1990b).
- EC (Environnement Canada), *Exigences relatives au suivi sur des effets sur l'environnement aquatique, annexe 1*, Environnement Canada et ministère des Pêches et des Océans, 2 décembre 1991, 47 p., Ottawa, rapport SPE 1/RM/18 (1991).
- EC (Environnement Canada), *Méthode d'essai biologique : essais de toxicité sur des salmonidés aux premiers stades de leur cycle biologique (truite arc-en-ciel, saumon coho ou saumon de l'Atlantique)*, Conservation et protection, Ottawa, rapport SPE 1/RM/28, 87 p. (1992a).
- EC (Environnement Canada), *Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule*, Conservation et protection, Ottawa, rapport SPE 1/RM/22, 72 p. (1992b).
- EC (Environnement Canada), *Document d'orientation sur l'interprétation et l'application des données toxicologiques environnementales*, Service de la protection de l'environnement, Ottawa, rapport SPE 1/RM/34, en préparation (1998a).
- EC (Environnement Canada), *Document d'orientation sur la détermination statistique des résultats des essais de toxicité*, Service de la protection de l'environnement, Ottawa, rapport SPE 1/RM/xx, en préparation (1998b).
- FENNELL, M., J. BRUNO, et G. VAN AGGELEN, *Research Supporting Methodology Improvements to the Early Life-stage Fish Toxicity Test Using Rainbow Trout and Comparative Testing with a Suite of Acute and Chronic Toxicity Tests Using a Reference Toxicant and Pulp Mill Effluents*, rapport technique préparé par le Centre des sciences de l'environnement du Pacifique, North Vancouver, pour le compte de la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (1998).
- FINNEY, D.J., « *Probit Analysis* », 3^e éd., Cambridge University Press, Cambridge, MA (1971).
- GORDON, M.R., K.C. KLOTINS, V.M. CAMPBELL, et M.M. COOPER, « *Farmed Salmon Broodstock Management* », ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, Programme d'aide à la recherche industrielle, Conseil national de recherches du Canada et BC Research, 194 p. Vancouver (1987).
- HELDER, T., « *Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on Early Life Stages of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*, Richardson)* », *Toxicology*, 19: 101-112 (1981).
- HODSON, P.V., Note au sous-comité du GITA, Institut Maurice-Lamontagne, Mont-Joli (Qc) [1992].
- HODSON, P.V. et B.R. BLUNT, « *Temperature-induced Changes in Pentachlorophenol Chronic Toxicity to Early Life Stages of Rainbow Trout* », *Aquatic Toxicol.*, 1: 113-127 (1981).
- HODSON, P.V. et B.R. BLUNT, « *The Effect of Time from Hatch on the Yolk Conversion Efficiency of Rainbow Trout, *Salmo gairdneri** », *J. Fish Biol.*, 29: 37-46 (1986).
- HODSON, P.V., R. PARISELLA, B. BLUNT, B. GRAY, et K.L.E. KAISER, « *Quantitative Structure-activity Relationships for Chronic Toxicity of Phenol, *p*-Chlorophenol, 2,4-Dichlorophenol, Pentachlorophenol, *p*-Nitrophenol and 1,2,4-Trichlorobenzene to Early Life Stages of Rainbow Trout (*Oncorhynchus**

- mykiss) », *Can. Tech. Rept. Fish. Aquat. Sci.*, 1784, 55 p. (1991).
- HUBERT, J.J., communication personnelle, Département de mathématiques et de statistique, Université de Guelph, Guelph (Ont.) [1991].
- KLONTZ, G.W., P.C. DOWNEY, et R.L. FOCHT, *A Manual for Trout and Salmon Production*, prepared for Sterling H. Nelson & Sons Inc. Murray, UT (1979).
- KRISTENSEN, P., *Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to Other FELS Test Methods*, rapport final, Institut de la qualité de l'eau, Commission des communautés européennes, Direction générale de l'environnement et de la protection des consommateurs et de la sécurité nucléaire, juin 1990, 44 p. et annexes (1990).
- MARCH, B.E. et M.G. WALSH, *Salmonid Culture, Fundamentals and Practice for British Columbia*, cours par correspondance, éducation permanente et communications, faculté des sciences agricoles, Université de la Colombie-Britannique, Vancouver (1987).
- MARTENS, D.W., R.W. GORDON, et J.A. SERVIZI, *Toxicity of Butoxyethyl Ester of 2,4-D to Selected Salmon and Trout*, Commission internationale des pêcheries de saumon du Pacifique, New Westminster, rapport d'étape 40, 18 p. (1980).
- MASTERS, J.A., M.A. LEWIS, D.H. DAVIDSON, et R.D. BRUCE, « Validation of a Four-day *Ceriodaphnia* Toxicity Test and Statistical Considerations in Data Analysis », *Environ. Toxicol. and Chem.*, 10: 47-55 (1991).
- MAYER, F.L., K.S. MAYER, et M.R. ELLERSIECK, « Relation of Survival to Other Endpoints in Chronic Toxicity Tests with Fish », *Environ. Toxicol. Chem.*, 5: 737-748 (1986).
- MCCAFFREY, L., « The Role of Toxicity Testing in Prosecutions Under Section 14 (1)(a) of the Environmental Protection Act, 1971 and Section 32 (1) of the Ontario Water Resources Act », p. 15-22, dans : *Proc. Fifth Annual Aquatic Toxicity Workshop*, Hamilton, Ontario, Nov. 7-9, 1978, Canada Fisheries and Marine Service, Ottawa, Ontario, *Fish. Mar. Serv. Tech. Rep.* 862 (1979).
- McKIM, J.M. 1977. Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity. *J. Fish. Res. Bd Can.*, 34: 1148-1154.
- McKIM, J.M., « Early Life Stage Toxicity Tests », p. 58-95, dans : *Fundamentals of Aquatic Toxicology—Methods and Applications*, G.M. RAND et S.R. PETROCELLI (éd.), Hemisphere Publ. Corp., Washington, DC (1985).
- McKIM, J.M. et D.A. BENOIT, « Effects of Long-term Exposures to Copper on Survival, Growth, and Reproduction of Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) », *J. Fish. Res. Board Can.*, 28: 655-662 (1971).
- McLEAY, D.J. et M.R. GORDON, *Toxicity Studies with the Brush-control Herbicide "Krenite" and Salmonid Fish*, B.C. Research Report No. 1-01-305, 42 p., préparé pour le ministère des Forêts, Victoria, C.-B. (1980).
- McLEAY, D.J., I.K. BIRTWELL, G.F. HARTMAN, et G.L. ENNIS, « Responses of Arctic Grayling (*Thymallus arcticus*) to Acute and Prolonged Exposure to Yukon Placer Mining Effluent », *Canad. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44: 658-673 (1987).
- NAS/NAE (United States National Academy of Sciences/National Academy of Engineering), *Water Quality Criteria 1972*, United States Environmental Protection Agency, Ecolog. Res. Ser., EPA R3.033, 594 p., Washington, DC (1974).

- NCASI (National Council for Air and Stream Improvement, Inc.) *Effects of Biologically Treated Bleached Kraft Mill Effluent During Early Life Stage and Full Life Cycle Studies with Fish*, Tech. Bull. No. 475, 93 p., NCASI, New York, NY (1985).
- NEVILLE, C.M., *Short-term Early Life Stage Growth Test Using Sacfry and Early Swim-up Stages of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss)*, ministère de l'Environnement de l'Ontario, ébauche à l'état de manuscrit non publiée, 16 p., Toronto (1992).
- NEVILLE, C.M., *Short-term Early Life Stage Growth Test Using Sacfry and Early Swim-up Stages of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) - Protocol*, ministère de l'Environnement et de l'Énergie de l'Ontario, rapport PIBS 3356, ISBN 0-7778-3650-5, 27 p., Toronto (1995a).
- NEVILLE, C.M., *Short-term Early Life Stage Growth Test Using Sacfry and Early Swim-up Stages of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) - Method Development and Data Interpretation Illustrated by Exposure to Copper, Sodium Dodecyl Sulphate, 3,4,5-Trichlorophenol and 3,4-Dichloroaniline*, ministère de l'Environnement et de l'Énergie de l'Ontario, rapport PIBS 3359, ISBN 0-7778-3649-1, 63 p. Toronto (1995b).
- NEWMAN, M.C., *Quantitative Methods in Aquatic Ecotoxicology*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL (1995).
- NOGGLE, C., « The Behavioral and Physiological Effects of Suspended Sediment on Juvenile Salmonids », p. 54-63, dans : *Proc. Fourth Annual Aquatic Toxicity Workshop*, Vancouver, 8 au 10 novembre 1977, Service des pêches et de la mer, Environnement Canada, Ottawa, *Fish. Mar. Serv. Tech. Rep.*, 818 (1978).
- NORBERG-KING, T.J., *An Interpolation Estimate for Chronic Toxicity: The ICp Approach*, United States Environmental Protection Agency, Environ. Res. Lab., Duluth, MN, rapport technique 05-88 du National Effluent Toxicity Assessment Center, sept. 1988, 12 p. (1988).
- NORBERG-KING, T.J., *A Linear Interpolation Method for Sublethal Toxicity: The Inhibition Concentration (ICp) Approach (Version 2.0)*, United States Environmental Protection Agency, Environ. Res. Lab.-Duluth, Duluth, MN, rapport technique 03-93 du National Effluent Toxicity Assessment Center, juillet 1993 (1993).
- NOVAK, L., communication personnelle. B.A.R. Environmental Inc., Guelph (Ont.) [1996].
- OECD (Organisation de coopération et de développement économiques), *Fish Toxicity Test on Egg and Sac-fry Stages*, ébauche de lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, 30 mar, OCDE, Paris, 18 p. (1992a).
- OECD (Organisation de coopération et de développement économiques), *Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie*, ébauche des nouvelles lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, document 210, avec l'aval de la réunion conjointe du groupe des produits chimiques et du Comité de gestion, 6 au 8 novembre 1990, OCDE, Paris (1992b).
- OECD (Organisation de coopération et de développement économiques), *Fish, Juvenile Growth Test 28 Days*, ébauche de lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, 30 mars, OCDE, Paris, 15 p. (1992c).
- OECD (Organisation de coopération et de développement économiques), *Fish, Toxicity Test on Egg and Sac-fry Stages*, ébauche révisée de lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits

- chimiques, décembre 1996, OCDE, Paris, 20 p. (1996).
- OECD (Organisation de coopération et de développement économiques), *Fish, Juvenile Growth Test*, ébauche révisée de lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, septembre 1997, OCDE, Paris, 16 p. (1997).
- PAINE, M.D., W.M. GIBSON, E.C. CANARIA, et J.A. VANDERLEELIE, *Rainbow Trout Alevin Conversion Efficiency Test*, manuscrit non publié, EVS Consultants, North Vancouver, BC (1991).
- PETERSON, R.H. et D.J. MARTIN-ROBICHAUD, « First Feeding of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Fry as Influenced by Temperature Regime », *Aquaculture*, 78: 35-53 (1989).
- PETERSON, R.H., H.C.E. SPINNEY, et A. SREEDHARAN, « Development of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Eggs and Alevins Under Varied Temperature Regimes », *J. Fish. Res. Board Can.*, 34: 31-43 (1977).
- PETERSON, R.H., D.J. MARTIN-ROBICHAUD, et J. POWER, « Toxicity of Potash Brines to Early Developmental Stages of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) », *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 41: 391-397 (1988).
- REXRODE, M. et T.M. ARMITAGE, *Fish Early Life-stage Test*, Hazard Evaluation Division Standard Evaluation Procedure, USEPA, Office of Pesticide Programs, Washington, DC, Report EPA 540/9-86-138, 12 p. (1987).
- ROCCHINI, R.J., M.J.R. CLARK, A.J. JORDAN, S. HORVATH, D.J. MCLEAY, J.A. SERVIZI, A. SHOLUND, H.J. SINGLETON, R.G. WATTS, et R.H. YOUNG, *Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish*, ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, Victoria, 18 p. (1982).
- SEDGEWICK, S.D., *The Salmon Handbook. The life and Cultivation of Fishes of the Salmon Family*, Andre Deutsch Limited, Londres (1982).
- SERGY, G., *Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environment Protection, Conservation and Protection*, Environnement Canada, Edmonton, Alberta, rapport non numéroté (juillet 1987).
- SERVIZI, J.A. et D.W. MARTENS, *Effects of Selected Heavy Metals on Early Life of Sockeye and Pink Salmon*, Commission internationale des pêches de saumon du Pacifique, New Westminster (C.-B.), rapport d'étape n° 39, 26 p. (1978).
- SERVIZI, J.A. et R.W. GORDON, « Detoxification of TMP and CTMP Effluents Alternating in a Pilot Scale Aerated Lagoon », *Pulp Paper Can.*, 87 (11): T404-409 (1986).
- SERVIZI, J.A. et D.W. MARTENS, « Some Effects of Suspended Fraser River Sediments on Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*) », p. 254-264, dans : *Sockeye Salmon (Oncorhynchus nerka) Population Biology and Future Management*, H.D. SMITH, L. MARGOLIS, et C.C. WOOD (éd.), ministère des Pêches et des Océans, Ottawa, *Canad. Spec. Pub. Fish. Aquat. Sci.*, 96 (1987).
- SHIU, W.Y., A. MAIJANEN, A.L.Y. NG, et D. MACKAY, « Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: II. Multicomponent Systems—Hydrocarbon Mixtures and Petroleum Products », *Environ. Toxicol. Chem.*, 7: 125-137 (1988).
- SPRAGUE, J.B., « The ABC's of Pollutant Bioassay Using Fish », p. 6-30, dans : *Biological Methods for the Measurement of Water Quality*, ASTM STP 528,

- American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA (1973).
- STEEL, R.G.D. et J.H. TORRIE, « *Principles and Procedures of Statistics* », McGraw-Hill Book Co., New York, NY (1960).
- STEPHAN, C.E. « Methods for Calculating an CL 50 », p. 65-84, dans : *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, F.L. Mayer et J.L. Hamelink (eds.), ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA (1977).
- SUTER, G.W. II, A.E. ROSEN, E. LINDER, et D.F. PARKHURST, « Endpoints for Responses of Fish to Chronic Toxic Exposures », *Environ. Toxicol. Chem.*, 6: 793-809 (1987).
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Fish Early Life-stage Toxicity Test », *Federal Register*, 50 (188): 39355-39360, Sec. 797.1600, Rules and Regulations, USEPA, Washington, DC (1985a).
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), *Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. Standard Evaluation Procedure*, Hazard Evaluation Div., rapport EPA-540/9-85-006, USEPA, Washington, DC, 12 p. (1985b).
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*, 2^e éd. (préparé par C.I. WEBER, W.H. PELTIER, T.J. NORBERG-KING, W.B. HORNING, F.A. KESSLER, J.R. MENKEDICK, T.W. NEIHEISEL, P.A. LEWIS, D.J. KLEMM, Q.H. PICKERING, E.L. ROBINSON, J. LAZORCHAK, L.J. WYMER, et R.W. FREYBERG), Office of Research and Development, rapport EPA 600/4-89/001, USEPA, Cincinnati, OH, 248 p. (1989).
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations. Phase I Toxicity Characterization Procedures*, 2^e éd. (T.J. NORBERG-KING, D.I. MOUNT, E.J. DURHAN, G.T. ANKLEY, L.P. BURKHARD, J.R. AMATO, M.T. LUKASEWYCZ, M.K. SCHUBAUER-BERIGAN, et L. ANDERSON-CARNAHAN, éd.), Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory, National Effluent Toxicity Assessment Center Tech. rapport 18-90, rapport EPA/600/6-91/003, USEPA, Duluth, MN (1991a).
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), *Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents, Phase I* (préparé par T.J. NORBERG-KING, D.I. MOUNT, J.R. AMATO, D.A. JENSEN et J.A. THOMPSON), Office of Research and Development, National Effluent Toxicity Assessment Center Tech. rapport 05-91, rapport EPA/600/6-91/005, USEPA, Duluth, MN (1991b).
- USEPA, (United States Environmental Protection Agency), *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Water to Freshwater Organisms*, 3^e éd. (P.A. LEWIS, D.J. KLEMM, J. M. LAZORCHAK, T.J. NORBERG-KING, W. H. PELTIER, et M.A. HEBER, éd.), Office of Research and Development, rapport EPA/600-4-91-002, USEPA, Cincinnati, OH (1994).
- VAN AGGELEN, G., *Bioassay Procedure for the Measurement of Toxicants to Eyed Salmonid Eggs*, rapport inédit, rapport, 16 p., Laboratoire de l'environnement, ministère de l'Environnement et des Parcs de la Colombie-Britannique, North Vancouver, (1988).
- VELSEN, F.P.J., « Embryonic Development in Eggs of Sockeye Salmon, *Oncorhynchus nerka* », *Canad. Spec.*

- Publ. Fish. Aquat. Sci.*, 49: 1-19, Fisheries and Oceans Canada, Nanaimo, BC (1980).
- VERNIER, J.M., « Chronological Table of the Embryonic Development of Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* Rich. 1836 », *Annales d'embryologie et de morphogénèse*, 2: 495-520 [Traduction anglaise de J.G.J. GODIN] (1969).
- WEST, Inc. et D.D. GULLEY, « TOXSTAT™ 3.5 », Western EcoSystems Technology, Inc., Cheyenne, Wyo. [Logiciel et notice, WEST, Inc., 203 Central Ave., Cheyenne, WY, 82001] (1996).
- WILLIAMS, D.A., « A Test for Differences Between Treatment Means When Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control », *Biometrics*, 27: 103-118 (1971).
- WILLIAMS, D.A., « The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control », *Biometrics*, 28: 519-532 (1972).
- WOLTERING, D.M., « The Growth Response in Fish Chronic and Early Life Stage Toxicity Tests: A Critical Review », *Aquatic Toxicol.*, 5: 1-21 (1984).
- YEE, S.G., D.J. MCLEAY, et M. FENNELL, *Recent Laboratory Studies Related to Improving Environment Canada's Biological Test Method EPS 1/RM/28 Using Rainbow Trout Embryos* (« E » Toxicity-test Option), rapport technique préparé par McLeay Environmental Ltd. pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (1996).

Membres du Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique (octobre 1998)

Gouvernement fédéral (Environnement Canada)

C. Blaise
Centre Saint-Laurent
Montréal

S. Blenkinsopp
Direction générale de l'avancement des technologies environnementales
Edmonton

C. Boutin
Centre national de recherche sur la faune
Hull

C. Buday
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

A. Chevrier
Division du milieu marin
Hull

K. Day
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ont.)

K. Doe
Direction générale de la conservation de l'environnement
Moncton

G. Elliott
Laboratoire d'écotoxicologie
Edmonton

M. Fennell
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver

M. Harwood
Centre Saint-Laurent
Montréal

P. Jackman
Direction de la conservation de l'environnement
Moncton

R. Kent
Direction de l'évaluation et de l'interprétation
Hull

N. Kruper
Laboratoire d'écotoxicologie
Edmonton

D. MacGregor
Centre de technologie environnementale
Gloucester (Ont.)

D. Moul
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver

W.R. Parker
Région de l'Atlantique
Dartmouth (N.-É.)

L. Porebski
Division du milieu marin
Hull

D. Rodrigue
Centre de technologie environnementale
Gloucester

R. Scroggins
Centre de technologie environnementale
Gloucester

A. Steenkamer
Centre de technologie environnementale
Gloucester

D. St-Laurent
Région du Québec
Montréal

G. van Aggelen
Centre des sciences de l'environnement du
Pacifique
North Vancouver

R. Watts
Centre des sciences de l'environnement du
Pacifique
North Vancouver

P. Wells
Région de l'Atlantique
Dartmouth

W. Windle
Direction de l'évaluation des produits
chimiques commerciaux
Hull

S. Yee
Centre des sciences de l'environnement du
Pacifique
North Vancouver

***Gouvernement fédéral (Commission de
contrôle de l'énergie atomique)***

P. Thompson
Division de la radioprotection
Ottawa

Provinces

S. Abernethy
Ministère de l'Environnement et de
l'Énergie
Etobicoke (Ont.)

C. Bastien
Ministère de l'Environnement et de la faune
Sainte-Foy (Qc)

D. Bedard
Ministère de l'Environnement et de
l'Énergie
Etobicoke

M. Mueller
Ministère de l'Environnement et de
l'Énergie
Etobicoke

C. Neville
Ministère de l'Environnement et de
l'Énergie
Etobicoke

D. Poirier
Ministère de l'Environnement et de
l'Énergie
Etobicoke

G. Westlake
Ministère de l'Environnement et de
l'Énergie
Etobicoke

Adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux du Service de la protection de l'environnement d'Environnement Canada

Administration centrale

351, boul. Saint-Joseph
Place Vincent-Massey
Hull
K1A 0H3

Région de l'Atlantique

15^e étage, Queen Square
45 Alderney Drive
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)
B2Y 2N6

Région du Québec

105, rue McGill
14^e étage
Montréal
H2Y 2E7

Région de l'Ontario

4905, rue Dufferin, 2^e étage
Downsview
M3H 5T4

Région de l'Ouest et du Nord

Pièce 210, Twin Atria n^o 2
4999, 98^e Avenue
Edmonton
T6B 2X3

Région du Pacifique et du Yukon ⁴⁵

224, rue Esplanade
North Vancouver (Colombie-Britannique)
V7M 3H7

45. Pour le calcul de la CL 50 on peut obtenir, contre une disquette formatée, un programme en BASIC de la Section de la toxicologie aquatique du Centre des sciences de l'environnement du Pacifique, 2645 Dollarton Highway, North Vancouver, C.-B., V7H 1V2.

Annexe C

Écarts méthodologiques des essais aux premiers stades du cycle biologique des salmonidés*

1. Substance et type d'essai

Document	Substance d'essai	Type d'essai	Durée de l'essai (jours)
Birge <i>et al.</i> , 1985	effluents	intermittent	9
USEPA, 1985a	produits chimiques	continu intermittent	~ 90
Rexrode et Armitage, 1987	pesticides	continu	~ 60
van Aggelen, 1988	effluents eaux réceptrices	recirculation	~ 60
ASTM, 1991a	produits chimiques	continu	~ 90
Birge et Black, 1990	cadmium effluents eaux réceptrices	continu intermittent	28
Hodson <i>et al.</i> , 1991	composés aromatiques	continu	85
Paine <i>et al.</i> , 1991	eaux réceptrices	intermittent	7 à 10
Neville, 1992	sulfate de cuivre dodécylsulfate de sodium 2,4,5-trichlorophénol	intermittent	12 à 15
OECD, 1992a	produits chimiques	continu intermittent	50 à 55
OECD, 1992b	produits chimiques	continu intermittent	~ 90

* D'après les méthodes publiées par les autorités canadiennes, provinciales et internationales, accessibles aux auteurs en juin 1992.

2. Espèces d'essai

Document	Espèces	Stade	Âge à la fin de l'essai (jours)
Birge <i>et al.</i> , 1985	arc-en-ciel	œuf ^a	9 (après la fécondation)
USEPA, 1985a	arc-en-ciel/omble de fontaine	œuf, alevin, truitelle ^b	60 (après l'éclosion)
Rexrode et Armitage, 1987	diverses ^c	œuf, alevin ^d	32 (après l'éclosion)
van Aggelen, 1988	arc-en-ciel	œuf embryonné, alevin	≤ 30 (après l'éclosion)
ASTM, 1991a	diverses ^c	œuf, alevin, truitelle ^b	30 (stade de la truitelle)
Birge et Black, 1990	arc-en-ciel	œuf, alevin ^a	4 (après l'éclosion)
Hodson <i>et al.</i> , 1991	arc-en-ciel	œuf, alevin, truitelle ^e	28 (stade de la truitelle)
Paine <i>et al.</i> , 1991	arc-en-ciel	alevin ^f	≤ 12 (après l'éclosion)
Neville, 1992	arc-en-ciel	alevin, truitelle ^g	5 (stade de la truitelle)
OECD, 1992a	arc-en-ciel	œuf, alevin ^h	20 (après l'éclosion)
OECD, 1992b	arc-en-ciel	œuf, alevin, truitelle ^h	60 (après l'éclosion)

- a. Œufs exposés dans les 30 minutes suivant la fécondation.
- b. Œufs exposés dans les 96 heures suivant la fécondation.
- c. Truite arc-en-ciel, omble de fontaine, truite brune et touladi ; saumons coho et quinnat.
- d. Les auteurs discutent d'espèces vivant en eaux tièdes et de salmonidés et ils signalent qu'il faudrait surveiller le développement, la survie et la croissance des jeunes nageant librement. La durée de l'essai, qui est d'environ 60 jours, ne permet cependant aux salmonidés que de traverser le stade de l'alevin. La fécondation peut avoir lieu avant l'exposition à la substance d'essai ou dans la solution d'essai. L'essai devrait débiter avec des œufs embryonnés choisis dans un groupe dans lequel le taux de fécondation est d'au moins 70 %.
- e. Exposition à partir de la journée de la fécondation jusqu'à 4 semaines d'alimentation externe.
- f. Exposition débutant dans les 24 à 48 heures après l'éclosion.
- g. Exposition débutant quand les alevins ont de 11 à 12 jours.
- h. On devrait exposer les embryons avant le début de la division du disque germinatif ou aussitôt que possible ensuite.

3. Conditions d'essai

Document	Volume du milieu d'essai	Nombre par enceinte expérimentale	Nombre de répétitions
Birge <i>et al.</i> , 1985	300 mL	50	4
USEPA, 1985a	n.i. (non indiqué)	60	2
Rexrode et Armitage, 1987	15 à 30 cm de profondeur ^a	20 (œufs) 30 (alevins)	4 (œufs) 1 (alevin)
van Aggelen, 1988	180 L	100	1
ASTM, 1991a	n.i. ^b	30	2 ^c
Birge et Black, 1990	300 mL	50	2 ou 4
Hodson <i>et al.</i> , 1991	14 L	200 à 300 œufs ^d	3
Paine <i>et al.</i> , 1991	1 L	20	5
Neville, 1992	325 mL	1	12
OECD, 1992a	n.i.	≥ 30	≥ 2
OECD, 1992b	n.i.	30	≥ 2

- a.** Les enceintes expérimentales peuvent varier de taille selon l'espèce en expérience.
- b.** Le volume de l'enceinte se fonde sur une densité de charge de 0,5 g/(L·j) [= 2 L/(g·j)] dans le cas de la truitelle, à la fin de l'essai.
- c.** Pour chaque concentration et témoin, il faut compter au moins deux véritables répétitions dans des enceintes complètement séparées et non uniquement un nombre multiple de récipients d'essai dans une enceinte.
- d.** Vers la fin de l'expérience, lorsque la biomasse des truitelles s'est approchée de la densité recommandée, on en a retiré et éliminé la moitié des sujets.

4. Système d'essai

Document	Enceinte expérimentale	Récipient d'essai	Équipement spécial
Birge <i>et al.</i> , 1985	boîte de Petri profonde	boîte de Petri de 400 mL avec grillages	système de dilution et de mélange
USEPA, 1985a	aquariums de verre	bac grillagé	n.i.
Rexrode et Armitage, 1987	aquariums de verre	jarre de verre à fond grillagé	bras oscillant ou siphons auto-amorçables
van Aggelen, 1988	2 cuves de plastique de 90 L	incubateur vertical	pompe submersible
ASTM, 1991a	aquariums de verre	jarre de verre à fond grillagé	bras oscillant ^a
Birge et Black, 1990	boîte de Petri profonde	boîte de Petri de 400 mL avec grillages	système de dilution et de mélange
Hodson <i>et al.</i> , 1991	aquariums de verre	tamis de cuisine à fond de nylon	n.i.
Paine <i>et al.</i> , 1991	becher de verre de 2 L	filet et boîte de Petri	rideaux de bulles
Neville, 1992	jarre de verre subdivisé en 4 secteurs distincts	jarre de verre à fond grillagé	balance précise à 10 µg près
OECD, 1992a	enceinte de verre ou d'un autre matériau inerte	récipient de verre ou d'un autre matériau inerte à fond et à parois grillagés	bras oscillant
OECD, 1992b	enceinte de verre ou d'acier inoxydable	récipient de verre ou d'acier à parois et à fond grillagés	bras oscillant

a. Au choix, on peut faire circuler les solutions d'essai directement dans les gobelets ou on fait varier le niveau de l'eau dans les enceintes expérimentales au moyen de siphons auto-amorçables.

5. Types d'eau témoin ou de dilution

Document	Type d'eau	Dureté (mg/L)	pH	OD min.	Période de renouvellement (h)
Birge <i>et al.</i> , 1985	reconst. ^a ou nat. ^a	101 ^b	7,7 ^b	> 60 % de sat. [*]	12 ou 24 (interm. ^c)
USEPA, 1985a	nat. ou déc. ^a	n.i.	n.i.	> 90 % de sat.	< 24 (≥ 6 vol./j)
Rexrode et Armitage, 1987	nat. ou reconst.	40 à 48	7,2 à 7,6	> 75 % de sat.	12 (90 %)
van Aggelen, 1988	récep. ou équiv. ^d	récep. ou équiv. ^d	récep. ou équiv. ^d	> 60 % de sat.	96 (50 %)
ASTM, 1991a	nat., reconst. déc.	n.i.	n.i.	> 60 % de sat.	< 24 (5 à 10 vol./j)
Birge et Black, 1990	reconst. ou nat.	101 ^b	7,7 ^b	> 60 % de sat.	1,5 h (cont. ^c) 12 ou 24 (interm.)
Hodson <i>et al.</i> , 1991	déc.	135	7,8 à 8,1	n.i.	3 à 5,5 (95 %)
Paine <i>et al.</i> , 1991	déc. et nat.	65	6,0 à 8,0	> 60 % de sat.	deux fois par semaine
Neville, 1992	déc. ou récep. ^a	135 ^e	n.i.	> 60 % de sat.	deux fois en 24 h
OECD, 1992a	nat., déc., reconst.	n.i.	n.i.	> 60 % de sat.	24 ^f
OECD, 1992b	nat., déc., reconst.	n.i.	n.i.	> 60 % de sat.	24 ^f

a. déc. : eau du robinet déchlorée ; équiv. : équivalent ; nat. : eau naturelle (souterraine ou de surface, non contaminée) ; récep. : eau réceptrice ; reconst. : eau reconstituée.

b. Valeurs pour l'eau reconstituée.

c. Cont. : à renouvellement continu ; interm. : à renouvellement intermittent.

d. Dureté ou pH de l'eau réceptrice ou dureté équivalente

e. Diluée comme il est demandé pour les essais en eau douce.

f. Essais à renouvellement continu, ≥ 5 volumes d'enceinte expérimentale par jour. Essais à renouvellement intermittent, ≥ 67 % du volume renouvelé journallement.

* sat. : saturation

6. Température de l'eau, aération, teneur en oxygène dissous et réglage du pH pendant l'essai

Document	Température (°C)	Aération	OD dans l'eau témoin ou de dilution avant l'essai	Réglage du pH
Birge <i>et al.</i> , 1985	12 à 13	150 bulles/min	près de la saturation	n.i.
USEPA, 1985a	10 à 12	aucune	90 à 100 % de sat. *	n.i.
Rexrode et Armitage, 1987	10 ± 2	aucune ^a	près de la saturation ^a	n.i.
van Aggelen, 1988	10	obligatoire	près de la saturation	n.i.
ASTM, 1991a	10	débit lent ^b	90 à 100 % de sat.	n.i.
Birge et Black, 1990	13	150 bulles/min	près de la saturation	n.i.
Hodson <i>et al.</i> , 1991	10, 12, 15 ^c	n.i.	n.i.	n.i.
Paine <i>et al.</i> , 1991	10 à 12	débit lent ^d	n.i.	< 6,0 et > 8,0
Neville, 1992	13,5 ± 1	aucune	près de la saturation	n.i.
OECD, 1992a	10 ± 2 (embryons) 12 ± 2 (alevins)	n.i.	n.i.	n.i.
OECD, 1992b	10 ± 2 (embryons) 12 ± 2 (alevins, truitelles)	n.i.	n.i.	n.i.

a. On devrait aérer vigoureusement l'eau de dilution pour que l'OD soit près du taux de saturation.

b. La perte de la substance d'essai causée par l'aération n'est pas considérée comme un problème, parce que les résultats se fondent sur les concentrations mesurées.

c. Pour les œufs, la température était de 10 °C ; pour la résorption du sac vitellin, de 12 °C ; et pour la croissance des truitelles, de 15 °C.

d. Si l'OD des solutions d'essai est inférieur à 60 % de saturation avant de les utiliser, les soumettre à une aération préalable jusqu'à ce que l'on atteigne ce taux ou, au plus, pendant 2 heures.

* sat. : saturation

7. Conditions d'éclairage pendant l'essai

Document	Intensité	Type	Photopériode	Période de transition
Birge <i>et al.</i> , 1985	obscurité	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA, 1985a	obscurité ^a	n.i.	14 h ^a	15 à 30 min ^a
Rexrode et Armitage, 1987	< 216 lux ^b	n.i.	16 h ^b	n.i.
van Aggelen, 1988	obscurité	n.i.	n.i.	n.i.
ASTM, 1991a	< 216 lux ^c	incandescent	n.i.	15 à 30 min
Birge et Black, 1990	obscurité	n.i.	n.i.	n.i.
Hodson <i>et al.</i> , 1991	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Paine <i>et al.</i> , 1991	obscurité	n.i.	n.i.	n.i.
Neville, 1992	faible ^d	fluorescent	16 h	n.i.
OECD, 1992a	obscurité ^e	n.i.	12 à 16 h ^e	n.i.
OECD, 1992b	obscurité ^e	n.i.	12 à 16 h ^e	n.i.

- a. Obscurité au cours de l'incubation des œufs et jusqu'à une semaine après l'éclosion. Ensuite, l'intensité de l'éclairage est de 30 à 100 lumens. La transition (aube ou crépuscule) est facultative.
- b. L'intensité (col. 2) concerne la période d'incubation des œufs. La photopériode concerne l'après-éclosion.
- c. Durant l'incubation.
- d. ~ 30 lux.
- e. Obscurité jusqu'à une semaine après l'éclosion, éclairage tamisé durant le reste de l'essai.

8. Alimentation des truitelles

Document	Type d'aliment	Fréquence des repas
Birge <i>et al.</i> , 1985	S.O. (sans objet)	S.O.
USEPA, 1985a	aliment de démarrage ou artémias	3 fois par jour, à toutes les 4 h
Rexrode et Armitage, 1987	S.O.	S.O.
van Aggelen, 1988	S.O.	S.O.
ASTM, 1991a	aliment de démarrage humide ou artémias	> 4 % du poids d'animal et par jour ^a (4 repas par jour)
Birge et Black, 1990	S.O.	S.O.
Hodson <i>et al.</i> , 1991	aliment de démarrage	n.i.
Paine <i>et al.</i> , 1991	S.O.	S.O.
Neville, 1992	artémias	3 fois par jour
OECD, 1992a	S.O.	S.O.
OECD, 1992b	n.i.	4 % du poids d'animal et par jour (2 à 4 repas par jour)

a. D'après le poids humide moyen des témoins et le poids sec des aliments.

9. Surveillance de la qualité de l'eau pendant l'essai

Document	Variables ^a	Fréquence
Birge <i>et al.</i> , 1985	temp., OD ^b , pH, cond., dur., alc., conc.	journalière
USEPA, 1985a	temp., OD pH, cond., dur., alc., COT	journalière hebdomadaire
Rexrode et Armitage, 1987	OD, pH, cond., dur., alc., conc.	hebdomadaire
van Aggelen, 1988	temp., OD, pH, cond., dur., alc., NH ₃ , COT, mét. conc. PBC, pest.	mensuelle 96 h ^c selon la source
ASTM, 1991a	OD, pH, cond., dur., alc., NH ₃ , COT, conc., part., GTD temp.	hebdomadaire horaire ^d
Birge et Black, 1990	temp., OD ^b , pH, cond., dur., alc., conc.	journalière
Hodson <i>et al.</i> , 1991	temp., OD, pH, cond., dur., alc. conc.	n.i. journalière
Paine <i>et al.</i> , 1991	temp., OD, pH cond., dur.	journalière 2 fois/semaine
Neville, 1992	temp. OD, pH, cond. conc., mét., N, NH ₃ , NO ₂ , NO ₃ , dur.	journalière début et fin ^e
OECD, 1992a	temp. OD, conc. pH, dur.	journalière ^f au moins 3 fois ^g début et fin
OECD, 1992b	temp., OD, conc. pH, dur.	hebdomadaire début et fin

- a.** **alc.** : alcalinité totale
cond. : conductivité spécifique
GDT : gaz dissous totaux
NH₃ : azote ammoniacal total
OD : oxygène dissous
pH : concentration des ions hydrogène
- BPC** : biphényles polychlorés
COT : carbone organique total
mét. : (certains) métaux
NO₂ : nitrites
part. : matières particulaires
temp. : température
- conc.** : concentration de la substance d'essai
dur. : dureté totale
N : azote total
NO₃ : nitrates
pest. : pesticides organophosphorés totaux

- b.** Au besoin, dans les essais à renouvellement intermittent, on devrait mesurer l'OD au début et à la fin de chaque intervalle de renouvellement dans au moins une enceinte expérimentale, à chaque concentration.
- c.** Sous-échantillons prélevés avec chaque remplacement de l'effluent.
- d.** Il faut mesurer les températures journalières maximale et minimale. Il faut mesurer en même temps la température dans toutes les enceintes expérimentales, si possible, près du début, du milieu et de la fin de l'essai.
- e.** À la deuxième journée d'exposition et à l'avant dernière journée de l'essai, il faudrait mesurer ces paramètres dans chaque concentration, au début de la période de 24 heures et dans chaque répétition à la fin de la période de 24 heures.
- f.** La température devrait être mesurée de façon continue, de préférence, dans au moins une enceinte expérimentale.
- g.** On devrait doser toutes les concentrations trois fois, en des périodes réparties également sur la durée de l'essai. Dans les essais à renouvellement intermittent, on devrait analyser au moins une fois les solutions d'essai fraîches et usées.

10. Observations biologiques pendant l'essai

Document	Variables	Fréquence	Paramètres de mesure
Birge <i>et al.</i> , 1985	mort. ^a	journalière	mort.
USEPA, 1985a	mort., diff. ^a , nbre écl. et nbre truit. ^b poids ^c	journalière fin de l'essai	mort., poids
Rexrode et Armitage, 1987	mort., nbre écl., dél. écl. ^d et dél. truit. ^b eff. path., hist., clin. ^b poids ^f	journalière hebdomadaire ^e fin de l'essai	mort., poids
van Aggelen, 1988	mort. diff.	journalière	mort.
ASTM, 1991a	mort. ^g , diff. poids ^h	journalière fin de l'essai	mort., poids
Birge et Black, 1990	mort., diff. ⁱ , dél. écl.	journalière	mort.
Hodson <i>et al.</i> , 1991	mort. ^j , diff., éclosion poids poids de l'alevin et du sac vitellin	journalière hebdomadaire une fois	mort., poids
Paine <i>et al.</i> , 1991	mort. poids du sujet, poids du sac vitellin	journalière début et fin de l'essai ^k	mort., croissance
Neville, 1992	mort., diff. croissance ^f	journalière début et fin de l'essai	mort., croissance
OECD, 1992a	mort., diff., nbre écl., dél. écl. longueur	journalière fin de l'essai	mort.
OECD, 1992b	mort., diff., nbre écl., dél. écl., dél. truit. poids	journalière fin de l'essai	mort., poids

a. mort. : mortalité ; diff. : difformités et anomalies

b. clin. : cliniques ; dél. écl. : délai avant l'éclosion ; dél. truit. : délai d'accession au stade de la tuitelle (nage libre) ; eff. : effets ; hist. : histologiques ; nbre écl. : nombre d'œufs éclos ; nbre truit. : nombre de truitelles ; path. : pathologiques.

c. Longueur standard et poids frais. En cas d'œdème apparent, on recommande le poids sec.

d. Déterminer le moment où le taux d'éclosion est d'environ 90 % ou compter 48 heures après la première sortie de l'œuf en comptant les alevins vivants.

e. Au moins 11, 18, 25 et 32 j après l'éclosion.

f. On devrait obtenir le poids frais de tous les poissons vivants. On devrait aussi utiliser le poids sec s'il y a risque d'œdème.

g. Éclaircissage au stade de l'œuf embryonné. La survie globale est le produit du pourcentage de survie.

h. Poids frais ; ajouter la longueur et le poids sec, s'il y a risque d'œdème.

i. Les poissons difformes vivants à la fin de l'essai sont comptés comme morts dans le bilan final.

j. Pour éviter les erreurs systématiques, calculer le nombre total de jours-poissons et exprimer la mortalité comme un nombre par millier de jours-poissons.

k. Préserver 40 alevins au début de l'essai. À la fin, garder tous les alevins pendant une semaine, puis les disséquer pour estimer l'efficacité de la transformation du vitellus. Poids frais et secs des alevins et des sacs vitellins.

11. Paramètres de mesure statistiques de l'essai

Document	Paramètre(s) de mesure	Critère
Birge <i>et al.</i> , 1985	CL 50, CL 10, CL 1 ^a CSEO, CEMO	écart sign.* au témoin
USEPA, 1985a	n.i.	écart sign. au témoin selon l'ANOVA
Rexrode et Armitage, 1987	CMAT ^b	écart sign. ou écart spécifié au témoin ^c
van Aggelen, 1988	TL 50 ^d , CL 50	écart sign. au témoin
ASTM, 1991a	n.i.	écart sign. ou écart spécifié au témoin
Birge et Black, 1990	CL 50, CL 10, CL 1 ^a CSEO, CEMO	écart sign. au témoin
Hodson <i>et al.</i> , 1991	CI 25, CSEO, CEMO	écart sign. au témoin
Paine <i>et al.</i> , 1991	efficacité de l'utilisation du sac vitellin	comparativement au témoin
Neville, 1992	CSEO, CEMO	écart sign. au témoin ^e
OECD, 1992a	CSEO, CEMO	écart sign. au témoin ^f
OECD, 1992b	CSEO, CEMO	écart sign. au témoin ^f

- a. La concentration de la substance dans l'eau est estimée mortelle pour 50 %, 10 % et 1 % des poissons en expérience, respectivement, après une période déterminée d'exposition.
- b. Concentration maximale acceptable de toxique (c'est-à-dire la TEC ou *toxic effects concentration* ou concentration où se manifestent des effets toxiques), pour ce qui concerne les données quantitatives (longueur, poids) déterminées par l'analyse de la variance et des tests de comparaison multiple ; pour ce qui concerne les données quantiques (p. ex., le nombre de poissons sortis de l'œuf), calcul à l'aide d'un tableau de contingence à 2 caractères binaires.
- c. Décider des écarts uniquement d'après les écarts statistiquement significatifs mis en évidence grâce aux témoins pourrait dépendre en grande partie de la taille des échantillons et de la variabilité entre les répétitions. Un écart spécifié, par rapport au témoin, d'un caractère biologique peut également servir de paramètre ultime de mesure.
- d. Temps léthal médian, période d'exposition que l'on estime avoir tué la moitié d'un groupe de poissons exposés à une concentration particulière.
- e. Croissance déterminée par le pourcentage de gain individuel de poids frais, en attribuant 0 % à tout cas de mortalité.
- f. On peut se servir de l'analyse de la variance à un critère de classification et des comparaisons multiples dans un essai en une seule enceinte expérimentale par concentration, mais on devrait montrer que la variabilité d'une enceinte à l'autre est raisonnablement faible.
- * écart sign. : écart significatif.

12. Validité de l'essai

Document	Variation de la concentration des substances d'essai	Variation de la température (°C)	Mortalité maximale chez les témoins (%)	Variation du poids chez les témoins
Birge <i>et al.</i> , 1985	n.i.	± 1	≤ 20	S.O.
USEPA, 1985a	≤ 20 % ^a	± 1,5 ^b	≤ 20 et ≤ 30 ^c	CV ≤ 40 % ^d
Rexrode et Armitage, 1987	n.i.	≤ 2	20	CV ≤ 40 % ^d
van Aggelen, 1988	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
ASTM, 1991a	≤ 30 % et ≥ 50 % ^e	≤ 1, 2 ou 3 ^f	30 ^g	n.i.
Birge et Black, 1990	n.i.	n.i.	≤ 20	n.i.
Hodson <i>et al.</i> , 1991	n.i.	< 1	≤ 20	CV ≤ 28 %
Paine <i>et al.</i> , 1991	n.i.	n.i.	≤ 20	n.i.
Neville, 1992	n.i.	≤ 1	< 10	≤ 15 %
OECD, 1992a	$\bar{x} \pm 20$ %	± 1,5 ^h	≤ 30 ⁱ	n.i.
OECD, 1992b	$\bar{x} \pm 20$ %	± 1,5 ^h	≤ 30 ⁱ	n.i.

- a. La concentration du toxique ne devrait pas être inférieure à plus de 20 % de la moyenne mesurée.
- b. Les températures d'essai devraient correspondre à 1 °C près à la température choisie.
- c. Le taux moyen de mortalité chez les témoins doit être au plus de 20 %, la mortalité dans un groupe témoin doit être au plus de 30 %.
- d. Coefficient maximal de variation (CV : 100 fois l'écart type divisé par la moyenne), pour le poids des poissons vivants à la fin de l'essai, dans tout récipient témoin.
- e. Inacceptable si la concentration mesurée dans toute solution d'essai est supérieure de plus de 30 % à la concentration moyenne pondérée dans le temps pendant plus de 5 % de la durée d'essai ou si elle est inférieure à 50 % à la concentration moyenne pondérée dans le temps pendant plus de 10 % de la durée de l'essai.
- f. Différence d'au plus 1 °C entre les températures moyennes pondérées dans le temps mesurées dans deux enceintes expérimentales. En un instant déterminé, l'écart peut être d'au plus 2 °C. Différence d'au plus 3 °C entre la température d'une enceinte expérimentale donnée et la moyenne globale des températures moyennes pondérées dans le temps.
- g. De l'éclaircissage des embryons jusqu'à la fin de l'essai.
- h. Différence de moins de 1 °C entre les enceintes expérimentales ou d'une journée à l'autre.
- i. Après l'éclosion. La mortalité chez les embryons témoins ne devrait pas dépasser 34 % jusqu'au moment de l'éclosion.

Distribution, cycle biologique et élevage de la truite arc-en-ciel

Distribution

La truite arc-en-ciel est indigène dans l'ouest de l'Amérique du Nord. On la trouve de la Basse-Californie à l'Alaska. Cependant, le gros des effectifs se trouve du nord de la Californie au nord de la Colombie-Britannique, particulièrement dans les fleuves et les tributaires de même que dans les lacs et les cours d'eau. Dans le centre de la Colombie-Britannique, l'espèce est parfois appelée « truite de Kamloops ». Introduite dans le monde entier, elle fréquente désormais les eaux de toutes les provinces du Canada, du fait de l'ensemencement ou d'une introduction accidentelle. Les populations passent leur vie entière en eau douce, bien qu'elles fréquentent également les eaux estuariennes, aux stades du juvénile ou de l'adulte. La sous-espèce « *steelhead* » des deux côtes du Canada descend à la mer et revient frayer en eau douce. Au Canada et ailleurs, la truite arc-en-ciel est largement élevée en pisciculture pour repeupler les eaux naturelles destinées à la pêche sportive. C'est l'une des espèces les plus utilisées en aquaculture commerciale et c'est l'un des poissons ordinairement utilisés dans les essais toxicologiques en milieu aquatique partout dans le monde et particulièrement au Canada.

Cycle biologique

L'arc-en-ciel fraie de la fin de l'hiver jusqu'au printemps. Les géniteurs ont habituellement trois ou quatre ans et pèsent de 1,5 à 4 kg, mais ceux qui fraient plus d'une fois sont d'un poids et d'un âge qui peuvent être considérablement plus élevés. La fécondité des femelles est d'environ 1 000 à 1 400 œufs par kilogramme. Les œufs, dont le diamètre varie entre 3,0 et 5,0 mm sont déposés dans des nids de gravier. À la sortie de l'œuf, les alevins mesurent de 80 à 175 mg (poids frais). Ils séjournent dans les graviers jusqu'à la résorption de leur sac vitellin et sortent, fin mai ou en juin, sous la forme de truitelles de 0,1 à 0,2 g nageant librement. Les jeunes nés dans les cours d'eau y passent le premier hiver, après quoi ils gagnent les lacs. Les truitelles et les juvéniles se nourrissent habituellement de larves d'insectes et de zooplancton (p. ex. de daphnies). On sait que les adultes se nourrissent d'insectes, de crustacés et d'autres poissons (Carl *et al.*, 1973 ; Gordon *et al.*, 1987).

La robe des jeunes (jusqu'à 12 cm environ) s'orne de 9 à 13 mouchetures ovales, foncées, le long de la ligne latérale, sur lesquelles se superposent de fines mouchetures noires sur le dos et les côtés. Une série de 5 à 10 taches pigmentées médianes se succèdent le long de la ligne sommitale du dos, devant la nageoire dorsale. Cette dernière possède un bord d'attaque foncé chez les truitelles et une série de barres ou de taches noires distinctes chez les sujets âgés. Aux extrémités des nageoires dorsale et anale on distingue une coloration blanche ou orangé pâle. Sur la nageoire adipeuse, on trouve fréquemment une ou deux taches noires ; la queue n'est presque pas tachetée. On ne trouve aucune touche de rouge sur le dessous de la mâchoire inférieure (Carl *et al.*, 1973).

Élevage

Expulsion provoquée des gamètes. — Des considérations pratiques pourraient obliger à l'extraction des gamètes nécessaires à la réalisation des essais toxicologiques chez les géniteurs gardés au laboratoire. Dans cette éventualité, il convient de prendre plusieurs facteurs en considération. Voici une description de certains des aspects les plus fondamentaux de l'opération, mais on devrait, au préalable, étudier à fond l'information détaillée sur les façons précises de s'y prendre.

La disponibilité saisonnière des gamètes à maturité dépend de la situation et des populations locales ainsi que des pratiques utilisées en pisciculture (c'est-à-dire de la température saisonnière de l'eau et de la photopériode). Certaines piscicultures ont réussi à sélectionner et à manipuler différentes populations de géniteurs pour obtenir des gamètes l'année durant.

Normalement, on sépare les mâles des femelles et les adultes des juvéniles. Il est facile de distinguer le sexe des poissons et de reconnaître les mâles adultes, mais la sélection des femelles mûres en vue de l'évacuation des gamètes demande de l'expérience et de la pratique. Si l'on n'examine pas fréquemment les femelles afin de déterminer le moment de l'ovulation, on risque fort de n'obtenir que des œufs stériles. La fécondité des œufs est à son maximum pendant une période de 3 à 4 jours survenant de 4 à 8 jours après l'ovulation. Pour optimiser la fécondation, l'extraction des œufs destinés aux essais toxicologiques devrait survenir au cours de cette période. Si on laisse les œufs vieillir davantage, on risque de nuire à leur survie, non seulement à la fécondation, mais également à tous les stades, de l'œuf embryonné jusqu'à la truitelle.

Il est essentiel de manipuler les poissons avec soin quand on en vérifie la maturité. En effet, il est très facile de briser les œufs non pondus, qui deviennent stériles. On reconnaît la femelle prête, aux signes suivants : augmentation de volume de l'abdomen, qui devient plus mou ; gonflement et coloration en rouge de la papille saillant à l'orifice urogénital ; expulsion spontanée d'œufs par cet orifice. On peut examiner ces œufs en les rendant transparents et en vérifiant la position de la vésicule germinative et des gouttelettes lipidiques dans le vitellus. Ces manipulations des géniteurs et la vérification de leur maturité exigent un personnel expérimenté.

L'évacuation des œufs peut être confiée à une ou deux personnes, selon leur expérience. Ordinairement, l'une immobilise le poisson pendant que l'autre procède à l'évacuation. On peut s'y prendre de diverses façons selon que l'on entend sacrifier la femelle ou l'anesthésier. On devrait éviter d'exercer une force excessive au cours de l'opération. Le mâle peut donner sa laitance plus d'une fois, à la condition qu'on lui accorde un repos d'une semaine entre chaque séance afin de ne pas nuire à la qualité de la laitance.

Manipulation des gamètes. — Les modes opératoires exposés dans le présent rapport exigent la fécondation des œufs immédiatement avant le début de l'essai. Il faut donc coordonner et synchroniser l'approvisionnement et la manipulation des œufs non fécondés et de la laitance. Si on peut obtenir les gamètes directement au laboratoire, par des géniteurs gardés sur place, il est souvent plus facile et plus économique de se les procurer d'une écloserie et de faire transporter au laboratoire la laitance et les œufs non fécondés (v. § 2.2). Dans les conditions optimales si l'on prend les conditions nécessaires, on peut ainsi transporter ces gamètes et les stocker

quelques jours avant la fécondation. Il est cependant souhaitable de réduire au minimum la période d'entreposage (idéalement moins de 24 h), afin d'améliorer la probabilité de réussite de la fécondation.

La laitance conserve entre 70 et 90 % de son pouvoir de fécondation pendant au moins 5 jours si on la manipule et on l'entreposage convenablement. Dans la laitance fraîche, les spermatozoïdes restent immobiles à cause de la teneur en potassium du liquide séminal. La qualité ultérieure du sperme dépend de la température de transport et d'entreposage, la hauteur de laitance dans le récipient, de la stérilité de ce dernier et de l'humidité. Les basses températures (idéalement entre 0 et 4 °C) prolongent la durée de conservation du sperme. Il faut plus de sperme pour féconder un lot d'œufs expédié et conservé au froid que si la fécondation n'avait pas été différée. Il importe de maintenir la hauteur de laitance dans le récipient à un minimum (< 6 mm) pour que le sperme soit convenablement oxygéné. Il est également souhaitable d'aérer la laitance avec de l'oxygène. L'emploi d'oxygène ou d'air saturé en humidité peut prolonger considérablement la durée de conservation, car il aide à prévenir la déshydratation des gamètes.

On peut transporter et entreposer les œufs non fécondés à peu près de la même façon que la laitance. Il faudrait collecter les œufs le plus tôt possible après l'ovulation, car la durée de conservation diminue avec l'âge des œufs. On devrait disposer les œufs sur au plus 4 couches et les expédier et les stocker à une température variant entre 0 et 4 °C, dans des contenants isolés, conçus de façon à réduire le risque de bris au minimum. Ainsi traités, les œufs non fécondés devraient conserver un taux normal de fécondité pendant environ 3 jours. Pour maximiser la fécondation, on devrait féconder les œufs entreposés avec de la laitance fraîche.

Fécondation. — Bien que la fécondation puisse avoir lieu en présence d'eau, il faut éviter cette technique, puisqu'elle déclenche la fermeture du micropyle avant l'exposition des œufs aux solutions d'essai. C'est pourquoi il faut utiliser la fécondation à sec. Quand on emploie cette méthode, il est recommandé de féconder les œufs d'au moins 4 femelles⁴⁶ (v. § 2.2), dans un seau ou un bac de plastique sec et propre. On ajoute ensuite la laitance d'au moins une fiole renfermant des spermatozoïdes motiles, lorsqu'ils sont activés (v. § 2.2). Il est préférable d'utiliser la laitance de plusieurs mâles afin d'accroître la probabilité de fécondation. Cependant, la laitance ne doit provenir que des fioles (1 à 4, selon la motilité des spermatozoïdes) dont le contenu s'est révélé actif lors de son mélange avec de l'eau douce ou du liquide ovarien (§ 2.2). Dès l'addition de la laitance, on mélange doucement les gamètes (p. ex. à la main, revêtue d'un gant chirurgical propre ; ou à l'aide d'une plume d'oie). On recommande 5 minutes d'agitation, pour la fertilisation (Fennell *et al.*, 1998) ; on peut aussi accorder 20 minutes à l'opération (Birge *et al.*, 1985). La fécondation devrait se produire sous faible éclairage. Immédiatement après, on devrait transvaser le plus rapidement possible dans les solutions d'essai des groupes d'œufs fécondés. Ce transfert complet de tous les groupes d'embryons fraîchement fécondés s'effectue normalement en moins de 10 minutes par essai (Yee *et al.*, 1996) et elle doit être terminée en moins de 30 minutes par essai.

46. L'emploi d'un nombre moindre de femelles augmente la probabilité d'invalidité de l'essai. Par exemple, si on utilise trois femelles et que les œufs de l'une d'entre elles se révèlent tous infertiles, le taux probable de fécondation serait au plus de 67 %, et on ne respecterait probablement pas le critère de validité des essais E, EA ou EAT énoncé au § 4.6.

On s'est servi de diverses techniques pour transférer des groupes d'œufs fraîchement fécondés dans les solutions d'essai. Le choix en est laissé aux chercheurs, à la condition de limiter l'exposition des œufs fraîchement fécondés à l'eau avant l'essai (pour les débarrasser de tout débris indésirable ou de laitance excédentaire) et de transférer ensuite rapidement tous les groupes d'œufs (c'est-à-dire le plus tôt possible, dans un délai de 30 minutes) dans les solutions d'essai (v. § 4.2). Une technique éprouvée et recommandée (Canaria *et al.*, 1996 ; Yee *et al.*, 1996 ; Fennell *et al.*, 1998) est de remplir en partie des nacelles étiquetées et tarées de chacune des solutions d'essai, puis de transférer les groupes d'œufs fraîchement fécondés dans les nacelles (un groupe par nacelle). Une cuillère de plastique (p. ex. pour mesurer le café) est utile à cette fin, pour permettre le transfert rapide du nombre approximatif d'œufs exigés par répétition dans chaque nacelle. Après chaque transfert, on fait un premier dénombrement des œufs. Dès que tous les groupes ont été distribués dans les nacelles, on recompte les œufs dans chaque nacelle et on en ajuste le nombre au besoin. Après une période supplémentaire de pas plus de 30 minutes (pour assurer le durcissement à l'eau et réduire le stress au minimum au cours de cette période ; Fennell *et al.*, 1998), on doit ensuite transférer le contenu de chaque nacelle doucement dans l'enceinte expérimentale assignée.

Une autre technique recommandée (Birge, 1996) consiste à transférer chaque groupe d'œufs fraîchement fécondés directement du récipient de fécondation à l'enceinte expérimentale, au moyen d'un outil de taille convenable (p. ex. une cuillère ou pelle de plastique ou un becher gradué, percé de petits trous pour permettre l'évacuation de l'eau ou un rinçage rapide à l'eau). Pour supprimer les débris ou la laitance excédentaire, on peut laver les œufs en plongeant la cuillère dans de l'eau témoin dont on aura préalablement réglé à température à celle du milieu d'essai. À la fin des transferts, on peut compter les œufs déposés dans chaque incubateur et faire les corrections nécessaires d'après le nombre ou l'aspect (p. ex. uniformité de la taille), au besoin (v. § 4.2).

Incubation et développement des embryons. — On trouvera dans le tableau D.1 les températures optimale et létale pour les embryons de truite arc-en-ciel. La température de l'eau est la principale variable déterminant le développement des embryons et elle peut servir à prédire le moment où ils atteindront les divers stades de développement. Les valeurs peuvent varier d'une race à l'autre de la même espèce. Le tableau D.2 indique les périodes prévues d'incubation pour obtenir un taux d'éclosion de 50 %.

Les embryons sont particulièrement vulnérables aux chocs mécaniques (agitation) à certains stades de leur développement. On ne peut pas alors les manipuler, les agiter, les verser ou les transporter sans causer de mortalité considérable. Cette sensibilité aux chocs a été mise en évidence à trois étapes du développement des embryons, chacune étant plus sensible que la précédente. La première survient entre 10 et 45 min après l'immersion des œufs dans l'eau après la fécondation. Elle coïncide avec la fusion des chromosomes parentaux. La deuxième étape sensible survient 2 à 72 h après l'immersion des embryons, alors que les cellules sont en division rapide. La troisième et la plus vulnérable survient 4 à 14 jours après la fécondation, lorsque l'embryon est en différenciation cellulaire rapide. La sensibilité aux chocs mécaniques diminue ensuite et n'est plus décelable dès le stade de l'œuf embryonné.

Comme la vitesse de développement embryonnaire dépend de la température, la sensibilité variera selon les conditions d'incubation. Cependant, pour réduire les pertes au minimum, on devrait éviter de manipuler les embryons moins de 24 h après leur immersion dans les solutions d'essai. Les embryons sont sensibles pendant ces 24 premières heures, mais pas excessivement. Toutefois, on ne devrait pas les déranger du tout après cette période jusqu'au stade de l'œuf embryonné.

Tableau D.1. — Températures de l'eau influant sur le développement et la survie des embryons^a

Limite inférieure ^b (°C)	Limite supérieure ^b (°C)	Température optimale (°C)
0,5 à 2,3	14,6	10,0 à 12,0

a D'après Gordon *et al.* (1987).

b C'est la température tuant la moitié des embryons en développement, durant la période d'incubation allant de la fécondation jusqu'à l'éclosion de la moitié des survivants.

Tableau D.2 — Durées d'incubation prévues à température constante

Température (°C)	Nombre de jours entre la fécondation et l'éclosion de la moitié des embryons ^a
1	182
2	138
3	107
4	86
5	71
6	59
7	50
8	43
9	37
10	32
12	25
14	20

a D'après Gordon *et al.* (1987).

Annexe E

Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais toxicologiques*

Colonne (nombre de concentrations entre 100 et 10 ou entre 10 et 1) **

1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

* Modifié d'après Rochinni *et al.* (1982).

** Dans une colonne, on devrait choisir une série de cinq (au moins) concentrations successives. Les points médians entre les concentrations de la colonne (x) se trouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs peuvent représenter des concentrations exprimées en pourcentage en poids (p. ex. mg/kg) ou en masse volumique (p. ex. mg/L). Au besoin, on peut les multiplier ou les diviser par toute puissance de 10. On pourrait utiliser la première colonne si le degré de toxicité est entaché de beaucoup d'incertitude. On ne devrait pas utiliser de concentrations plus largement espacées. Pour les essais sur les effluents, on augmente rarement le gain de précision en sélectionnant une colonne à droite de la colonne 3. Les valeurs plus rapprochées des colonnes 4 à 7 pourraient parfois être utiles pour les essais de produits chimiques dont le seuil d'effet est abrupt.